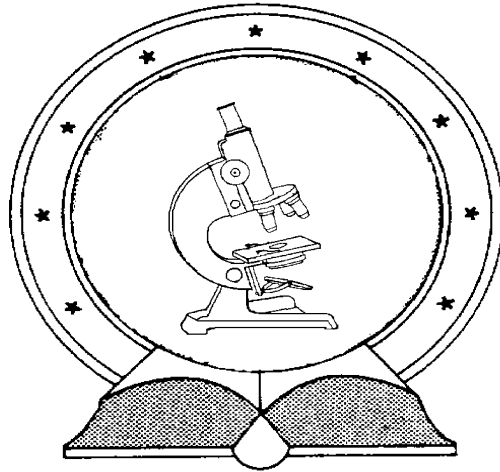


DE-TTK



1949

A *Thermobifida fusca* TM51-ből származó xilán 1,4- β -xilozidáz enzim működési mechanizmusának vizsgálata

Doktori (PhD) értekezés

Szerző:

Fekete Csaba Attila

Témavezető:

Dr. Kiss László

Debreceni Egyetem

Természettudományi Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2013

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Biológia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 20.

*Fekete Csaba Attila
Doktorjelölt*

Tanúsítom, hogy Fekete Csaba Attila doktorjelölt 2005-2013 között a fent megnevezett Doktori Iskola Biológia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 20.

*Dr. Kiss László
Témavezető*

**A *Thermobifida fusca* TM51-ből származó xilán 1,4- β -xilozidáz enzim
működési mechanizmusának vizsgálata**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a Biológia tudományágban

Írta: Fekete Csaba Attila okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál doktori iskolája
(Biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Kiss László

A doktori szigorlati bizottság tagjai:

Elnök: Dr.
Tagok: Dr.
Dr.

A doktori szigorlat időpontja: 20.....

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

Elnök: Dr.
Tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 20.....

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Mindenek előtt szeretném megköszönni Dr. Kiss László Ny. Egyetemi Docensnek az egykori Biokémiai Tanszék akkori tanszékvezetőjének, hogy segítségével bekapcsolódhattam tanszéken folyó kutatómunkába. Az ő vezetése alatt lehetőségem nyílt betekintést nyerni és megszeretni az enzimológiai kutatásokat. Munkámat mindvégig figyelemmel kísérte és hasznos tanácsaival segítette.

Szeretnék ezen kívül köszönetet mondani közvetlen munkatársaimnak, Elek Ritának, Dr. Barna Teréziának, Kertiné Somosi Ritának, segítségükért és hasznos gyakorlati és elméleti tanácsaikért.

Köszönöm továbbá Dr. Kukolya Józsefnek, aki rendelkezésünkre bocsátotta a rekombináns enzim génjét hordozó *E. coli* BL21(DE3) expressziós törzset.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Gyémánt Gyöngyinek a HPLC és MALDI-TOF mérésekben nyújtott segítségért.

Külön szeretném megköszönni Dr. Batta Gyulának a ¹H-NMR mérésekben valamint Dr. Kurtán Tibornak a CD spektroszkópiai vizsgálatokban nyújtott nagyon értékes szakmai segítséget.

Ezen felül szeretném megköszönni Dr. Kerékgyártó Jánosnak, Dr. Szurmai Zoltánnak valamint Dr. Somsák Lászlónak a szintetikus szerves kémiai munkákban nyújtott szakmai valamint technikai segítséget.

Szeretnék külön köszönetet mondani Dr. Sipiczky Mátyásnak illetve Gálné Dr. Miklós Idának, hogy a csoportunk integrálásával a Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszékbe lehetővé tették a további eredményes kutatómunkát és minden segítséget megadtak ezen doktori értekezés elkészüléséhez.

Köszönöm a Biokémiai valamint a Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszékek dolgozóinak, hogy a jó és segítőkész munkahelyi légkör megteremtésével hozzájárultak munkám sikerességéhez.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném a legnagyobb hálával megköszönni családomnak, szüleimnek, feleségemnek, Juditnak és a kislányomnak, Enikőnek azt a soha nem lankadó türelmet, szeretetet valamint a kitarító támogatást és biztatást, amely nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. A xilánok szerkezete és előfordulása	3
2.2. A xilánbontó enzimrendszer tagjai	5
2.3. A xilán 1,4-β-xilozidázok	11
2.3.1. Általános jellemzés.....	11
2.4. A <i>Thermobifida fusca</i>	32
2.4.1. A komposzt legaktívabb lignocellulózbontó aktinomicétái a <i>Thermobifida</i> -k.....	32
2.4.2. A <i>Thermobifida fusca</i> által termelt glikozid hidrolázok.....	32
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	33
3.1. Felhasznált anyagok	33
3.2. A xilán 1,4-β-xilozidáz enzim heterológ expressziója	33
3.2.1. A táptalajok előkészítése és sterilizálása	33
3.2.2. Szélesztés szilárd táptalajra	33
3.2.3. A mini kultúra elkészítése	34
3.2.4. A növesztés	34
3.2.5. A xilán 1,4- β -xilozidáz enzim termelésének indukciója	34
3.3. Az <i>E. coli</i> BL21(DE3) sejtek összegyűjtése és feltárása	34
3.3.1. A sejtek összegyűjtése.....	34
3.3.2. A sejtek feltárása	34
3.4. A TfBXyl43 enzim tisztítása	35
3.4.1. A TfBXyl43 enzim tisztítása His-tag affinitás kromatográfiával	35
3.4.2. A TfBXyl43 enzim tisztítása anion cserélő kromatográfiával.....	35
3.5. Az enzim aktivitásának mérése	36
3.5.1. para-Nitrofenil- β -D-xilopiranozid szubsztráttal	36
3.5.2. Xilobióz szubsztráttal	37
3.6. Fehérjetartalom meghatározása	37
3.6.1. A Lowry módszer.....	37
3.6.2. Az A ₂₈₀ módszer	37
3.6.3. A Bradford módszer	37
3.7. A TfBXyl43 enzim analízise elektroforetikus módszerekkel	38
3.7.1. SDS-PAGE módszerrel	38
3.7.2. Natív PAGE módszerrel	38
3.8. A xilooligomerek előállítására parciális enzim hidrolízissel	39

3.9. A pNP-β-D-xilopiranozid hidrolízisének időbeli követése $^1\text{H-NMR}$ segítségével	39
3.10. Az TfbXyl43 szubsztrátspecifitásának vizsgálata xilooligomerekre	40
3.11. Kinetikai paraméterek meghatározása	40
3.12. A hőmérséklet és a pH hatása az enzim aktivitására és stabilitására	41
3.13. Transzferáz aktivitás vizsgálatok	41
3.14. A kinetikai paraméterek pH-függésének vizsgálata.....	42
3.15. Inhibíciós vizsgálatok.....	42
3.16. A TfbXyl43 enzim kémiai módosítása.....	43
3.16.1. Az N-brómacetil- β -D-xilopiranozil-amin szintézise	43
3.16.2. A karboxilát oldalláncok specifikus kémiai módosítása.....	44
3.16.3. Inaktivációs vizsgálatok NBAXA-val	45
3.16.4. CD spektroszkópiai vizsgálatok	46
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	47
4.1. A rekombináns TfbXyl43 enzim expressziója és tisztítása.....	47
4.2. A TfbXyl43 enzim biokémiai jellemzése	49
4.2.1 A pH és a hőmérséklet hatása az enzim aktivitására és stabilitására	49
4.2.2. Az enzim natív molekulatömegének meghatározása és zimográfias vizsgálata	52
4.3. A xilán 1,4-β-xilozidáz enzim kinetikai paramétereinek meghatározása	53
4.4. A kinetikai paraméterek pH-függésének vizsgálata.....	55
4.5. Az enzim szubsztrát-specifitásának vizsgálata xilooligomerekre.....	57
4.6. Inhibíciós vizsgálatok.....	58
4.7. Az enzimreakció sztereoselektivitásának időbeli követése $^1\text{H-NMR}$ segítségével..	59
4.8. A TfbXyl43 enzim transzferáz aktivitásának vizsgálata	61
4.9. A katalitikusan aktív aminosav oldalláncok kémiai módosításának kinetikai vizsgálata.....	62
4.9.1. A karboxil oldalláncok specifikus kémiai módosítása	63
4.9.2. Az N-brómacetil- β -D-xilopiranozil-aminnal (NBAXA,) mint affinitás-jelölővel végzett vizsgálatok	66
4.10. Az NBAXA által módosított valamint a nem módosított xilán 1,4-β-xilozidáz enzim CD spektroszkópiai vizsgálata	71
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	74
6. SUMMARY	77
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	80
8. PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	97

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Asp – aszparaginsav	LB – Luria-Bertani
BSA – marha szérum albumin	MALDI-TOF MS – mátrix segített lézer deszorpciós és ionizációs
i-BuOH – izo-butanol	tömegspektrometria amely a repülés idő alapján mér
CD ₃ OD – deuterált metanol	MeCN – acetonitril
CD – cirkuláris dikroizmus	MeOH – metanol
DAD – diódasoros detektor	NBAXA – N-brómacetil-β-D-xilopiranozil-amin
DEAE – dietil-aminoetil	OD ₆₀₀ – optikai denzitás
DKM – diklórmetán	PAGE – poliakrilamid gélelektroforézis
DMF – dimetil-formamid	pAP-1-S-X1 – para-aminofenil-1-tio-β-D-xilopiranozid
DTT - ditiotreitól	pAP-1-S-X2 – para-aminofenil-1-tio-β-D-xilobiozid
EDAC · HCl – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid	PMSF – fenil-metil-szulfonil-fluorid
EtOH – etanol	pNP – para-nitrofenol
GH – glikozid hidroláz család	pNP-Ara – para-Nitrofenil-β-D-arabinopiranozid
Glu – glutaminsav	pNP-Glc – para-Nitrofenil-β-D-glükopiranozid
¹ H-NMR – proton, mágneses magrezonancia spektroszkópia	pNP-Xyl – para-Nitrofenil-β-D-xilopiranozid
HPLC – nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia	RI – törésmutató index detektor
IMAC – immobilizált fém-kelát képző iminodiacetát ligandumot tartalmazó gyanta	SDS – nátrium-dodecil-szulfát
IPTG – izopropil-1-tio-β-D-galaktopiranozid	TfBXyl43 – <i>Thermobifida fusca</i> TM51-es törzséből származó xilán 1,4-β-xilozidáz
k _{app} – látszólagos elsőrendű sebességi állandó	TRIS-HCl – Trisz-(hidroximetil)-amino-metán sósav puffer
k _{cat} – átviteli szám/ katalitikus konstans	VRK – vékonyréteg kromatográfia
k _{cat} /K _M – katalitikus hatékonyság	XylN ₃ – β-D-xilopiranozil-azid
k _i – inaktiváció sebességi állandója	
K _i – inhibíciós állandó/ látszólagos inaktivációs állandó	
k _i /K _i – inaktiválódás hatékonysága	
K _M – Michaelis állandó	

1. BEVEZETÉS

A glikozid hidrolázok (glikozidázok) az enzimeknek egy meglehetősen jelentős és nagy változatosságot mutató csoportját képviselik. Köszönhető ez elsősorban annak, hogy a természetben található oligo- és poliszacharidok, maguk is rendkívül változatos összetételűek lehetnek. Ebből adódóan az elmúlt évtizedekben, több tudományágban, fokozatosan merült fel az igény ezen enzimek részletesebb vizsgálata iránt. Ezen igény részint az élő szervezetek fiziológiai folyamataiban betöltött szerepükből fakad, részint pedig az ebből adódó nagymértékű ipari felhasználhatóságukból. A táplálékkal felvett, valamint a sejtekben raktározott poliszacharidok lebontása mellett igen fontos szerepet játszanak a glikoproteinek, glikopeptidek, peptidoglikánok, lipopoliszacharidok és glikolipidek oligoszacharid régióinak metabolizmusában is. Ezen glikokonyjugátumoknak központi jelentőségük van többek közt, a sejteket a külvilágtól elhatároló membránok felépítésében, a sejtek közötti komplex kommunikációs folyamatok, illetve a membrán fehérjék és extracelluláris proteinek transzportjának irányításában. Ezen felül részt vesznek különböző baktériumok sejtfalának felépítésében, mint szerkezeti és vázalkotó anyagok, továbbá fontosak még, mint az antigének és antibiotikumok alkotórészei. Mindezekből következik, hogy ezen enzimek hiánya, illetve bármilyen defektusa az élő szervezetekre nézve súlyos következményekkel járhat. Ugyanakkor, a glikozidáz enzimek működését gátló anyagok sok esetben hatékony terápiás szerekké váltak, kóros folyamatok, mint pl. diabétesz, baktérium vagy vírusfertőzések megfékezésében. A glikozidáz „kit”-ek ezáltal például az orvosi diagnosztika fontos elemeit képezik, mindemellett számos széles specifitású glikozidázt használnak a bonyolult oligoszacharidok szerkezetének felderítésében.

A növények és a gombák esetében igen nagy szükség van a rigid, poliszacharid típusú sejtfal keletkezésének és lebontásának dinamikus egyensúlyára, ami ebben a formában elképzelhetetlen a glikozidáz enzimek hatékony közreműködése nélkül.

Ezen szervezetek egyik leggyakrabban előforduló sejtfal alkotó poliszacharidja a xilán, melynek a lebontásában xilanolitikus enzimrendszerek vesznek részt. Az utóbbi évtizedekben fény derült arra is, hogy a xilánok nemcsak a természetben, de az iparban is igen nagy jelentőséggel bírnak, mivel az évenként keletkező mezőgazdasági és erdészeti hulladéknak egy jelentős részét alkotják. Az ipar számára a xilánok felhasználása egyre nagyobb kihívásnak bizonyult úgysis, mint különböző megújuló energiaforrások (bioetanol), illetve mint kémiai és élelmiszeripari alapanyagok (furfuralok, xilitolok). A xilánok ilyen jellegű újrahasznosításában a xilánbontó enzimrendszereknek tehát alapvetően fontos

szerepük van. A xilanolitikus enzimeket az utóbbi időben számos ipari területen kezdték el alkalmazni, mint pl.: állat takarmányozásban, élelmiszeriparban, gyógyszeriparban, vegyiparban, textiliparban és papíriparban. A legújabb kutatások pedig arra irányítják a figyelmünket, hogy a különböző xilooligoszacharidok jelentős humánbiológiai hatással rendelkezhetnek úgyis, mint az immunrendszert erősítő, illetve mint a bélflóra megfelelő egyensúlyára pozitív hatást gyakorló prebiotikus készítmények. A környezetkímélőbb technológiák egyre nagyobb mértékben történő elterjedésének köszönhetően, a hagyományos kémiai eljárásokkal szemben, az ilyen típusú enzimek felhasználásra egyre inkább fokozódó igény mutatkozik.

A xilanolitikus enzimek közül ez idáig, az endoxilanázok ipari felhasználása volt jellemző döntően. Azonban az utóbbi időben egyre fokozottabb figyelem irányult az enzimszisztéma további tagjainak, így például a xilán 1,4- β -xilozidázok felhasználására, melyek sok esetben az előbb említett endoxilanáz enzimek működési területét hivatottak kiegészíteni. Ezen felül olyan ipari folyamatokban (bioetanol és xilitol gyártás), ahol a xilánokat felépítő xilózra van szükség, ott pedig a β -xilozidázok alkalmazása nélkülözhetetlen.

A Debreceni Egyetem TEK TTK Biokémiai illetve Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszékén folyó enzimológiai kutatások egyik legjelentősebb iránya a különböző mikrobiális eredetű glikozid hidroláz enzimek működési mechanizmusának vizsgálata. Ezen kutatási témákba bekapcsolódva egy termofil komposztalakó baktérium által termelt xilán 1,4- β -xilozidáz enzim tanulmányozását végeztem. Értekezésem az ezen a téren nyert eredmények összefoglalása.

A vizsgálatok célja a *Thermobifida fusca* TM-51-es törzséből származó xilán 1,4- β -xilozidáz enzim izolálása és tisztítása transzformált *E. coli* BL21(DE3) expressziós törzsből. Célunk volt továbbá az enzim biokémiai jellemzése, szubsztrát-specifitásának meghatározása. Az enzim működési mechanizmusának és az abban résztvevő aminosav oldalláncoknak kémiai módosítással és inaktiválással történő vizsgálata.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A xilánok szerkezete és előfordulása

A természetben a teljes biomassa száraz tömegének több mint 90%-át teszik ki a különböző vázalkotó poliszacharidok. A biomassa ezen részét átlagosan 40-50% cellulóz, 20-30% hemicellulóz és 20-30% lignin teszi ki fajtól és előfordulástól függően (Sergejewa 1959, Petterson 1984, Coughlan és Hazlewood 1993a). A xilánok a hemicellulózok igen jelentős részét kitevő nagy heterogenitást mutató, komplex vegyületek. A xilánok legfontosabb szerepe a természetben, a növények sejtfalában található rigid poliszacharid alapmátrix kialakításában van. A növényi sejtfal cellulózból álló váza ebbe az alapmátrixba ágyazódik be. Mindezek mellett a csírázó magvakban, a tápláló szövetek sejtfalában, tartalék tápanyagként is igen nagy jelentőséggel bírnak (Dekker és Richards 1976). Az esetek túlnyomó többségében a xilánok alapvázát β -1,4 glikozidos kötésekkel kapcsolódó xilopiranoz egységek építik fel (Stephen 1983). Azonban egyes tengeri vörös alga (pl.: *Porphyra* és *Bangia* spp.) valamint zöld alga (pl.: *Caulerupa*, *Bryopsis* és *Udotea* spp.) fajok β -1,3 xilozidos kötésekkel felépülő xilánokat tartalmaznak (Iriki és munkatársai 1960, McDowell 1967). Vannak viszont olyan fajok is (pl.: *Rhodymenia palmata*) amelyek alapláncában egyaránt megtalálhatóak mind a β -1,3 mind pedig a β -1,4 xilozidos kötések (Dekker és Richards 1976, Barry és Dillon 1940). A szárazföldi növények sejtfalát felépítő xilán viszont minden esetben β -1,4 glikozidos kötésekkel kapcsolódó xilopiranoz egységekből épül fel.

Összetételüket tekintve a xilánok alapvetően két csoportra oszthatók: homo- és heteroxilánokra.

1. A homoxilánok főlánca kizárólag xilopiranozil csoportokat tartalmaz. Ez a csoport meglehetősen ritka a természetben, azoban a legismertebb képviselőit ennek a csoportnak eddig az árvalányhajból (*Stipa tenacissima*, L.) Chanda és munkatársai 1950) valamint dohány (*Nicotina tabacum*) szárából (Eda és munkatársai 1976) izolálták.
2. Az előzőekkel ellentétben a xilánok leginkább heteropoliszacharid formában fordulnak elő. Ezeknél a xilopiranoz egységekből felépülő alapláncához különböző egyéb szubsztituensek is kapcsolódhatnak. Ezek közül is a leggyakoribbak: acetyl, arabinopiranozil és glükuronopiranozil csoportok (Biely és munkatársai 1985, Whistler és Richards 1970), amelyek további

szubsztituenseket hordozhatnak. A heteroxilánok szerkezete az eredetüktől függően jelentős mértékben változhat:

- a) A zárwatermőkben (*Gymnospermae*) található xilán *O*-acetil-4-*O*-metilglükuronoxilán. Ebben a poliszcharidban kb. 150-200 D-xilopiranozid egység alkotja a főláncot. Ehhez a főlánchoz kapcsolódnak többnyire C-2 helyzetben, α -1,2-kötésekkel a 4-*O*-metil- α -D-glükuronopiranozil csoportok (Woodward 1984). Emellett meglehetősen nagy gyakorisággal kapcsolódnak a főlánchoz még C-2 illetve C-3 helyzetekben acetilcsoportok, kis mértékben javítva ezzel a xilán vízzoldékonyságát (Poutanen és munkatársai 1990, Coughlan és Hazlewood 1993a). Ezekon kívül a zárwatermők xilánjai kis mennyiségben galakturonsavat valamint ramnózt is tartalmazhatnak (Johansson és Samuelson 1977).
- b) A nyitwatermőkben (*Angiospermae*) leginkább az arabino-4-*O*-metilglükuronoxilán fordul elő. Ez a fajta xilán kisebb polimerizációfokú (DP=70-130) főláncot tartalmaz, mint a zárwatermők xilánja (Sunna és Antranikian 1997). Ezekben a xilánokban az alaplánchoz, lényegesen sűrűbben kapcsolódnak a 4-*O*-metil- α -D-glükuronopiranozil csoportok C-2 helyzetben, mint a zárwatermőkben. A zárwatermőkkel ellentétben viszont, a nyitwatermők xilánja nem tartalmaz acetilcsoportokat. Azonban kb. minden tízedik xilopiranozid egységhez kötődve, C-3-as helyzetben, L-arabinofuranozid csoportok kapcsolódnak α -1,3-glikozidos kötéssel (Puls és Schuseil 1993).
- c) Mindezekon felül, külön csoportot képez a pázsitfűfélékben (*Gramineae*) előforduló xilán, amely szintén arabino-4-*O*-metilglükuronoxilán. Ennek a polimerizációfoka kb. 70. A zárwatermők xilánjától eltérően ritkábban kapcsolódnak a főlánchoz 1,2-kötéssel a 4-*O*-metil- α -D-glükuronopiranozil egységek. Azonban a főlánc nagyobb mennyiségben tartalmaz L-arabinofuranozil oldalláncokat, amelyek C-2 és/vagy C-3 helyzetben kapcsolódnak a xilánvázhoz (Coughlan és Hazlewood 1993a). Minimális mennyiségben acetilcsoportok is előfordulhatnak ugyanilyen helyzetben (Bacon és munkatársai 1975). Ezen kívül C-5 helyzetben az arabinofuranozil oldalláncokhoz kapcsolódva a ferulsav (~6 %) valamint *p*-kumársav (3 %) szintén előfordulhat szubsztituensként (Mueller-Harvey és munkatársai 1986). Fontos mindenképpen kiemelni ezen ferulsav

szubsztituensek kapcsán, hogy *in vivo* a xilán láncok között, ill. xilán és lignin molekulák között, ezeknek köszönhetően, kovalens keresztkötések bonyolult hálózata alakulhat ki (Scalbert és unkatársai 1985, Stephen 1983).

Mindhárom esetben (a, b, c,) a xilánokban található különböző komponensek eloszlása erősen függ attól, hogy milyen konkrét fajról van szó illetve, hogy az pontosan hol és milyen környezetben helyezkedik el. Arról nem is beszélve, hogy az összetétel fajon belül szövetről szövetre változhat, ezáltal alakítva ki a xilánok óriási változatosságát a természetben.

2.2. A xilánbontó enzimrendszer tagjai

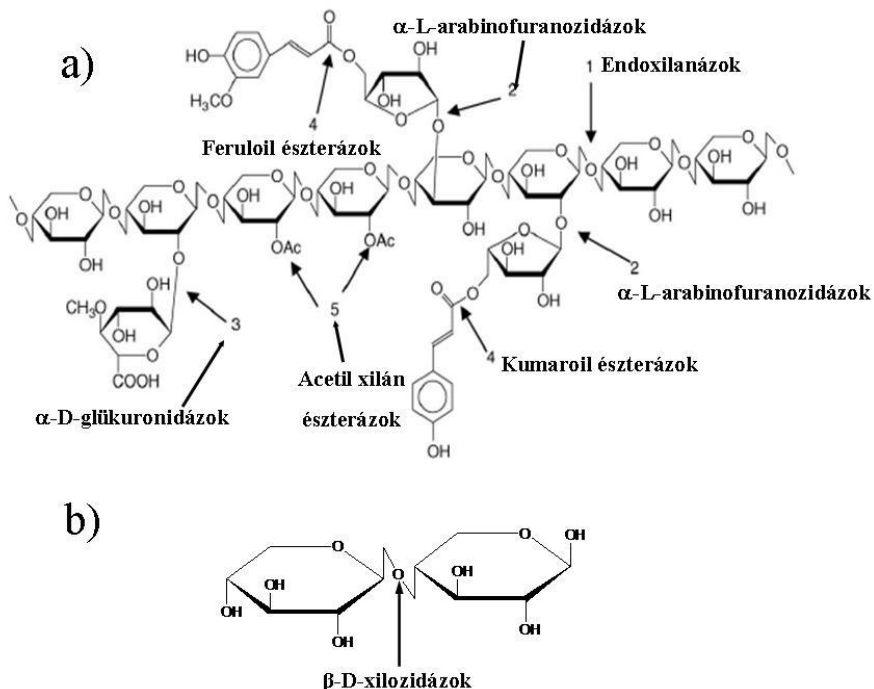
Amint az a fentiek alapján is kitűnik, a xilánok, függően attól, hogy milyen forrásból származnak igen jelentősen eltérő összetételűek és szerkezetűek lehetnek. Ennek tükrében nem meglepő tehát, hogy egy ilyen bonyolult összetételű és változatos szerkezetű komplex poliszacharid teljes lebontásához egy teljes enzimrendszer hatékony működésére van szükség. Ezen enzimrendszer tagjait nevezzük xilanolitikus vagy más néven xilánbontó enzimeknek, amelyeket különböző mikrobiális szervezetek (gombák, baktériumok) állítanak elő, hogy a hemicellulózt mint tápanyagforrást, ezek révén is hasznosítani tudják (Woodward 1984, Coughlan és Hazlewood 1993a, Sunna és Antranikian 1997, Polizeli és munkatársai 2005, Knob és munkatársai 2010).

A xilanolitikus enzimrendszernek a legfontosabb tagjai a *endo-1,4- β -xylanáz* (EC 3.2.1.8), amelyek a xilán főláncát hidrolizálják, kisebb oligoszacharid egységekre, ezáltal vízoldhatóvá téve az egyébként vízben oldhatatlan poliszaccharidot, valamint a *xilán 1,4- β -xilozidázok* (EC 3.2.1.37), amelyek pedig az endoxilanáz által lehasított xilo-oligoszacharid egységeket hidrolizálják, a nem-redukáló vég felől, xilózt szabadítva fel terméként (Coughlan és Hazlewood 1993a, Sunna és Antranikian 1997). Nem véletlenszerűen hasítanak a láncban, hanem függően attól, hogy milyen a szubsztrát lánc hosszúsága, a lánc elágazódás mértéke és a szubsztituensek jelenléte (Reilly 1981, Puls és Poutanen 1989, Li és munkatársai 2000). Ezen enzimek leggyakrabban a szubsztituátlan xilán régiókat képesek szubsztrátként elfogadni, működésük során. Ennek oka elsődlegesen az, hogy a stabil enzim-szubsztrát komplex kialakulása sztérikusan gátolt ezen enzimek esetében a xilán alapvázához kapcsolódó oldalláncok jelenléte miatt. Ezért meglehetősen fontos szerepet játszanak a xilán teljes hidrolízisében, a különböző oldalláncokat eltávolító enzimek is, úgy mint az α -L-

arabinofuranozidázok, α -glükuronidázok, acetilxilán észterázok, ferulsav és *p*-kumársav észterázok.

Az α -glükuronidázok, acetilxilán észterázok, ferulsav és *p*-kumársav észterázok jelenlétére csak az 1980-as évek második felétől derült fény, mivel ekkortól álltak rendelkezésre vizsgálatukhoz megfelelő szubsztrátok (Polizeli és munkatársai 2005).

Mindezen enzimek szoros együttműködése szükséges a xilán teljes és hatékony lebontásához (1. ábra).



1. ábra. A xilán teljes hidrolízise: **a)** a xilán előemésztése xilanolitikus enzimek részvételével. **b)** a felszabadult xilo-oligoszacharidok hidrolízise xilózzá xilán 1,4- β -xilozidázokkal.

a) β -1,4-endoxilanázok

Az egyre jelentősebbé váló ipari érdeklődésnek köszönhetően, egyre több összefoglaló közlemény (Dekker és Richards 1976, Wong és munkatársai 1988, Vikarii és munkatársai 1994, Kulkarni és munkatársai 1999, Polizeli és munkatársai 2005, Butt és munkatársai 2008) és könyv (Ericksson és munkatársai 1990, Visser és munkatársai 1992, Coughlan és Hazlewood 1993b) jelent meg, mind a növényi, mind a fungális, mind pedig a bakteriális forrásból származó xilanázokról. A endo-1,4- β -xylanáz(β -1,4-xilán hidroláz, EC 3.2.1.8) a xilán főláncának belsejében hasítják a béta-xilozidos kötéseket, ezáltal kisebb

polimerizáció fokú xilo-oligoszacharidokat szabadítva fel termékként. Ezen hidrolízis eredményeképpen a reakció kezdeti szakaszában nagyobb tagszámú oligomerek képződése tapasztalható, míg a reakció előrehaladtával kisebb molekulák, úgymint mono-, di- és triszacharidok képződése válik jellemzővé. Ennek legfőbb oka az, hogy a hidrolízis kezdeti szakaszában kapott nagyobb polimerizáció fokú oligomerek a későbbiek során ugyanolyan tovább bontható szubsztrátokká válhatnak, mint ahogy kezdetben maga a xilán volt. Tekintve, hogy az endoxilanázok igen sokféle forrásból izolálhatók, és ennek megfelelően igen sokféle szubsztráton képesek kifejteni aktivitásukat, így különbözőképpen lehet őket csoportosítani. A legáltalánosabban azonban, két csoportra osztják őket. Az egyik csoport képviselői, az arabinoxilán hidrolízisekor, képesek az α -1,3-arabinozidos kötéseket hasítani, ezáltal arabinózt felszabadítani, míg a másik csoportjuk erre nem képes (Takenishi és Tsujisaka 1975, Wood és McCrae 1986). Ezek alapján a xilanázokat, arabinózt felszabadító („debranching”) és arabinózt nem felszabadító („non-debranching”) csoportokra oszthatók (Dekker és Richards 1976, Kulkarni és munkatársai 1999, Polizeli és munkatársai 2005). Vannak azonban olyan organizmusok, amelyek mindkét fajta enzimet képesek termelni, így növelve a xilán hidrolízisének hatékonyságát (Wong és munkatársai 1988).

Az endoxilanázok molekulatömege többnyire 11-90 kDa közé esik, izoelektromos pontjuk pI 3.6-10.3 között, hőmérséklet optimumuk 40-70 °C között, míg a pH optimumuk pH 4.0-7.0 között változik (Coughlan és Hazlewood 1993a, Sunna és Antranikian 1997, Polizeli és munkatársai 2005). Azonban Wong és munkatársai arra az érdekes összefüggésre hívták fel a figyelmet, hogy az endoxilanázok többségénél a bázikus pI értékekhez 30 kDa alatti, míg a savas pI értékhez 30 kDa fölötti molekulatömeg tartozik (Wong és munkatársai 1988). Kivételek ebben az esetben is vannak (Matte és Forsberg 1992, Filho és munkatársai 1993), viszont az endoxilanázoknak így is több mint 70%-ára érvényes ez a megállapítás.

A xilanázok a hidrolízis során általában a szubsztituálatlan xilán régiókat részesítik előnyben. Ennek oka elsősorban abban keresendő, hogy a kapcsolódó szubsztituensek sztérikusan gátolják a megfelelő enzim-szubsztrát komplex kialakulását, amelynek köszönhetően az enzim kevésbé hatékonyan tudja kifejteni az aktivitását. Ezt igazolják azok a tények is, amelyek szerint az elágazásokat valamint a szubsztituenseket eltávolító enzimek jelenléte fokozza az endoxilanázok aktivitását azáltal, hogy egyre több szubsztrátként potenciálisan elfogadható régiót hoznak létre az alapláncon, ennek köszönhetően a hidrolízis hatékonyságát növelni tudják. Természetesen leírtak már olyan enzimeket is, amelyeknél kifejezetten szükség van bizonyos szubsztituensek jelenlétére ahhoz, hogy a xilánvázat hidrolizálni tudják, pl. a *Bacillus subtilis*-ből izolált xilanáz csak glükuronsav oldallánc

mellett hidrolizál (Nishitani és Nevins 1991). Ezeknél az eseteknél azt feltételezik, hogy az oldallánc képes az enzim aktív centrumába specifikusan kötődni, amelynek köszönhetően a hasítást végző aminosav oldalláncok felé orientálja a hidrolizálni kívánt kötést.

Az utóbbi időben egyre nagyobb és nagyobb érdeklődés mutatkozott a különböző endoxilanázok iránt az ipar különböző területeiről. Ez ma már odáig jutott, hogy a világon kereskedelmi forgalomba hozott ipari enzimek kb. 20 %-át teszik ki a xilanázok, cellulázok valamint pektinázok, ami mutatja ezen enzimek egyre növekvő ipari jelentőségét. Manapság a leggyakoribb forrásai az ipari endoxilanázoknak az *Aspergillus niger*, *Trichoderma sp.* és a *Humicola insolens*. Valamikor az 1980-as években kezdték el ezeket az enzimeket alkalmazni, először az állatok takarmányozásánál később pedig az élelmiszer, papír és textil iparokban. Ma már azonban igen széles körben elterjedt a sütőipari, borászati, söripari, textilipari és gyógyszeripari alkalmazásuk, valamint egyre nagyobb szerepet kezdenek játszani a bioüzemanyagok előállításában is (Polizeli és munkatársai 2005, Butt és munkatársai 2008, Knob és munkatársai 2010, Battan és munkatársai 2012, Du és munkatársai 2013).

b) xilán 1,4- β -xilozidázok

Tekintve, hogy a vizsgálataink tárgyát ezen enzimescsoport egyik tagja képezi, így ezeket a későbbiek során fogom részletesen tárgyalni.

c) α -L-arabinofuranozidázok

Mivel a xilánok túlnyomó többsége rendelkezik L-arabinozil oldallánccal, így ezen oldalláncokat hasító enzimek igen gyakoriak a xilanázok mellett és nagy jelentőséggel rendelkeznek. Leggyakrabban monomer formában fordulnak elő, de ismertté váltak már di-, tetra-, hexa- és oktamer változatban is (Sunna és Antranikian 1997). A legnagyobb, ismert molekulatömegűek az 500 kDa-t is elérhetik (Komae és munkatársai 1982). Izoelektromos pontjuk 2.5 és 9.3 között változhat, de többségükben savas karakterű enzimekről van szó (Sunna és Antranikian 1997). A főláncban, a xilopiranozil egységekről, mind a 2-es, mind pedig a 3-as helyzetben található arabinofuranozil oldalláncokat képesek lehasítani. Az *Aspergillus niger*-ből izolált enzim esetében például azt állapították meg, hogy először az 1,3 kötéseket hasítja, és majd később kezdi el az 1,2 kötéseket hasítani, amelynek valószínűsíthetően sztérikus okai lehetnek (Kaji és Tagawa 1970). Természetes szubsztrátjaik az α -L-arabinnal szubsztituált xilo-oligoszacharidok, mindezek mellett a mesterséges *p*-Nitrofenil- α -L-arabinofuranozidot (*p*NP-Araf) is képesek hidrolizálni.

Szubsztrátspecifitásuk alapján két csoportra oszthatók (Sunna és Antranikian 1997):

1. exo-típusú α -L-arabinofuranozidázok (EC 3.2.1.55), amelyek az elágazó arabinánokat és a *p*NP-Araf-ot is képesek hidrolizálni. Ide tartozik az arabinofuranozidázok többsége (Dekker és Richards 1976).
2. Arabinán endo-1,5- α -L-arabinanáz (EC 3.2.1.99), amelyek a xilanázokhoz hasonlóan, csak a lineáris arabinánokat képesek hidrolizálni. Ilyen enzimeket izoláltak már pl.: *Bacillus subtilis*-ből (Kaji és Saheki 1975), *Trichoderma reesei*-ből (Poutanen és munkatársai 1988), *Aspergillus niger*-ből (Kaneko és munkatársai 1993), *Bacillus thermodenitrificans*-ből (Takao és munkatársai 2002) *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (Hong és munkatársai 2009).

Fontos azonban megemlíteni, hogy az arabinázok szubsztrátspecifitása ennél jóval összetettebb képet mutat, így a fenti két csoport további számos csoportra osztható (Coughlan és Hazlewood 1993a).

d) α -glükuronidázok

Az α -glükuronidázok (EC 3.2.1.139) a xilán váz xilóz egységeihez, α -1,2 kötéssel kapcsolódó, 4-*O*-metil- α -D-glükuronopiranozil oldalláncokat hidrolizálják. Ezen enzimek létezését legelőször 1986-ban írták le (Puls és munkatársai 1986). Ennek oka, leginkább a megfelelő szubsztrátok hiányára vezethető vissza. Az α -glükuronidázok szubsztrátspecifitása enzimforrásonként változó lehet. Például az *Agaricus bisporus*-ból izolált α -glükuronidáz csak az alacsony polimerizáció fokú (DP 2-6) xilo-oligomerekhez kapcsolódó 4-*O*-metil- α -D-glükuronopiranozil csoportokat képes lehasítani (Puls és munkatársai 1987). Ezzel szemben az *Aspergillus niger*-ből és a *Schizophyllum commune*-ből izolált α -glükuronidáz a 4-*O*-metilglükuronoxilánból is képesek 4-*O*-metil- α -D-glükuronopiranozil csoportokat hidrolizálni (Johnson és munkatársai 1989). Azt is megállapították, hogy az acetilcsoportok közelsége a glükuronopiranozil csoportokhoz, részlegesen gátolhatja α -glükuronidáz aktivitást (Tenkanen és Siika-aho 2000).

e) Acetilxilán észterázok

Az acetilxilán észterázok (EC 3.1.1.72) a xilóz egységekhez kapcsolódó acetilcsoportok eltávolításáért felelnek, javítva ez által az endoxilanázok sztérikus hozzáférését a főlánchoz. Hasonlóan az α -glükuronidázokhoz, ezen enzimeket szintén, viszonylag később fedezték fel (Biely és munkatársai 1985). Kései felfedezésük oka összetett, egyrészt korábban nem álltak rendelkezésre a vizsgálatukhoz szükséges megfelelő

szubsztrátok, másrészt pedig azelőtt a xilánokat többnyire lúgos extrakcióval nyerték. Ennek következtében viszont, a nagymértékben acetilezett poliszacharidok teljes mértékben dezacetileződtek, így mivel ezen enzimek nem fejthették ki aktivitásukat, jelenlétük rejtve maradt. Az acetilezett xilo-oligoszacharidok a legalkalmasabb szubsztrátjaik, de a legtöbb esetben az acetilxilán vázból is képesek acetátot felszabadítani (Biely és munkatársai 1986, Blum és munkatársai 1999, Caufrier és munkatársai 2003).

Korábban már több közleményben is leírták az acetilxilán észterázok és az endoxilanázok között működő szinergikus kapcsolatot (Biely és munkatársai 1986, 1988, Puotanen és munkatársai 1990). Az acetilxilán észterázok ugyanis, együttműködve az endoxilanázokkal, az azok számára sztérikus gátat jelentő acetilcsoportokat lehasítják a főláncról. Ezzel segítik elő azt, hogy az endoxilanázok a xilán főláncot hatékonyabban bontsák, aminek következtében az endoxilanázok által felszabadított, rövidebb láncú, és ezáltal az acetilxilán észterázok számára megfelelőbb szubsztrátok keletkeznek. Ez is egy kiváló bizonyítéka annak, hogy az egyik enzim működése megkönnyíti egy másik enzim működését, majd pedig ez pozitívan hat vissza az első enzim működésére.

f) Ferulsav és *p*-kumársav észterázok

A ferulsav és *p*-kumársav észterázok (EC 3.1.1.73) a xilán oldalláncainak észter kötéseit hasítják, amelyek az L-arabinozil csoporton keresztül kapcsolódnak a főlánchoz (1. ábra) (Christov and Prior 1993, Williamson és munkatársai 1998, Crepin és munkatársai 2004).

A pázsitfűfélék (*Gramineae*) arabinoxilánjainak L-arabinozil oldalláncjaihoz, gyakran a ferulsav valamint a *p*-kumársav *transz* izomerjei kapcsolódnak észter kötéssel (Mueller-Harvey és munkatársai 1986). Ebben a kötött formában a xilánláncok ill. a xilán és a ligninláncok között kialakuló bonyolult hálózat kialakításáért felelnek. Szabad formában viszont, a növényi növekedés szabályozásában játszanak kulcsszerepet. A ferulsav az indolecetsav-oxidáz inhibitora, ezzel szemben a *p*-kumársav az indolecetsav-oxidáz aktivátora. Ezeket az anyagokat úgynevezett másodlagos növényi hormonoknak is nevezik, és ezek felszabadításában vesznek részt ezek az enzimek, ezáltal közvetve befolyásolva a növény növekedését. Hasonlóan a már korábban leírt enzimek egy részéhez, ezeket is viszonylag későn fedezték fel (Mackenzie és munkatársai 1988). Felfedezésük óta azonban számos gomba, valamint bakteriális eredetű ferulsav észterázot azonosítottak és vizsgáltak: *Streptomyces* C254, *Streptomyces* C248, *Streptomyces olivochromogenes* NRCC 2258 (Johnson és munkatársai 1989), *Streptomyces avermitilis* UAH30 (Garcia és munkatársai

1998) *Aureobasidium pullulans* NRRLY 23311-1 (Rumbold és munkatársai 2003) *Sporotrichum thermophile* (Vafiadi és munkatársai 2005, Topakas és munkatársai 2006).

2.3. A xilán 1,4- β -xilozidázok

2.3.1. Általános jellemzés

A xilán 1,4- β -xilozidázok (EC 3.2.1.37) a xilo-oligoszacharidok hidrolízisét végzik – az 1,4- β -D-xilozidos kötés hasításával – a nem redukáló vég felől, xilózt felszabadítva termékként. Biely és munkatársai szerint (1985, 1993) azonban a xilán 1,4- β -xilozidázokon belül meg lehet különböztetni xilobiázokat valamint exo-1,4- β -D-xilanázokat attól függően, hogy kizárólag xilobiózt, vagy pedig a xilobióznál nagyobb polimerizáció fokú oligomereket is elfogadnak esetleg szubsztrátként. Az eddig izolált xilán 1,4- β -xilozidázok nem képesek a xilánt hidrolizálni, csak a kisebb tagszámú xilo-oligomereket, ezek közül is a legjobb szubsztrátjuk a xilobióz, és affinitásuk az egyes oligomerekhez azok polimerizáció fokával fordítottan arányos. A xilán 1,4- β -xilozidázok nemcsak a xilo-oligoszacharidok hidrolízisére képesek, hanem a szintetikus eredetű xilozid-származékok hidrolízisére is, mint pl. az igen általánosan elterjedt p-Nitrofenil-(pNP-Xyl) és o-Nitrofenil- β -D-xilopiranozid (oNP-Xyl) (Coughlan és Hazlewood 1993a). Vannak viszont olyan xilozidáz enzimek is, amelyek az 1,3- β -D-, illetve olyanok, amelyek 1,4- α -D-xilozidos kötést is képesek hidrolizálni, ám ezek mind arányaikban, mind jelentőségükben elmaradnak a 1,4- β -D-xilozidos kötések hidrolizáló társaikhoz képest. Előbbiek a β -1,3- kötést tartalmazó xilánok lebontásában, utóbbiak pedig a xiloglükánok xilóz tartalmú oldalláncainak hasításában vesznek részt (Zong és munkatársai 1988, Zong és Yashui 1989).

A xilán 1,4- β -xilozidázok ipari jelentőségét illetően elmondható, hogy igen csak fontos szerepet játszanak az olyan termékek előállításában, amelyeknél szükséges a xilánváz, xilóz egységekre történő teljes lebontása. Ilyen termékek például a xilitol, amely mint nem karcinogén édesítőszer, jelentős a cukorbeteg és a kóros elhízással küzdők ételmezésében. Ezen felül a xilitolnak fontos szerepe van a fogszuvasodás, a csontritkulás, a különböző légzőszervi fertőzések, a lipid metabolizmusbeli rendellenességek, valamint a vesekárosodás megelőzésében. Napjainkban pedig egyre az inkább előtérbe kerülő energetikai problémák kezelésének egyik módja lehet a bioetanol előállítása is, amelynek egyik legjelentősebb bázisa éppen a xilóz alapú bioetanol gyártás lehet (Polizeli és munkatársai 2005).

2.3.1.1. Xilán 1,4- β -xilozidázok előfordulása

A xilán 1,4- β -xilozidázok igen széleskörűen elterjedtek mind a baktériumok (*Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium celluloliticum*, *Thermoanaerobacter saccharoliticum*), mind a gombák (*Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium wortmanni*) (Coughlan és Hazlewood 1993a, Sunna és Antranikian 1997, Polizeli és munkatársai 2005, Knob és munkatársai 2010), mind pedig a növények körében [cukornád – *Saccharum officinarum* (Chinen és munkatársai 1982), hegyi juhar – *Acer pseudoplatanus* L. (Tezuka és munkatársai 1993), árpa – *Hordeum vulgare* (Lee és munkatársai 2003)].

Elterjedésüket mutatja az is, hogy jelenlétüket állati szervezetekből is kimutatták, úgy mint csiga (*Charonia lampas*) májában (Fukuda és munkatársai 1969), sertés és patkány vesében (Robinson és Abrahams 1967, Patel és Tappel 1969) valamint eger májában (Stephens és munkatársai 1979). Mindezekon felül a xilán 1,4- β -xilozidázok jelenlétét és jelentőségét a humán szervezetben is sikerült számos alkalommal igazolni, úgymint a szisztémás *lupus erythematosus*-ban szenvedő betegek vérszérumában is kimutattak már xilán 1,4- β -xilozidáz aktivitást (Olczyk és munkatársai 1984), illetve a Gaucher-kór 3-as típusában szenvedő betegek májában, valamint veséjében jelentős mértékű xilán 1,4- β -xilozidáz aktivitás csökkenést regisztráltak (Chiao és munkatársai 1978).

A bakteriális, valamint élesztő eredetű xilán 1,4- β -xilozidázok általában sejfalhoz kötötten, vagy a sejten belül a citoszolban fordulnak elő. A fonalas gombákból izolált enzimek esetében azonban a micéliumok növekedésének kezdeti szakaszában a sejthez kötötten találhatóak, míg a későbbi időszakban sejten kívülre kerülve (extracellulárisan) leletők fel (Biely 1985, Yamamoto és munkatársai 2000).

A nem-cellulolitikus baktériumok és gombák esetében figyelték meg, hogy a xilanolitikus enzimek szintézise – amelybe a xilán 1,4- β -xilozidázok is beletartoznak – xilánon növesztve jelentős mértékben megerősödik, vagyis ezen enzimek termelődése indukálható. Amennyiben viszont gyorsan metabolizálható szénforrást adunk a sejteknek (xilóz vagy glükóz) akkor az katabolit repressziót fog eredményezni (Biely 1985).

2.3.1.2. A xilán 1,4- β -xilozidázok általános biokémiai jellemzői

A xilán 1,4- β -xilozidázok az esetek többségében monomer vagy dimer formában fordulnak elő, de GH43-as családba tartozó enzimek esetén leírtak már tetramer szerkezetet is (Brüx és munkatársai 2006, Brunzelle és munkatársai 2008). Savas karakterű fehérjék (pI=3,3-7,3), molekulatömegük pedig 60-360 kDa között változik. (Coughlan és Hazlewood

1993a, Sunna és Antranikian 1997). A hőmérséklet optimumuk 40 és 80 °C között változik, de a legtöbb enzim 60 °C-on mutatta a legnagyobb aktivitást. Erre egy jó példa, az *Aspergillus phoenicis* által termelt xilán 1,4- β -xilozidáz, amelynek még 4 óra 60 °C-on történő inkubálás után is megmarad a teljes aktivitása, vagy 21 óra után szobahőmérsékleten (Rizatti és munkatársai 2001). Kivételként jelenik meg például a *Talarimyces emersonii* xilán 1,4- β -xilozidáza, amelynek izoelektromos pontja 8.9 (Tuohy és munkatársai 1993) illetve a *Pichia stipitis* által termelt 34 kDa molekulatömegű xilán 1,4- β -xilozidáz is (Öczan és munkatársai 1991).

Természetes szubsztrátjaik közül a xilobiózt hasítják a legnagyobb hatékonysággal, és ahogy a szubsztrátok polimerizációfoka nő, úgy csökken a hasítás hatékonysága is (Rodinova és munkatársai 1983). Általában a xilo-heptaóznál hosszabb szubsztrátokat képtelenek szubsztrátjukként elfogadni így nem csoda, hogy a xilánnal szemben hatástalanok (Herrmann és munkatársai 1997).

Ez összhangban van azzal, hogy a xilán 1,4- β -xilozidázok kiválóan egészítik ki az endoxilanázok működését azáltal, hogy a xilóz egységek lehasításával rövidítik az endoxilanázok működését gátló xilooligoszacharidokat, így azok, az előbbieik alapján (a lánchosszúság csökkenésével), egyre kedvezőbb szubsztrátjai lesznek a xilán 1,4- β -xilozidázoknak (Sunna és Antranikian 1997, Rodinova és munkatársai 1983, Dekker és Richards 1976). Így elmondható, hogy a xilán 1,4- β -xilozidázok és az endoxilanázok együttműködése a xilán alapváz teljes mértékű hidrolízisét eredményezi, mint ahogy erről a *Bacillus stearothermophilus*-ből izolált enzimek esetén már beszámoltak (Nanmori és munkatársai 1990).

A xilán 1,4- β -xilozidázok specifitását jelentősen befolyásolja a szubsztrátjaik szubsztituáltsága is. Amennyiben a nem-redukáló végén a molekulának olyan xilóz egység található, amely szubsztituált, akkor az enzim – sztérikus okok miatt – nem képes az 1,4- β -D-xilozidos kötéseket hidrolizálni (Poutanen és munkatársai 1990, Tenkanen és munkatársai 1996). Amennyiben a nem-redukáló vég felőli xilóz egység előtti xilóz egység szubsztituált akkor, ha 1,2-kötéssel kapcsolódik valamilyen szubsztituens (pl.: 4-*O*-metil- α -D-glükuronopiranozil csoport), abban az esetben végbemegy a hidrolízis, amennyiben viszont a 1,3-kötéssel kapcsolódik a szubsztituens ugyanezen xilóz egységhez (pl. α -L-arabinofuranozil csoport) abban az esetben nem történik hidrolízis (Tenkanen és munkatársai 1996). Abban az esetben, ha legalább 2 xilóz egység szubsztituátlan a nem-redukáló végén, az már megfelelő távolságot biztosít az aktív centrumtól ahhoz, hogy a szubsztituensek –

helyzetüktől függetlenül – sztérikusan ne gátolják a szubsztrát megfelelő kötődését az enzimhez, és ez által az utolsó xilóz egység lehasítását (Kormelink és munkatársai 1993).

Amint az a fentiekből is kitűnik, a szubsztrátokhoz kapcsolódó szubsztituensek helyzete és nem a kémiai jellege a meghatározó a hidrolízis szempontjából. Ez összességében arra utal, hogy a kapcsolódó szubsztituensek sztérikusan gátolják a megfelelő enzim-szubsztrát komplex kialakulását, és ez által a hidrolízist.

Ezek alapján már érthető, hogy miért van szükség a heteroxilánok teljes hidrolíziséhez segédenzimek jelenlétére, vagy pedig szélesebb szubsztrátspecifitású enzimekre. Ez utóbbiakra jelentenek példát a xilán 1,4- β -xilozidázok, mivel ezen enzimek egy része rendelkezik α -L-arabinozidáz aktivitással is tovább növelve a heteroxilánok enzimatisz hidrolízisének hatékonyságát (Delenyn és munkatársai 1978, Poutanen és Puls 1988, Saxena és munkatársai 1995, Kiss és Kiss 2000).

2.3.2. A xilán 1,4- β -xilozidázok működési mechanizmusa

A xilán 1,4- β -xilozidázok, az O-glikozid hidrolázok (EC 3.2.1.-) népes csoportjához tartoznak, ennek megfelelően a működési mechanizmusuk feltérképezésénél, a glikozid hidrolázoknál általánosan érvényes megállapításokat vettük alapul.

2.3.2.1. A glikozid-hidrolázok működési mechanizmusának általános áttekintése

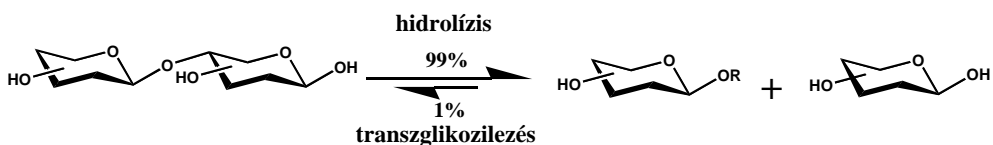
A biológiai szempontból jelentős szénhidrátszármazékok felépítésében és lebontásában alapvető fontossággal bír a glikozidos kötések kialakítása, valamint hasítása. A természetben, ezek a folyamatok a *glikozil-transzferázok* illetve *glikozid-hidrolázok* (*glikozidázok*) hatékony közreműködésének révén játszódnak le. Kémiai értelemben ezek a folyamatok a cukrok anomer szénatomján lejátszódó nukleofil szubsztitúciós reakciókat jelentik, amelyek végbemehetnek az anomer centrum konfigurációjának megváltozásával (*inverzió*) valamint megtartásával (*retenció*) (Sinnott 1987).

Ezek alapján megkülönböztetünk *retenciós* valamint *inverziós* működési mechanizmussal hasító enzimeket.

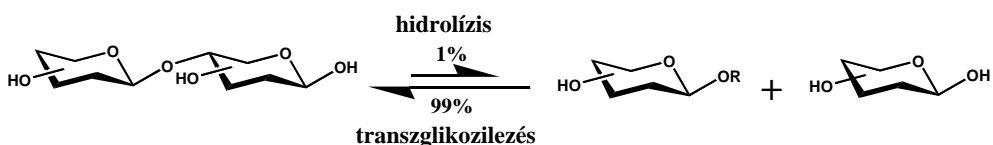
Míg a retenciós mechanizmusnál, egy kettős szubsztitúciós folyamat formájában történik meg a hidrolízis (kettős inverzió), addig az inverziós mechanizmus esetében egyetlen koncentrált lépésben zajlik le ugyanez a folyamat. A glikozidázok és a glikozil-transzferázok működési mechanizmusa sokban hasonlít, mivel maga a glikozidos kötés hidrolízise illetve kialakulása egy egyensúlyi folyamatnak következménye az élő szervezetben (2. ábra). A különbség lényegében csak abban van, hogy melyik enzim melyik irányba tolja el az előbb

említett egyensúlyt. Ugyanis a glikozidáz enzimekről köztudott, hogy képesek megfelelő akceptorokra glikozil csoportot átvenni, és a glikozil-transzferázok esetében is közismert az a tény, hogy rendelkeznek minimális hidrolitikus aktivitással.

a)

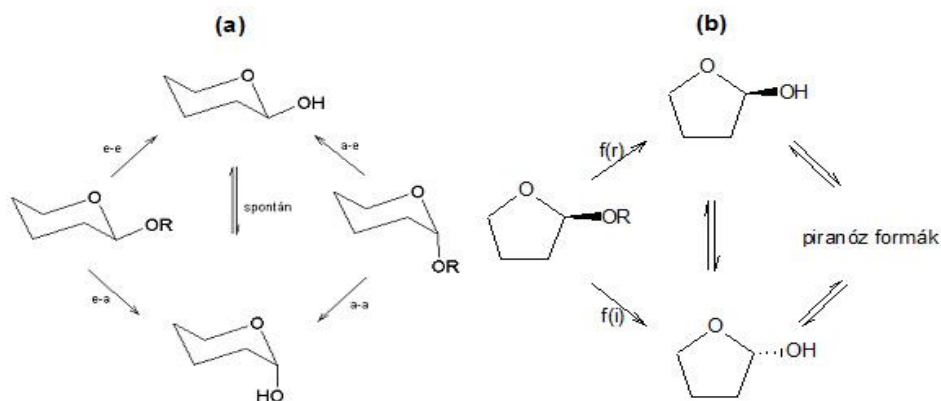


b)



2. ábra. A (a) glikozid hidrolázok és a (b) glikozil-transzferázok által katalizált reakciók egyensúlyi viszonyai.

A sztereokémiai szempontokon túl a glikozidázok csoportosíthatók még aszerint is, hogy furanozid vagy piranozid gyűrűt fogadnak-e el szubsztrátként. Ennek megfelelően megkülönböztetünk glikopiranozidázokat és glikofuranozidázokat. Ezen felül az is egy csoportosítási szempont, hogy piranozid illetve furanozid gyűrű esetében a keletkező termék anomer centruma axiális (a) vagy ekvatoriális (e) konfigurációjú. Ezek alapján hatféle glikozidázt különböztethetünk meg: $e \rightarrow e$, $a \rightarrow a$, $e \rightarrow a$, $a \rightarrow e$, $f(r)$, $f(i)$ (3a. és 3b. ábra). A retenciós ($e \rightarrow e$) enzimek egyik csoportjába sorolható pl. a lizozim, a β -glükozidázok jelentős része, illetve a fungális β -xilozidázok többsége, valamint a bakteriális β -mannozidázok jelentős része. A retenciós enzimek másik csoportjába ($a \rightarrow a$) tartoznak pl.: az α -amilázok, α -mannozidázok, α -glükozidázok és az α -galaktozidázok. Az inverziós enzimek közé ($e \rightarrow a$) a növényi β -mannozidázok és több bakteriális β -xilozidáz tartozik. Az inverziós enzimek ($a \rightarrow e$) másik csoportjára jó példaként szolgálnak a β -amilázok, a glükóamilázok illetve az α, α -trehaláz (Sinnott 1987, www.cazy.org).



3. ábra. (a) a glikopiranozidáz enzimek csoportosítása a szénhidrát rész anomer konfigurációjának hidrolízis során való alakulása szerint. **a**: axiális, **e**: ekvatoriális glikozidos hidroxil-csoport. Az **a-e**, **e-a** enzimek invertálók, az **a-a**, **e-e** enzimek retenciósak (Kiss T. Ph.D. értekezés 2002). (b) A glikofuranozidáz enzimek csoportosítása a szénhidrát rész anomer konfigurációjának a hidrolízis során való alakulása szerint. Az $f(i)$ enzimek invertálóak, az $f(r)$ enzimek retenciósak (Kiss T. Ph.D. értekezés 2002).

A glikozid hidrolázok hatásmechanizmusa már elég régóta foglalkoztatja a kutatókat, ezt támasztja alá az is, hogy az első publikált elmélet 1953-ra tehető, amely Koshland nevéhez fűződik (Koshland 1953). Ez az elmélet, néhány módosítástól eltekintve, lényegében napjainkig az alapját képezi a glikozidázok hatásmechanizmusát leíró legelfogadottabb elméleteknek. A karboxilcsoportok esetleges részvételére a hidrolízisben, először 1963-ban állítottak modellt (Capon 1963). A hidrolitikus folyamat még pontosabb megértésének irányába mutatott az is, amikor 1966-67-ben Philips és munkatársai a tojásfehérjében található lizozim egy kompetitív inhibitorral kristályosított komplexének a szerkezetét megfejtették (Philips 1966, Blake és munkatársai 1967). Ezekben a munkákban a szerzők megállapították, hogy a hasítandó kötés közvetlen környezetében két katalitikusan aktív karboxil oldallánc helyezkedik el, és játszik meghatározó szerepet. Ezek közül az egyik katalitikus sav/bázisként, míg a másik katalitikus nukleofilként játszik szerepet. A katalitikus sav/bázis protonálja az aglikon oxigén atomját, ezáltal elősegítve annak távozását, a katalitikus nukleofil viszont stabilizálja az aglikon távozása után visszamaradt glikozilium iont, amely nem más, mint egy speciális karbokation. Ez a megállapítás azóta az $e \rightarrow e$ enzimek működésének paradigmájává vált.

A későbbi vizsgálatok, amelyek már nem is olyan régen láttak napvilágot, egyértelműen igazolták, hogy ez a speciális karbokation – ami nem más mint egy oxokarbénium ion – ilyen anionos nukleofil környezetben nem is létezhet, ennek megfelelően egy kémiaiilag stabilabb – oxokarbénium ion típusú átmeneti állapoton keresztül – glikozil-enzim kovalens kötést

tartalmazó közti termék kell, hogy kialakuljon (Vocadlo és munkatársai 2001, Zechel és Withers 2000).

Mindezek mellett a mai napig más meghatározó munkák is hozzájárultak ahhoz, hogy a glikozidázok mechanizmus alapú kutatásai újabb lendületet kapjanak (Miao és munkatársai 1994, Ziser és munkatársai 1995, McCarter és Withers 1996, He és Withers 1997, Williams és munkatársai 2006). Az utóbbi időben megjelenő számos közlemény is alátámasztja ennek a területnek a jelentőségét (Withers 1999, 2000, Rye és Withers 2000, 2002, 2006, Joshi és munkatársai 2000, Kiss és munkatársai 2002, Lairson és munkatársai 2004, 2007, 2008, Zechel és Withers 2000, 2001, Offen és munkatársai 2009).

Az *inverziós* mechanizmus főbb lépései a 4a. ábán látható. Itt, amint arról már korábban szó esett, egyetlen koncentrált lépésben történik a hidrolízis. Ennek pedig az a lényege, hogy a katalitikus nukleofil (deprotonált) a vízmolekula anomer centrum irányába történő támadását segíti elő azáltal, hogy lazítja annak egyik protonját, növelve ez által a víz oxigén atomjának nukleofilítását. Ezzel egy időben az aglikon felől a katalitikus sav/bázis (protonált) parciálisan protonálja az aglikon oxigén atomját, lazítja a kötést a glikozidos oxigén és az anomer szén atom között, amely együttesen hatva a vízmolekula támadásával járó új kötés kialakulással – oxokarbénium ion jellegű átmeneti állapoton keresztül – a glikozidos kötés elhasadását fogja eredményezni.

A *retenciós* mechanizmus főbb lépései (4b. ábra): amint arról korábban már szintén szó esett, ennél a reakciótípusnál kettős szubsztitúció játszódik le, és ennek következtében itt számolnunk kell egy köztitermék kialakulásával is, a már korábban leírt hatások miatt.

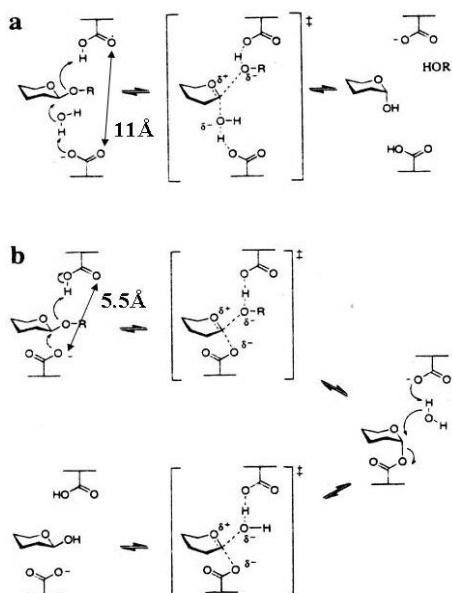
1. Az enzim aktív centrumában a katalitikus sav/bázis (protonált) parciálisan protonálja az aglikon oxigén atomját ez által aktiválva azt.
2. Eközben a katalitikus nukleofil (deprotonált) a piranóz gyűrű síkjának ellentétes oldaláról nukleofil támadást intéz az anomer centrum ellen és – oxokarbénium ion jellegű átmeneti állapoton keresztül – egy kovalens glikozil-enzim köztiterméket alakít ki, amely azonban nagyon instabil tekintve, hogy ez egy félacetálnak az enzim karboxilcsoportjával kialakított észtere.
3. Ezzel egy időben az aglikon teljes mértékben leválik az anomer centrumról, így megszüntetve a korábban létező glikozidos kötést, lehetővé téve az egyik termék (cukor vagy alkohol) felszabadulását.
4. Az aglikon távozása után, a katalitikus sav/bázis oldaláról egy vízmolekula közelíti meg az anomer centrumot.

5. Ekkor a katalitikus bázis parciálisan deprotonálja a vízmolekulát, miáltal erősíti a víz oxigén atomjának nukleofilitását, az anomer centrum irányába történő támadáshoz. Ennek a folyamatnak a következtében – egy oxokarbénium ion jellegű átmeneti állapoton keresztül – a glikozil-enzim köztitermék elhasad, lehetővé téve a másik (cukor) termék felszabadulását.

A reakció során a lejátszódó kettős inverzió eredményezi az anomer konfiguráció megmaradását (*retenció*) (Heightman és Vasella 1999). Az első sav katalizált folyamat az enzim szempontjából a glikozilezési lépés, míg a másik bázis katalizált folyamat az enzim szempontjából a deglikozielzési lépés (Withers 1999).

Azt, hogy az adott glikozid hidroláz enzim melyik mechanizmus szerint hidrolizálja a szubsztrátot, azt az aktív centrumban található katalitikus aminosav oldalláncok közti távolság határozza meg.

Ennek megfelelően, azok az enzimek amelyeknél ez a távolság kb. 5.5 Å, azok a retenciós mechanizmus szerint hasítanak, míg azok az enzimek, amelyeknél ez kb. 11 Å, azok az inverziós mechanizmus szerint bontanak. Ennek a távolság különbségnek tulajdonítják azt, hogy míg az inverziós enzimek esetében a vízmolekula képes odaférni a távozó csoporttal egy időben az anomer centrumhoz, addig a retenciós enzimek esetében ez sztérikusan gátolt a szűkebb hely miatt (Withers 1999, 2001).



4. ábra. Az (a) inverziós és (b) retenciós glikozidáz enzimek működési mechanizmusa (Zechel és Withers 2000).

Ezekon felül ismert még két másik glikozidáz mechanizmus, amelyek az imént tárgyalt inverziós és retenciós mechanizmusoknak sajátos változatai.

Az egyik ilyen mechanizmus típus esetében a reakció során szintén kettős szubsztitúció játszódik le, hasonlóan a retenciós mechanizmusnál tárgyalt módhoz, azonban ebben az esetben a katalitikus nukleofil szerepét nem egy enzimhez tartozó karboxilát csoport, hanem egy molekulán belüli acetamid csoport oxigénje játsza (Knapp és munkatársai 1996, Mark és munkatársai 2001, Macauley és munkatársai 2005). Ez a fajta mechanizmus a 18, 20, 56, 84 és 85 glikozid hidroláz családokra jellemző.

A 4 és 109 glikozid hidroláz családok esetében pedig egy különleges NADH függő addíciós-eliminációs reakció játszódik le (Yip és Withers 2006).

Mivel azonban az általam részletesen vizsgált xilán 1,4- β -xilozidáz enzim nem tartozik egyik ilyen különleges mechanizmus szerint hasító, korábban felsorolt enzim családba sem, így ezen mechanizmusok részletesebb tárgyalásától, e dolgozat keretein belül, eltekintek.

2.3.1.2. A glikozid-hidrolázok működési mechanizmusának felderítésére szolgáló módszerek

A glikozid-hidrolázok hatásmechanizmusát addig nem lehet megérteni, amíg nem tudjuk, hogy milyen az aktív centrum felépítése (topológiája) és kémiai összetétele vagyis, hogy milyen kémiai természetű aminosavak alkotják és azok milyen térbeli elrendeződést vesznek fel a reakció során. Ennek pontos meghatározása igen bonyolult és nagy kihívást jelentő feladat, amelynek során különböző kémiai és fizikai módszereket vesznek igénybe.

A fizikai módszerek általában valamilyen szerkezetvizsgáló technikát jelentenek, mint pl.: röntgenkrisztallográfiát, NMR-t, tömegspektrometriai módszereket stb.

Kémiai módszereken a különböző szubsztrátokkal, reverzibilis és irreverzibilis inhibitorokkal (inaktivátorokkal) végzett kinetikai méréseket értjük. Ezek sok esetben kombinálhatók a már előbb felsorolt fizikai módszerekkel.

Az alábbiakban ezen módszereket fogom részletesebben ismertetni.

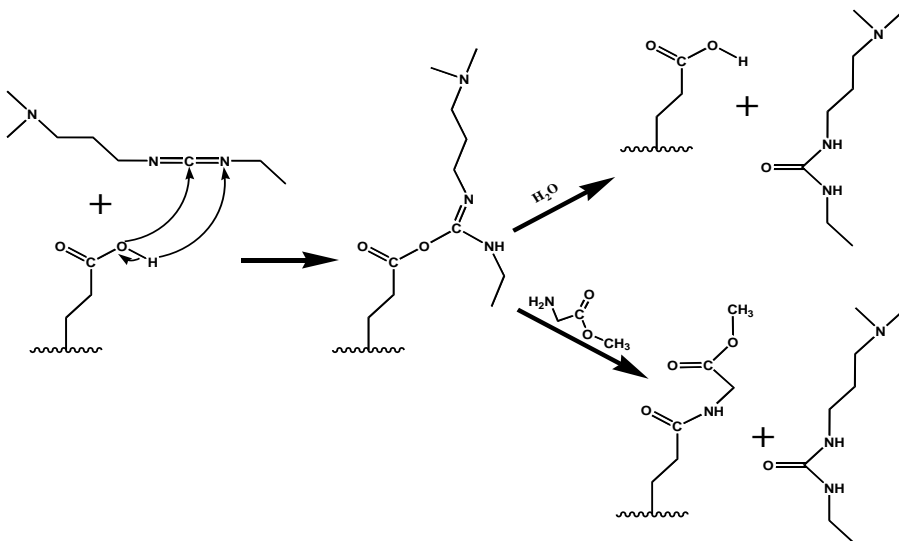
1. A legpontosabb és egyben szerkezeti információkat is szolgáltató módszer a röntgenkrisztallográfia. Ennek során mind a szabad enzimről, mind az enzim-szubsztrát (ES), mind pedig az enzim-inhibitor (EI) komplex szerkezeti viszonyairól nyerhetők közvetlen információk. Az ilyen irányú kutatásokat a már korábban említett Philips és munkatársai indították el a lizozimra vonatkozóan (Philips 1966, Blake és munkatársai 1967). A módszer nehézsége és komplexitása abban volt, hogy a fehérje egykristály előállítása igen bonyolult és abban az időben ez még egy kevésbé felderített terület volt. Ebből következően igen sok idő telt el addig, amíg ez a módszer szélesebb körben el

tudott terjedni, és 1992-ig további 10 glikozidáz enzim szerkezetét fejtették meg (Legler 1993). Habár mára már sokkal szélesebb körben alkalmazott technika a röntgenkristallográfia, az enzimek aktív centrumának szerkezet-felderítésére mégis még a mai napig sem ez a leggyakrabban alkalmazott módszer. Napjainkig azonban, ipari jelentőségükből adódóan, több xilanáz enzim kristályszerkezetét fejtették már meg (Torronen és munkatársai 1994, Wakarchuk és munkatársai 1994, Krengel és Dijkstra 1996, Watanabe és munkatársai 2006, St John és munkatársai 2009). A xilán 1,4- β -xilozidázok szerkezetének felderítése csak az utóbbi időben kapott egyre nagyobb teret, szintén az egyre erősödő ipari érdeklődés miatt, főleg a xilitol gyártás illetve a bioetanol gyártás kapcsán (Yang és munkatársai 2002, Czjzek és munkatársai 2004, Brűx és munkatársai 2006, Brunzelle és munkatársai 2008). A legutóbbi időkben pedig egyre jelentősebb szerephez jutnak a különféle NMR technikák is, amelyekkel oldat fázisban lehet az enzimreakciókat *in situ* nyomon követni, ezáltal a mechanizmusra, és az abban kulcs szerepet játszó (mind a katalízisben, mind a szubsztrát megkötésében) aminosavakra következtetni (Saxena és munkatársai 1995, Weimar és munkatársai 2000, Viegas és munkatársai 2008).

2. Mivel a hidrolízisben ionizálható oldalláncok vesznek részt ezért a pH jelentős mértékben befolyásolja azt, hogy ezen aminosavak milyen mértékben képesek részt venni a hidrolitikus folyamatban, ezáltal pedig hatással van az enzim aktivitására. Ebből adódóan, az enzimreakciók kinetikájának pH függését tanulmányozó vizsgálatok ugyancsak értékes információkkal szolgálhatnak, hiszen általuk meghatározhatóak a katalitikus folyamatban résztvevő aminosav oldalláncok pK_a értékei. Ilyen típusú kísérletek mutattak rá arra, hogy a *Bacillus pumilus* xilán 1,4- β -xilozidáza esetében, a hidrolitikus folyamatban résztvevő egyik aminosav (a katalitikus sav/bázis) pK -ja egy cisztein disszociációs állandójához esik közel, tehát joggal feltételezték, hogy az aktív centrumban egy cisztein szulfhidril csoportja játsza a proton donor szerepét. Ezt a feltevést később, további inaktivációs vizsgálatokkal igazolni tudták (Kerstens-Hilderson és munkatársai 1984). A *Trichoderma reesei*-ből izolált xilán 1,4- β -xilozidáz esetében viszont a pH függés egyértelműen előre jelezte, hogy 2 karboxil típusú aminosav oldallánc vesz részt a katalitikus folyamatban, amelyik közül az egyik protonált formában ($pK_{E1}=3.20$, $pK_{E2}=5.26$, katalitikus sav/bázis) a másik pedig deprotonált formában ($pK_{ES1}=2.40$, $pK_{ES2}=6.26$, katalitikus nukleofil) van jelen (Gómez és munkatársai 2001). Az enzimaktivitás pH függéséből levonható következtetések tehát jó kiindulási alapot szolgáltatnak arra, hogy általuk a katalitikus csoportok kémiai jellegét

felderítsük. Mivel azonban az egyes aminosavak pK értékei igen közel esnek egymáshoz, illetve az adott aminosav környezet erőteljesen képes befolyásolni ezen értékeket, így többnyire további vizsgálatok szükségesek az így nyert információk által felállított elméletek megerősítésére (Keleti 1985).

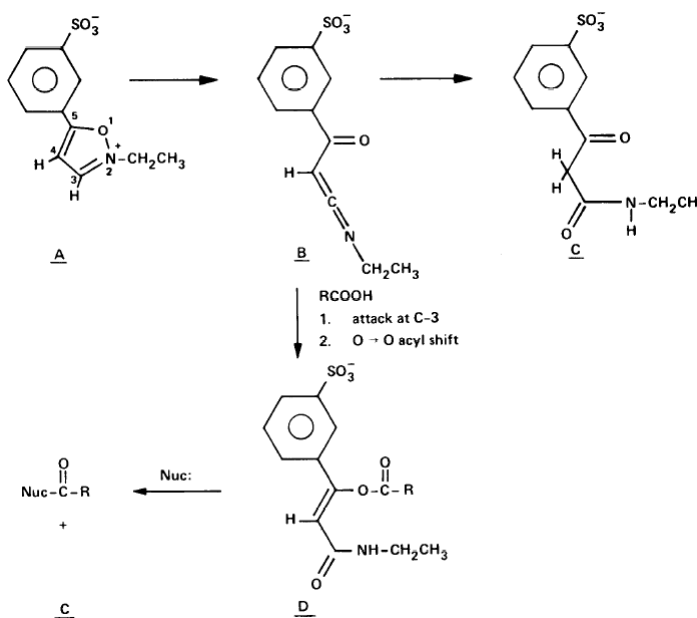
3. Az enzimeket alkotó aminosavak specifikus kémiai módosító szerekkel szelektíven módosíthatók. A glikozidázok esetében az egyik leggyakrabban vizsgált oldallánc a karboxilcsoport. Ennek legfőbb oka az, hogy a katalitikus folyamatban túlnyomórészt karboxilcsoportok vesznek részt, protonált vagy deprotonált formában. Ezen csoportok specifikus kémiai módosítására többféle vegyületípust is alkalmaznak (Lundblad és Noyes 1985). Az egyik ilyen típust a különböző vízben oldható és a peptid szintézisben is széleskörűen használt karbodiimidek jelentik. Ezek tulajdonképpen, mint aktiváló ágensek játszanak szerepet az enzimen található karboxilcsoport és egy megfelelő nukleofil (pl.: glicin-metil-észter) közötti kovalens kötés kialakításában, ilyen viszonylag gyakran alkalmazott vegyület maga az 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDAC) (5. ábra).



5. ábra. Az 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDAC) reakciója az enzimen található karboxilcsoporttal, glicin-metil-észter jelenlétében illetve hiányában.

A karboxil típusú aminosav oldalláncok kémiai módosításának ezt a módszerét Koshland és munkatársai vezették be először (Hoare és Koshland 1966, Carraway és Koshland 1972). Egy másik gyakran alkalmazott vegyületcsalád a Woodward és munkatársai által javasolt N-alkil-5-fenilizoxazólium sók. Ezek közül is az N-etil-5-

fenilioxazólium-3'-szulfonát (Woodward K reagens) használata vált a leggyakoribbá (Pétra 1971, Dunn és Anfinsen 1974, Sinha és Brewer 1985, Bray és Clarke 1990, Komissarov és munkatársai 1995, Paoli és munkatársai 1997, Kiss és munkatársai 2002, Jäger és Kiss 2005) (6. ábra).



6. ábra. A Woodward K reagens karboxilcsoporttal történő reakciója (Dunn és Anfinsen 1974).

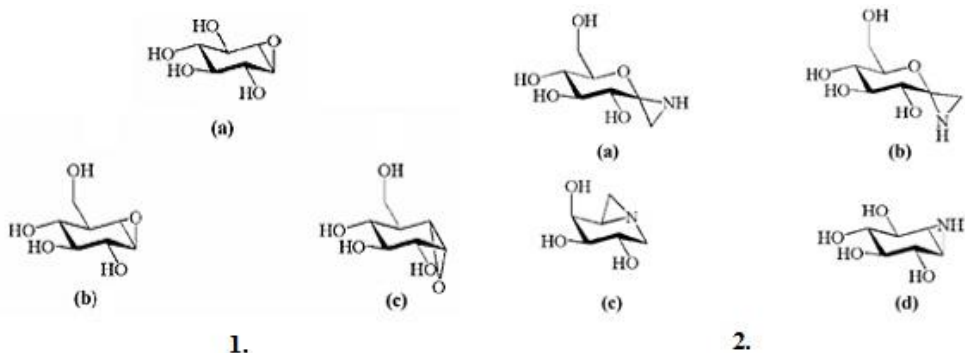
A glikozidázok aktív centrumában leggyakrabban előforduló karboxil típusú aminosav oldalláncokon kívül, még viszonylag gyakran előforduló és ebből következően vizsgált oldalláncok: a hisztidin, amit leggyakrabban dietil-pirokarbonáttal módosítanak (Wolf és munkatársai 1970), a tirozin, aminek a módosítását pl. tetranitro-metánnal végézik (Sokolovsky és munkatársai 1966), a triptofán amit legtöbbször N-bróm-szukcinimiddal módosítanak (Spande és Witkop 1967).

A glikozidáz enzimek módosításakor sok esetben kiderült, hogy a katalízisben karboxilcsoportok játszanak aktív szerepet (Bray és Clarke 1990, Chauthaiwale és Rao 1994, Wen és munkatársai 1999, Kiss és munkatársai 2002, Jäger és Kiss 2005). Ezzel szemben a szubsztrát kötőhely kialakításában gyakran hidrofób jellegű, ezen belül is aromás oldalláncok (triptofán, tirozin) vesznek részt (Keskar és munkatársai 1989, Nath és Rao 1998, Kiss és munkatársai 1981), míg az aktív centrum konformációjának fenntartásában sok esetben a hisztidinek imidazol oldalláncai a felelősek. Néhány

bakteriális xilanáz esetében beszámoltak már a ciszteinek aktív centrumbeli előfordulásáról, azonban ezen aminosav oldalláncok szerepe még nem teljesen tisztázott. Az enzimek, aminosav oldalláncokra specifikus kémiai módosító szerekkel történő kezelésével meghatározható az, hogy milyen kémiai karakterű és típusú aminosav oldalláncok vesznek részt a katalízisben és/vagy a szubsztrátkötésben. Ezen módszerek segítségével viszont nem lehetséges azonosítani a kérdéses aminosavakat, mivel ezek a módosítók csak az aminosav oldalláncok kémiai jellegére specifikusak és nem azok enzimbéli elhelyezkedésére, így nem feltétlenül csak az aktív centrumban fejtik ki hatásukat.

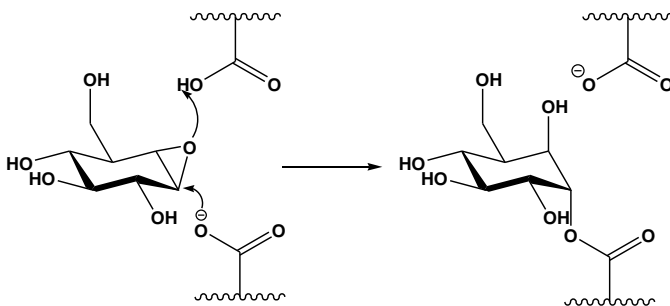
4. A katalízisben résztvevő aminosav oldalláncok azonosításához olyan szubsztrát analóg molekulákat használnak, amelyek szerkezetükben fogva az aktív centrum felé irányulnak és szinte kivétel nélkül oda is kötődnek, ellentétben az előzőekben tárgyalt egyéb kémiai módosító szerekkel. Ezek, hasonlóan az előzőekben leírtakhoz, kovalensen kötődnek az enzim aktív centrumába valamely aminosav oldallánchoz, a katalitikus helyen vagy annak közvetlen környékén. Az inaktívátorok ezen típusait általában két részre osztják, úgynevezett affinitás jelölőkre és mechanizmus alapú inaktívátorokra.

Mechanizmus alapú inaktívátoroknak többnyire olyan aktivált glikozidokat nevezünk, amelyek az anomer centrum közvetlen közelében egy reaktív szubsztituenssel rendelkeznek, vagy olyan kevésbé reaktív vegyületeket, amelyek az enzim mechanizmusa révén aktiválódnak. Ezek a molekulák viszonylag gyorsan képesek a glikozil-enzim köztitermék kialakítására, azonban az így létrejött köztitermék már olyannyira stabil, hogy ennek a hidrolízise már egy nagyon lassú folyamat keretén belül valósul meg, ennek köszönhetően pedig a köztitermék felhalmozódása következik be (Legler 1990, Withers és Aebersold 1995, Blanchard és Withers 2001). Tekintve azonban, hogy a glikozil-enzim köztitermék a nukleofillal történő kovalens kapcsolódáson keresztül alakulhat ki (4b. ábra) ennek megfelelően az ilyen típusú inaktívátorok alkalmasak lehetnek a katalitikus nukleofilnak az azonosítására. Ilyen típusú inaktívátorok például a különböző epoxid-glikozidok vagy 1,2-anhidro-inozitolok illetve a különböző aziridin származékok (7. ábra).



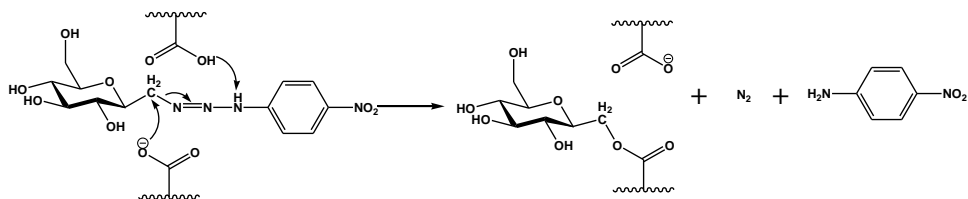
7. ábra. A különböző 1. epoxid-típusú és 2. aziridin-típusú mechanizmus alapú inaktivátorok (Rempel és Withers 2008).

Ezen vegyületek oxirán illetve aziridin gyűrűje az enzim katalitikus sav/bázis csoportja révén protonálódik és egyidejűleg egy nukleofil támadást is elszenved a katalitikus nukleofil által. Ennek következtében pedig, a gyűrű *transz*-diaxiális felnyílása történik meg, miközben a molekula kovalens kötést létesít a katalitikus nukleofillal (8. ábra).



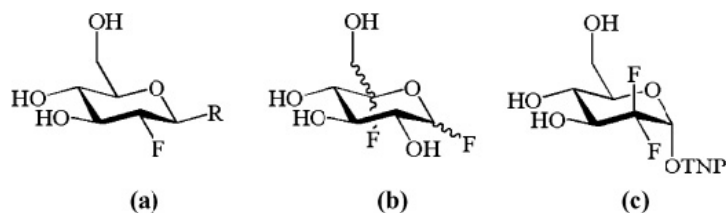
8. ábra. Az epoxid-típusú mechanizmus alapú inaktivátorok reakciója az enzim aktív centrumában lévő aminosav oldalláncokkal (Rempel és Withers 2008).

Az előzőekben tárgyaltakhoz hasonló típusú inaktivátorok a különböző glikozil-metiltriázének, amelyek szintén az enzim katalitikus mechanizmusa következtében alakulnak át glikozil-metiltriázónium sókká (Black és munkatársai 1993). Az így kialakult köztitermék N_2 kilépése mellett tovább bomlik létrehozva ezáltal egy igen erős elektrofil karbénium iont, amely alkilezi az enzim katalitikus nukleofiljét (9. ábra).



9. ábra. Az glikozil-metiltriazének reakciója az enzim aktív centrumában lévő aminosav oldalláncokkal (Rempel és Withers 2008).

A mechanizmus alapú inaktívátorok egy igen jelentős csoportját képezik a különböző fluoro-glikozidok. Ilyenek például a 2,4-diNitrofenil-2-dezoxi-2-fluoro-glikozidok vagy a 2-dezoxi-2-fluoro- α -D-glikozilfluoridok, melyeket eredményesen használtak különböző retenciós β -glikozidázok inaktíválására (Mosi és Withers 2002, Wicki és munkatársai 2002). Ezzel szemben az α - és β -glikozidázok esetében az 5-fluoro-glikozilfluoridok vagy a 2-dezoxi-2,2-difluoro-glikozidok triNitrofenil, valamint a 2-dezoxi-difluorometilfenil és 2-dezoxi-N-fenil-trifluoroacetimidát aglikont tartalmazó származékai bizonyultak eredményes inaktívátoroknak (McCarter és Withers 1996, Withers 2001, Numao és munkatársai 2003, Poon és munkatársai 2007, Walvoort és munkatársai 2012, Chauvigné-Hines és munkatársai 2012) (10. ábra).

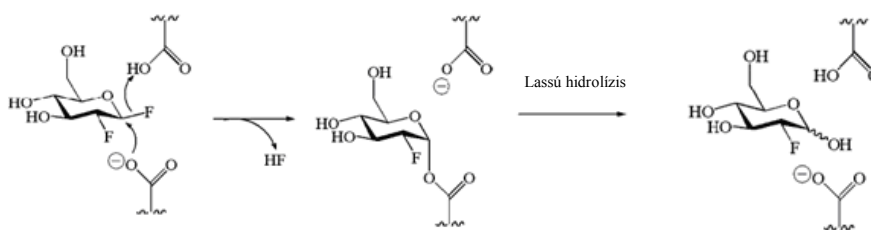


10. ábra. Az aktivált (a) 2-dezoxi-2-fluoro glikozidok, (b) 5-fluoro glikozilfluoridok és (c) triNitrofenil 2-dezoxi-2,2-difluoro-glikozidok szerekezete, ahol R= F, diNitrofenil csoport, TNP= triNitrofenil csoport (Rempel és Withers 2008).

Ezen reagensek, a 2-dezoxi-2-fluoro valamint 5-fluoro szubsztituáltságuk okán, képesek a glikozil-enzim köztitermék kialakulásához (glikozilezés) illetve elbomlásához (deglikozilezés) tartozó átmeneti állapotok destabilizálására a retenciós glikozidázok esetében. Ez az átmeneti állapotokat érintő destabilizáció több hatás együttes eredményeként alakul ki. Az egyik ilyen hatás az, hogy a C-2 helyzetben lévő OH-csoport hiányának következtében az egyik kulcsfontosságú hidrogénkötés kialakulásának lehetősége szűnik meg, a másik ilyen hatás pedig a fluoratom nagy negatív induktív effektusából adódik.

Az 5-fluoro glikozidok esetében, mivel a C-2 helyzetben lévő OH-csoport érintetlen, ezért az átmeneti állapot kialakulásához és stabilizálásához szükséges hidrogénkötés ki tud alakulni. Ez egyben azt is jelenti, hogy az előbbieken vázolt hatások közül ez már nem játszhat szerepet, sem a glikozilezés, sem pedig a deglikozilezés átmeneti állapotának destabilizálásban. Ennek megfelelően ezeknél a reagenseknél ezen lépések sebessége a 2-dezoxi-2-fluoro származékokhoz képest nagyobb (Rempel és Withers 2008).

Ugyanakkor ezek az inaktívátorok, jól távozó csoporttal is rendelkeznek (fluorid, di- és triNitrofenil csoportok) amelyeknek köszönhetően a glikozilezési lépés felgyorsul, míg a deglikozilezési lépés az előzőeknek megfelelően nem változik, ez viszont az átmeneti állapotban maradt glikozil-enzim köztitermékek felhalmozódásához vezet (11. ábra).



11. ábra. A retenciós β -glükozidázok inaktíválásának mechanizmusa 2-dezoxi-2-fluoro- β -D-glükopiranozilfluoriddal (Rempel és Withers 2008).

Az így kialakított köztitermék stabilitása igen változó lehet, függően a vizsgált enzimtől. Tekintettel azonban arra, hogy az így kialakult köztitermék katalitikusan kompetens, így egy megfelelő nukleofilitású akceptor molekula jelenlétében transzglykozilezési reakció játszódhat le, amely az enzim reaktiválódásához vezethet (Blanchard és Withers 2001, Mosi és Withers 2002, Wicki és munkatársai 2002).

Ennek megfelelően, viszont megállapítható az, hogy ezek a reagensek sokkal inkább tekinthetők lassan hidrolizálható szubsztrátoknak semmint klasszikus értelemben vett inaktívátoroknak (Rempel és Withers 2008).

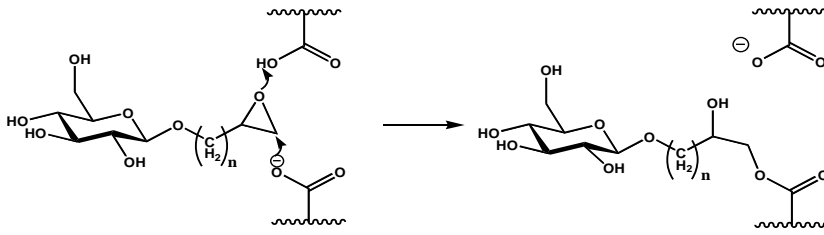
Először 1982-ben végeztek mechanizmus alapú inaktívátorokkal kísérleteket xilán 1,4- β -xilozidázok esetében (Sinnott és munkatársai 1982). A későbbiekben 2,4-diNitrofenil-2-dezoxi-2-fluoro- β -D-xilopiranoziddal, bakteriális xilán 1,4- β -xilozidáz enzim katalitikus nukleofilját azonosították (Vocadlo és munkatársai 1998, Hekomat és munkatársai 2005).

Az inaktívátorok másik nagy csoportját az úgynevezett affinitásjelölők alkotják, amelyek olyan szubsztrátanalóg molekulák, amelyek igen nagy affinitást mutatnak az

enzim aktív centruma iránt és szerkezeti hasonlóságuknál fogva képesek oda kötődni. Mivel ezek a molekulák különböző reaktív csoportokkal rendelkeznek, így képesek az aktív centrumban található aminosav oldalláncokkal kovalens kötést kialakítani. Az így megjelölt aminosavak azonosítása az enzim proteolitikus emésztése után válik lehetővé. Maga az azonosítás történhet radioaktívan jelölt inaktivátor alkalmazásával vagy röntgenkrisztallográfiás módszerrel, azonban napjainkban egyre elterjedtebbé vált a különböző lágy ionizációs tömegspektrometriai vizsgálatok alkalmazása. Ezek közül is a leginkább elterjedt az elektorspray ionizációs tömegspektrometria (ESI-MS, FAB-MS) (Black és munkatársai 1993, Tull és munkatársai 1996, Howard és Withers 1998, Vocadlo és Withers 2000). A mechanizmus alapú inaktivátorokkal ellentétben, az affinitásjelölők nemcsak a katalitikus nukleofillal, hanem más tér közelben található, potenciálisan reaktív aminosav oldalláncokkal is képesek reagálni, ezáltal ezen aminosavak azonosítása is lehetővé válhat (Legler 1990). Ezzel a módszerrel sikerült többek közt a manióka (*Manihot esculenta*) β -D-glükozidázának katalikus sav/bázis csoportját (Glu-198) azonosítani (Keresztessy és munkatársai 1994), valamint a *Cellomonas fimi* exoglukanázának sav/bázis csoportját (Glu-127) azonosítani (Tull és munkatársai 1996). Ezek a molekulák az enzimekkel a Kitz és Wilson által leírt látszólagos (pszeudo) elsőrendű kinetika szerint reagálnak. Ez kizárólag abban az esetben valósul meg, amennyiben az inaktivátor az enzimhez képest nagy feleslegben van jelen, így nem játszódik le más mellékreakció (Kitz és Wilson 1962). Abban az esetben, ha egy kompetitív inhibitor vagy maga a szubsztrát jelenlétének következtében az inaktiválódás sebessége lecsökken, az nyilvánvaló bizonyítéka annak, hogy az inaktivátor az egyik aktív centrumban található aminosav oldalláncot módosítja (Plapp 1982, Legler 1990).

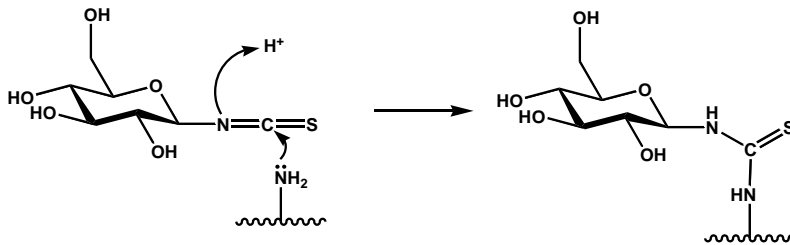
Az elmúlt időszakban sok különböző affinitásjelölőt szintetizáltak és használtak az enzimek aktív centrumának feltérképezésére, ezáltal pedig a működési mechanizmusuk tanulmányozására (Rempel és Withers 2008). Ilyen affinitásjelölők például a különböző glikozil-epoxidok, amelyek eltérően a kondruitol epoxidoktól, exociklikus oxirán gyűrűt tartalmaznak, amelyek közvetlenül, vagy néhány kötés közbeiktatásával, kapcsolódnak a cukor gyűrűhöz. Ennek köszönhetően ezen molekulákat sikeresen használták már például a lizozim vagy a különböző celluláz enzimek inaktiválására. Ezek ugyanis olyan endo-glikozidázok, amelyeknél egy meghatározott minimális lánchossznak lennie kell ahhoz, hogy az inaktivátor megfelelő módon tudjon kötődni (a szubsztráthoz hasonló

módon) és megfelelően tudjon reagálni a katalitikusan aktív aminosav oldalláncokkal (Legler 1990) (12. ábra).



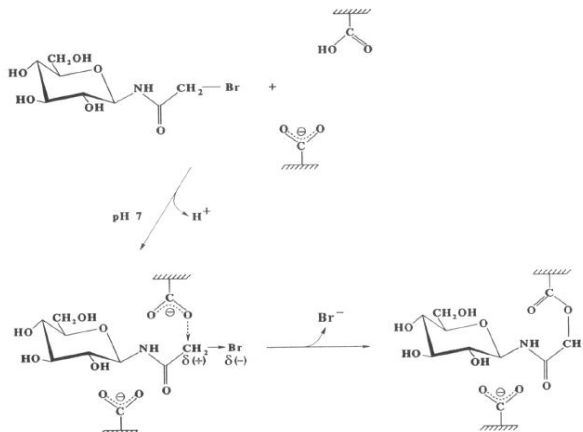
12. ábra. Az glikozil-epoxid származékok reakciója a glikozidázok aktív centrumában (Rempel és Withers 2008).

Az affinitás jelölők egy másik csoportja a glikozil-izotiocianátok. Ezek a molekulák az elektrofil izotiocianát csoportjuknak köszönhetően igen könnyen lépnek reakcióba aminocsoportokat tartalmazó oldalláncokkal, megfelelő tiokarbamid származék képződése közben (13. ábra). Alkalmazásuk viszont kellő körültekintést igényel, a könnyen hozzáférhető egyéb aminocsoportokkal történő mellékreakciók miatt (Legler 1990).



13. ábra. Az glikozil-izotiocianátok reakciója az enzim valamely aminosóportjával (Legler 1990).

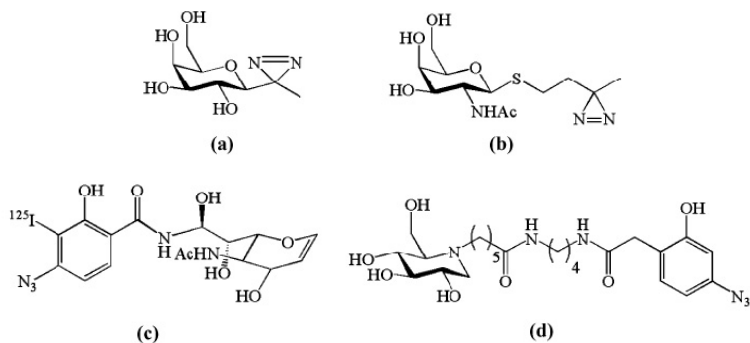
Az affinitásjelölők egy másik igen fontos csoportját az N-brómacetil-glikopiranozilamidok alkotják. Ezen reagensek működésének alapját az jelenti, hogy az aglikonon található brómatom elektronszívó hatása révén az α -szénatom parciálisan pozitív töltésűvé válik, így könnyen képes alkilezni az enzim aktív centrumában lévő katalitikus nukleofilt, a deprotonálatlan katalitikus sav/bázist, vagy egyéb nukleofil aminosav oldalláncokat (Naider és munkatársai 1972). Az első olyan esetet, amikor egy N-brómacetil glikozid származék a katalitikus sav/bázis csoporttal lép reakcióban éppen Keresztessy és munkatársai írták le 1994-ben (14. ábra).



14. ábra. Az N-brómacetil- β -D-glükopiranozilamid reakciója a katalitikus sav/bázis csoporttal (Keresztessy és munkatársai 1994).

Első sikeres alkalmazásukról az *Escherichia coli* β -D-galaktózidáza esetén számoltak be, ahol a katalitikus helyhez meglehetősen közel eső metionint módosítottak (Naider és munkatársai 1972). Ez is azt támasztja alá, hogy ezek a reagensek nem csak karboxil-típusú oldalláncokkal léphetnek reakcióba. Azóta viszont már több baktérium és gomba által termelt glikozidáz enzim esetén használták ezt az inaktívátort és a közölt esetek többségében karboxilcsoportot alkilező reagenseknek bizonyultak (Thomas 1977, Legler 1990, Black és munkatársai 1993, Keresztessy és munkatársai 1994, Howard és Withers 1998 a,b, Chir és munkatársai 2002, Kiss és munkatársai 2002, Vocadlo és munkatársai 2002, Jäger és Kiss 2005). A felsorolt közleményekben egyaránt beszámolnak olyan esetekről, amikor a különböző N-brómacetil glikozidok a katalitikus sav/bázist módosítják, illetve amikor a katalitikus nukleofillal lépnek reakcióba a vizsgált enzim aktív centrumának térbeli elrendeződésétől függően.

Az affinitás jelölőkön belül megkülönböztetnek még egy különálló csoportot, amelyet úgynevezett fotoaffinitás jelölőknek neveznek (Rempel és Withers 2008). Felépítésüket tekintve elmondható, hogy ezek olyan glikozid származékok, amelyek különböző diazirin illetve arilazid csoportokat tartalmaznak aglikonként (15. ábra).



15. ábra. A különböző fotoaffinitás jelölők Rempel és Withers nyomán, 2008.

Ezek különböző fotolitikus reakciókra képes csoportok, amelynek következtében erősen elektrofil karbénium illetve nitrónium ionok generálódnak, amelyek az enzim különböző elektronban gazdag csoportjaival képesek reakcióba lépni. Ezek a reagensek azonban nem kaptak olyan szintű figyelmet, mint a korábban említettek. Ennek legfőbb oka az, hogy ezek az erősen elektrofil ágensek besugárzás hatására azonnal kialakulnak, függetlenül attól, hogy épp ez enzim aktív centrumában vagy azon kívül tartózkodnak-e, ebből következően nem igazán tekinthetők specifikusnak.

5. Az előzőekben leírt, irreverzibilisen kötődő gátlószerek (inaktivátorok) leginkább a katalitikusan aktív aminosav oldalláncok azonosítására alkalmasak, ezzel szemben a reverzibilisen kötődő inhibitorokat a szubsztrátkötő hely feltérképezéséhez lehet alkalmazni. Ezekről a vegyületekről az utóbbi évtizedekben sokkal több vizsgálat és összefoglaló munka látott már napvilágot, mint az azt megelőző időszakban (Legler 1990, Heightman és Vasella 1999, El Ashry és munkatársai 2000, Sivapriya és munkatársai 2007). A leghatékonyabb és legjelentősebb reverzibilis inhibitorok közé a glikonolaktonok, a glikonolaktámok, ill. a különböző N-tartalmú, bázikus szubsztrátanalógok (pl. glikozilaminok, vagy a cukorgyűrűben iminocsoportot tartalmazó származékok), valamint a különböző tioglikozidok tartoznak. A glikonolaktonokkal végzett inhibíciós vizsgálatok igazolták, hogy a katalitikus folyamatban egy oxokarbénium jellegű átmeneti állapot alakul ki. Ilyen inhibíciós vizsgálatok alapján Vasella és munkatársai egy merőben újszerű hipotézissel álltak elő, mely szerint a katalitikus karboxilcsoportok nem feltétlenül egymással szemben helyezkednek el, hanem a katalitikus sav/bázis egy kissé „oldalt”, a gyűrű síkjához közelebb is elhelyezkedhet (Heightman és Vasella 1999).

6. A modern biotechnológiai eljárások robbanásszerű fejlődésével lehetővé vált bármelyik fenti módszerrel nyert feltevés vagy megállapítás igazolása. Például a *Bacillus stearothermophilus* T-6 xilán 1,4- β -xilozidáza esetén a sikeres klónozást és *E. coli*-ból történő expressziót követően irányított mutagenézist alkalmazva igazolták, hogy a Glu-160 esszenciális sav/bázis-ként játszik szerepet a katalitikus folyamatban (Bravman és munkatársai 2001a). Ehhez hasonló eredményt kaptak Vocadlo és munkatársai, a *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*-ból származó xilán 1,4- β -xilozidáz enzim esetén is (Vocadlo és munkatársai 2002). Egy szintén *Bacillus stearothermophilus* T-6 törzsből izolált másik xilán 1,4- β -xilozidáz esetén ugyanilyen irányított aminosavcserét alkalmazva megállapították, hogy az enzim működésében a Glu-337 és a Glu-413 katalitikus aminosav oldalláncként vesznek részt (Bravman és munkatársai 2001b).

Ugyanezen modern molekuláris biológiai módszereknek köszönhetően az elmúlt években egyre több enzim teljes aminosav sorrendje vált ismertté. Többek közt ez is képezte az alapját egy új enzim besorolási rendszer megalkotásának, amely Henrissat nevéhez fűződik (Henrissat 1991). Ez a rendszer az egyes családok megalkotásánál az enzimek aminosav szekvenciája közötti homológiát veszi alapul. Henrissat ugyanis azt feltételezte, hogy ez a homológia az egyes szekvencia részek közt nemcsak strukturális, hanem funkcionális hasonlóságot is hordozhat. Ezt az elméletet továbbgondolva azt is feltételezte, hogy mivel az egy családba tartozó enzimek aktív centruma konzervatív aminosavakat és szekvenciákat tartalmaz, így az általuk katalizált reakciók sztereokémiája is azonos lehet. A szekvencia homológia alapján jelenleg 115 glikozid-hidroláz család létezik (ezek száma viszont időről időre növekszik), ezek közül pedig a 3, 30, 39, 43, 52, 54 családokba soroltak eddig xilán 1,4- β -xilozidázokat (Henrissat és Bairoch 1993, Henrissat és Bairoch 1996, CAZy adatbázis, www.cazy.org). Ezek közül, a 3, 30, 39, 52, 54 családokba tartozó xilán 1,4- β -xilozidázok retenciós mechanizmus szerint hidrolizálnak, míg a 43-as családba tartozók inverziós mechanizmus szerint.

A 3-as családba tartozó enzimeknek csak egy kisebb részét képezik a xilozidázok, azonban ebben a családban katalitikus sav/bázisként Glu-ot, míg nukleofilként Asp-ot azonosítottak. A 30-as és 39 családba tartozó enzimek esetek mindkét katalitikusan aktív aminosavat Glu-ként azonosították, az 52-es családban pedig úgy találták, hogy a protondonor Asp, a nukleofil pedig Glu. A 43-as családra vonatkozóan – ahová ezen doktori értekezés tárgyát is képező xilán 1,4- β -xilozidáz enzim is tartozik – elmondható, hogy a katalizisben résztvevő aminosav párt (Asp-Glu) azonosították (CAZy adatbázis, www.cazy.org).

2.4. A *Thermobifida fusca*

Tekintettel arra, hogy ezen értekezés tárgyát képező xilán 1,4- β -xilozidáz enzim a *Thermobifida fusca* nevű komposztalakó Gram-pozitív, aerob, termofil, aktinomicétából származik, így mindenképpen fontos egy pár gondolat erejéig kitérni magának a gazdaszervezetnek a bemutatására.

2.4.1. A komposzt legaktívabb lignocellulózbontó aktinomicétái a *Thermobifida*-k

A komposztálódás során a lignocellulóz biokonverziója, különösen a 60-80 °C-kal jellemezhető termofil fázisban, rendkívül gyorsan és hatékonyan zajlik. A lignocellulóz gyors lebomlása a komposztalakó termofil aktinomicéták tevékenységének a következménye. Közülük is kiemelkednek a *Thermobifida* genusz celluláz és hemicelluláz aktivitással rendelkező tagjai. Jóllehet, a komposzt mikrobiális folyamatait már több mint száz éve kutatják, az első tiszta tenyészeteket csak az ötvenes években (Henssen, 1957) sikerült izolálni ebből a genusból. Érdekes adalék ehhez, a típusfaj, a *T. fusca* esete: típus törzséről kiderült, hogy kevert tenyészet, amely sok félreértést okozott 1975-ig, amikoris Crawford újra leírta ezt a fajt (Crawford, 1975). A *Thermobifida* genuszba jelenleg 4 faj tartozik: a *T. fusca*, a *T. alba*, *T. halotolerans* és a *T. cellulolytica* (Kukolya és munkatársai 2002, Yang és munkatársai 2010).

2.4.2. A *Thermobifida fusca* által termelt glikozid hidrolázok

A már korábban leírt komposztalakó aktinomicéták közül, a leginkább kimagasló cellulóz- és hemicellulóz bontó aktivitással a *Thermobifida fusca* rendelkezik köszönhetően annak, hogy igen sokféle ilyen enzimet termel. A szervezet genetikai állományának a feltérképezése alapján (Lykidis és munkatársai 2007) kiderült, hogy számos lignocellulóz bontó enzimet is termel: endoglukanázok (Posta és munkatársai 2004), exoglukanázok (Kukolya és munkatársai 2002), endoxilanázok (Kim és munkatársai 2004, Sun és munkatársai 2007), β -xilozidázok, endomannanázok és β -mannozidázok (Béki és munkatársai 2003). Ezek közül ezidáig már több mint 40-et azonosítottak is a genomi szekvenciájuk alapján és ennek megfelelően be is sorolták őket a GH1, GH2, GH3, GH4, GH5, GH6, GH9, GH10, GH11, GH13, GH15, GH18, GH23, GH31, GH42, GH43, GH48, GH65, GH74, GH77, GH81 és GH95 családokba (www.cazy.org). Az általunk vizsgált *Thermobifida fusca*-ból származó xilán 1,4- β -xilozidáz enzim a szekvencia homológia alapján a GH43-as családba tartozik.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Felhasznált anyagok

A különböző vizsgálatokhoz felhasznált anyagok analitikai minőségűek voltak, és többségüket a VWR International Kft.-től (kísérletek elvégzése idején Spektrum-3D Kft.) (Debrecen), a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest) valamint a Merck Kft.-től (Budapest) szereztük be. Az ezektől eltérő forrásból származó anyagok esetén a gyártót minden esetben külön feltüntetjük.

3.2. A xilán 1,4- β -xilozidáz enzim heterológ expressziója

Az általunk vizsgált xilán 1,4- β -xilozidáz (TfBXyl43) egy rekombináns enzim, amely a *Thermobifida fusca* nevű komposztlakó termofil aktinomicéta TM51-es törzséből származik. A gént, amely a vizsgált TfBXyl43 enzimet kódolta, egy pET28a típusú plazmid konstrukció tartalmazta, amely egy *E. coli* BL21(DE3) expressziós törzsbe került transzformálásra. A továbbiakban ezen törzs növesztésének, majd pedig az enzim expressziójának körülményei kerülnek kifejtésre.

3.2.1. A táptalajok előkészítése és sterilizálása

A Petri-csészénkben LB-agar táptalajt (10 g Trypton, 5 g élesztőkivonat, 10 g NaCl, 15 g agar, 1 L vízben feloldva), a minikultúránkban pedig LB táptalajt (10 g Trypton, 5 g élesztőkivonat, 10 g NaCl, 1 L vízben feloldva) sterilizáltunk. A sterilizálást követően, amikor az oldat kb. 35-40 °C-ra visszahűlt, 1 L LB-táptalajba 5 ml-t tettünk a Kanamycin törzsoldatból (10 mg/ml) úgy, hogy annak végkoncentrációja 50 μ g/ml legyen. Mindenhol ezt a koncentrációt állítottuk be, az antibiotikumra nézve. A sterilizálást 20-25 percig végeztük 121 °C-on, 1.1-1.2 bar nyomás mellett. Az egyes Petri-csészékbe 35 ml LB-agar táptalajt öntöttünk ezekhez külön-külön a Kanamycin törzsoldatból (10 mg/ml) 175 μ l-t mértünk be.

3.2.2. Szélesztés szilárd táptalajra

A xilán 1,4- β -xilozidáz enzim génjét hordozó plazmidot tartalmazó glicerines *E. coli* BL21(DE3) törzsoldatból, amelyet előzőleg -80 °C-on tároltunk, steril körülmények között a sejteket oltókaccsal felvittük az LB-agar táptalajra. Az így beoltott táptalajokat 14-16 órán át 37 °C-on növesztettük.

3.2.3. A mini kultúra elkészítése

Az 5 ml előzetesen sterilizált LB-táptalajba a Kanamycin törzsoldatból (10 mg/ml) 25 µl-t tettünk, majd az előzőleg LB-agar táptalajon növesztett *E. coli* BL21(DE3) törzsből, steril körülmények között egyetlen sejtkolóniával beoltottuk a tápoldatot, végül pedig 14-16 órán át növesztettük, rázóinkubátorban (37 °C, 200 rpm).

3.2.4. A növesztés

1 L előzetesen sterilizált tápoldatokba 5-5 ml-t adtunk a Kanamycin törzsoldatból (10 mg/ml), ezután pedig steril körülmények között beoltottunk az 5 ml mini kultúrával. Ezt követően rázóinkubátorban (37 °C, 200 rpm) addig növesztettük, amíg a tenyészet optikai denzitása (OD₆₀₀) 0,7-1,0 közötti értéket nem adott.

3.2.5. A xilán 1,4-β-xilozidáz enzim termelésének indukciója

Amint az OD₆₀₀ megfelelőnek adódott, az 1 L-es tápoldatokhoz egyenként az izopropil-1-tio-β-D-galaktopiranozid (IPTG) törzsoldatból (0.4 M) 1 ml-t adtunk úgy, hogy a táptalaj koncentrációja IPTG-re nézve 0.4 mM-os legyen.

Ezután 14-16 órán át növesztettük az 1 L-es indukált sejt kultúrát, rázóinkubátorban (37 °C, 200 rpm).

3.3. Az *E. coli* BL21(DE3) sejtek összegyűjtése és feltárása

3.3.1. A sejtek összegyűjtése

A kapott 1 L-es indukált *E. coli* BL21(DE3) kultúrákat ezt követően centrifugáltuk (8000 rpm, 10 perc), majd pedig a keletkezett pelletet összegyűjtöttük.

Az enzim expressziója során összesen 6 L táptalajba növesztettük a β-D-xilozidáz enzimet hordozó *E. coli* BL21(DE3) expressziós törzset. A kapott sejtmassza össztömege 21 g volt.

3.3.2. A sejtek feltárása

Az összegyűjtött 21 g sejtmasszát 40 ml lízis pufferbe (25 mM TRIS-HCl puffer pH 8.5, 0.5 mg/ml lizozim, 1 mM PMSF, 10x-es Porteáz inhibitor koktél, DNáz, RNáz) szuszpendáltuk, majd ultrahangos szonikátor (SANYO SONIPREP 150) segítségével feltártuk 0 °C-on. A szonikálás időtartama átlagosan 10-12 perc volt, ahol percenként 15-20 másodpercig szonikáltuk a sejteket. Ezután a kapott szuszpenziót centrifugáltuk (13000 rpm, 15 perc), majd a fehérjetisztítás további lépéseit pedig az aktivitással rendelkező szonikált felülúszóból végeztük.

3.4. A TfbXyl43 enzim tisztítása

3.4.1. A TfbXyl43 enzim tisztítása His-tag affinitás kromatográfiával

A feltárt nyers felülúzó tisztítását először affinitás kromatográfiával, Amersham Hi Trap™ Chelating HP oszlop alkalmazásával végeztük. Az oszlopban található 5 ml agaróz mátrixú immobilizált fém-kelát képző iminodiacetát ligandumot tartalmazó (IMAC) gyantát 25 ml 0.1 M CuSO₄ oldattal aktiváltuk. Ezt követően az oszlopot desztillált vízzel mostuk, amíg az összes nem kötődött CuSO₄-ot le nem mostuk az oszlopról.

Ezután az oszlop ekvibrálása történt meg 1 M NaCl-ot tartalmazó, 20 mM pH 7.0-es foszfát puffer jelenlétében.

Ezután a fehérje mintához 1 M végkoncentrációig NaCl-ot adtunk, majd pedig két ciklusban felvittük azt az oszlopra 1 ml/perces áramlási sebességgel. Ezt követően az oszlopot 50 ml ekvibráló pufferrel (1 M NaCl-ot tartalmazó, 20 mM pH 7.0-es foszfát puffer) mostuk 2 ml/perces áramlási sebesség mellett, a meg nem kötődött fehérjéket eltávolítottuk.

A megkötődött enzimet több lépcsőben felváltva gradiens és izokratikus elúcióval eluáltuk, 2 ml/perces áramlási sebességgel. Az elúció során különböző koncentrációjú imidazol tartalmú 20 mM-os pH 7.0-es foszfát puffert használtunk. Elsőként 10 ml 0-tól 50 mM imidazol koncentrációig tartó gradiens elúciót alkalmaztunk, majd ezt követően 10 ml 50 mM-os izokratikus mosás következett. Ezután 20 ml 300 mM imidazol tartalmú izokratikus elúcióra váltottunk. Végül pedig azért, hogy az oszlophoz kötődött fehérjéket eltávolítsuk az oszlopról további 20 ml 500 mM imidazol mosást iktattunk be, 3 ml/perces áramlási sebesség mellett. Az elúció közben 10 ml-es frakciókat szedtünk, ahol pedig a megkötődött fehérje eluálódott, ott csúcsvezérelt frakciószedést alkalmaztunk.

Végül az oszlop regenerálásához 50 ml 100 mM-os pH 4.0-es citromsav/Na₂HPO₄×2H₂O pufferrel történő mosást alkalmaztunk.

Ezt követően az oszlopot 50 ml 20%-os etanollal mostuk majd 4°C-on tároltuk a következő felhasználásig. Végül pedig a TfbXyl43 tartalmú frakciókat összegyűjtöttük, majd dializáltuk, 25 mM-os pH 8.5-ös TRIS-HCl puffer mellett.

3.4.2. A TfbXyl43 enzim tisztítása anion cserélő kromatográfiával

Az affinitás kromatográfiás tisztítás után előtisztított enzimet anioncserélő kromatográfiával tisztítottuk tovább Pharmacia DEAE Sepharose töltetet alkalmazva (14 cm×3.8 cm; 150 ml). Az oszlopot 500 ml 25 mM-os pH 8.5 TRIS-HCl pufferrel ekvibráltuk, 8 ml/perc áramlási sebességgel. Ezt követően, az előtisztított fehérje oldatot egy ciklusban felvittük oszlopra 5 ml/perc áramlási sebesség mellett. Ezután az oszlop

mosása következett további 300 ml 25 mM-os TRIS-HCl pH 8.5 pufferrel az oszlopra nem kötődő szennyezők eltávolítása céljából 8 ml/perc áramlási sebességgel. Miután az A_{280} értéke nulla közeli értékre állt be, megkezdtük az enzim elúcióját az oszlopról. Több lépcsőben történő gradiens és izokratikus elúciót alkalmaztunk a hatékonyabb tisztítás elérésének érdekében állandó 3 ml/perc áramlási sebesség alkalmazásával. Először 500 ml 0 mM-tól 500 mM-ig terjedő NaCl gradienst alkalmaztunk. Ezt követően 100 ml 500 mM NaCl-ot tartalmazó pufferrel mostuk az oszlopot. Végül pedig 250 ml 500 mM-tól 1000 mM-ig terjedő NaCl gradiens elúciót alkalmaztunk (mindvégig 25 mM-os TRIS-HCl pH 8.5 pufferben). A kromatográfia során 8 ml-es frakciókat gyűjtöttünk, amelyekből aktivitásméréssel állapítottuk meg, hogy mely frakciók tartalmazzák a TfBXyl43 enzimet. Végül a TfBXyl43 tartalmú frakciók összegyűjtését követően, dialízissel puffer cserét végeztünk el, 20 mM-os pH 7.0-es foszfát pufferre.

A fehérje tisztítást, minden esetben ÄKTA purifier UPC 10 készüléken végeztük folyamatos pH, vezetőképesség és A_{280} detektálás mellett. Az alkalmazott puffereket használat előtt mindig 0.45 μm -es pórusméretű Millipore S-Pak szűrőmembrán segítségével szűrtük.

3.5. Az enzim aktivitásának mérése

3.5.1. para-Nitrofenil- β -D-xilopiranozid szubsztráttal

Az enzimaktivitás vizsgálatokat 100 mM pH 6.0 citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ pufferben 50 °C-on végeztük. 2 perc előinkubálás után a reakciót minden esetben az enzim hozzáadásával indítottuk, a mintákat pedig rendre 5-10-15 percre inkubáltuk.

Az enzimaktivitást para-Nitrofenil- β -D-xilopiranozid (pNP-Xyl) szubsztráttal mértünk 1 ml össztérfogatú reakcióelegyekben, amelyek a szubsztrát mellett tartalmazták az enzimet és a 50-100 mM pH 6.0 citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ puffert is. A reakciókat 2 ml nátrium-borát puffer (0.2 M, pH 10) hozzáadásával állítottuk le. A hidrolízis során a felszabadult para-nitrofenolát ionok hatására, az oldat sárga színűvé vált, amelynek elnyelését 400 nm hullámhosszon spektrofotometriásan határoztuk meg. Az összehasonlító oldat egyik esetben sem tartalmazott enzimet, csak a szubsztrátot és a citromsav/ Na_2HPO_4 puffert.

3.5.2. Xilobióz szubsztráttal

A xilobióz a xilán 1,4- β -xilozidáz enzimnek természetes szubsztrátja. Azonban mivel szabad cukorról van szó, amely nem tartalmaz kromofor csoportot, így az aktivitás követésére, a redukáló cukrok kvantitatív meghatározására széles körben alkalmazott módosított Somogyi-Nelson módszert használtuk (Paleg 1959). A vizsgálni kívánt oldathoz 1 ml Somogyi reagenst adunk, majd az oldatot 10 percre forró vízfürdőbe tesszük. Ezt követően kivesszük az oldatot a vízfürdőből, majd lehűtjük. A lehűtött oldathoz 1 ml Nelson reagenst adunk. Végül pedig az oldatot 10 ml-re kiegészítjük és 560 nm-es hullámhossznál fotometrálunk.

A mérés során mindegyik minta tartalmazta a xilobiózt, a pH 6.0-os citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ puffert. A reakciót az enzim hozzáadásával indítottuk el csak úgy, mint az előző esetben. A reakciót pedig úgy állítottuk le, hogy a mintához hozzáadtuk a Somogyi reagenst és a receptnek megfelelően, forró vízbe tettük.

A spektrofotometriás méréseket minden esetben Jasco[®] V-550 típusú fotométerrel végeztük, amely rendelkezett szabályozható hőmérsékletű küvetatartóval.

3.6. Fehérjetartalom meghatározása

3.6.1. A Lowry módszer

A fehérjetartalom meghatározását a Hartree által módosított Lowry-féle módszer alapján végeztük (Hartree 1972). A kapott oldatokat 650 nm hullámhosszon, összehasonlító oldattal szemben fotometráltuk. A kalibrációs görbe készítéséhez marha szérum albumin (BSA) oldatsorozatot használunk (10 μg \rightarrow 100 μg).

3.6.2. Az A_{280} módszer

A fehérjetartalom meghatározható még a fehérjék UV elnyelése alapján spektrofotometriásan. Ezt a fajta meghatározást mi 500 μl -es végtérfogatú fehérje tartalmú oldatokkal végeztük Jasco V-550 UV/Vis spektrofotométerrel 280 nm-es hullámhossznál a Wartburg-Christian módszer szerint. A kapott abszorbancia értékekből a fehérje koncentrációt a $C_{\text{prot}}(\text{mg/ml}) = 1.55 \times A_{280\text{nm}} - 0.76 \times A_{260\text{nm}}$ összefüggés alapján megkaptuk a fehérjetartalmat mg/ml egységekben.

3.6.3. A Bradford módszer

A fehérjetartalom meghatározása ezen kívül még a Bradford által javasolt módszer szerint történt (Bradford 1976). A reakcióközegben 20 μl megfelelő hígítású mintához

adtunk 1000 µl Bradford-reagenst (Fermentas), 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd 595 nm-en mértük a fényelnyelést a vak oldattal szemben Jasco V-550 UV/Vis spektrofotométerrel. A vak oldat Bradford-reagenst és ultratiszta ioncserélt vizet tartalmazott. A kalibrációs görbe készítéséhez ennél a módszernél is marha szérum albumin (BSA) oldatsorozatát használunk (2.5 µg → 17.5 µg).

3.7. A TfBXyl43 enzim analízise elektroforetikus módszerekkel

3.7.1. SDS-PAGE módszerrel

Az egyes tisztítási lépések után nyert enzim preparátumok homogenitását SDS-PAGE-vel ellenőriztük, az eljárás során Laemmli leírását követtük (Laemmli 1970). A fehérjék elválasztásához 8 (m/V)%-os poliakrilamid gélt és MINI-PROTEAN II. (Bio-Rad, USA) készüléket használtuk. A 10-15 µg fehérje tartalmú mintákat (térfogat ≥ 15 µl) 1:1 arányban hígítottuk a 2x-es mintapufferrel, és 5 percig 100 °C-on forraltuk őket, majd mintafelvitel előtt 13000 g-n, 1-2 percig, szobahőmérsékleten centrifugáltuk. Az elkészített mintákat Hamilton fecskendővel vittük fel az előzetesen kialakított mintatartó zsebekbe. A minták mellé pedig 5 µl előfestett fehérjelétrát (10-200 kDa, BioRad, Prestained Broad Range SDS-PAGE Standard Cat.No. 161-0318) vittünk fel standardként.

A mintafelvitelt követően a futtatást 20-22 mA illetve 100, majd pedig 200 V egyenfeszültség mellett végeztük. Az elektroforézist szobahőmérsékleten végeztük, a futtatási idő 30-45 perc volt. A futtatást követően a géleket először Coomassie Blue R-250 festékkoldatban szobahőmérsékleten 30 percig ráztuk. A felesleges festéket 2-propanol:ecetsav:víz (25:10:65) oldattal távolítottuk el, a géleket 60 percig rázatva szobahőmérsékleten, míg a fehérjét jelző kék csíkok elő nem tűntek.

3.7.2. Natív PAGE módszerrel

A TfBXyl43 enzimnek a natív molekulatömegét 8%-os PAGE gélen határoztuk meg, nem redukáló körülmények között. A natív PAGE analízist Bollag és munkatársai (1996) által megadott módszerrel végeztük. Mindegyik vizsgált minta tartalmazott 8-12 µg enzimet, illetve 25 mM pH 8.0 (NH₄)HCO₃ oldatot. A minták mellé, a natív molekulatömeg meghatározására 5 µl előfestett fehérjelétrát (Serva Native Marker Cat.No. 39219.01) vittünk fel standardként. Az egyes mintákat különböző körülmények között különböző vegyszeres kezeléseknek vetettük alá annak eldöntésére, hogy az enzimfehérje monomer vagy oligomer szerkezetű-e (21. ábra aláírása). A vizsgálat során két gélt futtattunk párhuzamosan. A futtatást követően az egyiket a hagyományos módon előhívtunk (lásd 3.7.1. pont), a másiknál

viszont meghatároztuk az egyes minták aktivitását a gélben. Ebben az esetben a gél 20 percen át 50 °C-on inkubáltuk 10 mM 4-metilumbelliferil- β -D-xilopiranzid szubsztrátot, illetve 0.1 M pH 6.0-os citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ puffert tartalmazó oldatban. Az enzimatis hidrolízis következtében felszabadult 4-metilumbelliferolt 354 nm-es gerjesztő UV fény mellett fluoreszcenciánál 460 nm-es hullámhosszon detektáltuk.

3.8. A xilooligomerek előállítása parciális enzimatis hidrolízissel

Dörzsmozsárban 1 g búkkxilánt (Sigma-Aldrich, X4252) elporítottunk, majd 50 ml 20 mM pH 4.0 nátrium-acetát pufferbe szuszpendáltuk, ehhez (200 μg , 50 U) *Trichoderma viride*-ből származó endo-1,4- β -xilanáz enzimoldatot (Sigma-Aldrich, X3876) adtunk majd 40 percig kevertettük 37 °C-on. Miután a kívánt mennyiségű xilooligomer keletkezett, az enzimreakciót 10 percig 100 °C-os vízfürdőbe helyezve leállítottuk. Ezután a kapott oldatot centrifugáltuk (10000 rpm, 20 perc). Végül a felülúszót bepároltuk kb. 1-3 ml-re, majd 500 μl -enként több ciklusban Biogel-P2 (BioRad) oszlopon (100 \times 1 cm) 0.5 ml/perc áramlási sebesség mellett, gélkromatográfiánál tisztítottuk. A tisztítás során egy 70-75 ml-es előfrakciót követően 1 ml-es frakciókat szedtünk, amelyek tartalmazták a különböző xilooligomereket.

Mind a hidrolízis, mind pedig a gélkromatográfiás elválasztás során kapott frakciók analízisét VRK módszerrel végeztük, i-BuOH:EtOH:H₂O (5:5:3) összetételű futtatóelegy mellett. A termékek megjelenítésére a rétegeket 30 %-os H₂SO₄-oldattal permeteztük be, majd pedig 100-150 °C-on melegítve 1 percig előhívtuk az egyes komponenseket. Ezek alapján az egyik egyesített frakció tartalmazta a tiszta xilobiózt (77 mg), míg a másik a xilotrióz, xilotetraóz és xilopentaóz keverékét (28 mg).

3.9. A pNP- β -D-xilopiranozid hidrolízisének időbeli követése ¹H-NMR segítségével

Annak eldöntésére, hogy az enzim retenciós vagy inverziós mechanizmus szerint hasítja el a szubsztrátot, ¹H-NMR spektroszkópiát alkalmaztunk, melynek során a keletkező D-xilóz anomer konfigurációjának változását követtük nyomon.

Az enzimet (2 mg, 0.03 μM) valamint a pNP-Xyl szubsztrátot (2 mg, 7.4 μM) deuterált 50 mM pH 6.0 citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ puffereben oldottuk fel külön-külön. A reakciót az enzim és a szubsztrát oldatok összeöntésével indítottuk el, majd az így kapott elegyet azonnal egy 27 °C-ra előinkubált készülékbe raktuk. A reakcióelegy végtérfogata

500 μl volt. A $^1\text{H-NMR}$ spektrumokat és ezáltal a termékek keletkezését Bruker Avance DRX 500 készülék segítségével rögzítettük.

3.10. Az TfbXyl43 szubsztrátspecifitásának vizsgálata xilooligomerekre

A TfbXyl43 enzim szubsztrát specifitását egy xilooligomereket tartalmazó keveréken vizsgáltuk, amely xilotriózt, xilotetraózt valamint xilopentaózt tartalmazott (28 mg). A reakcióelegyek (200 μl), amelyekben a hidrolízis előrehaladását követtük nyomon 50 $^{\circ}\text{C}$ -on, tartalmazták a szubsztrát keveréket (100 μl , 7 mg), a 100 mM-os citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ puffert (170 μl , pH 6.0) és az enzimet (30 μl ; 15 μg). A reakciókat ebben az esetben is az előinkubálást követően az enzim hozzáadásával indítottuk. Az így kapott elegyekből meghatározott időnként mintákat vettünk, majd az összetételt HPLC-s módszerrel vizsgáltuk.

A HPLC-s vizsgálatok a Hewlett-Packard 1090 Series II típusú készüléken történtek, amely rendelkezett törésmutató index (RI) detektorral.

A mérés előtt a 3.8. pontban leírtak szerint előállított oligomerekből standard oldatokat készítettünk. Ezt követően ezen standardok segítségével állítottuk be az optimális kromatográfiás körülményeket, illetve rögzítettünk az egyes komponensek retenciós idejét. Az egyes mintákat (20 μl) SUPECOSIL LC-NH₂ oszlopra injektáltuk majd pedig izokratikus körülmények között MeCN:H₂O, (6:4) összetételű eluenssel/ (futtatóelegy mellett) 1 ml/perc áramlási sebességet alkalmazva végeztük a kromatográfiás vizsgálatokat. A xilobióz és xilotrióz teljes hidrolízisét VRK módszerrel követtük nyomon az 3.8. pontban leírtaknak megfelelően.

3.11. Kinetikai paraméterek meghatározása

A stady-state kinetikai paraméterek meghatározását (k_{cat} , K_M , k_{cat}/K_M) mind mesterséges pNP-Xyl (0.1-11 K_M), mind pedig természetes xilobióz (0.1-5 K_M) szubsztrátok esetében elvégeztük 1.41 μg enzim, illetve 50 mM pH 6.0 citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ puffer jelenlétében. Ugyanezen meghatározásokat para-Nitrofenil- α -L-arabinopiranozid (pNP-Ara, 0.1-8 K_M) valamint para-Nitrofenil- β -D-glükopiranozid (pNP-Glc, 0.1-7 K_M), mint potenciális szubsztrátok esetében is elvégeztük. A reakció indítása minden esetben az enzim

hozzáadásával kezdődött, majd az így kapott reakcióelegyet inkubáltuk 50 °C-on 10 percig. Az enzim aktivitásméréseket a mesterséges szubsztrátok esetén a 3.5.1-es, a természetes szubsztrát esetén a 3.5.2-es pontokban leírtaknak megfelelően végeztük.

A kinetikai paramétereiket a klasszikus Michaelis-Menten sebességi egyenlet alapján nemlineáris regresszióval, három párhuzamossal végzett mérés adatainak átlaga alapján, határoztuk meg, a GraFit 5.0 nevű szoftver segítségével (Leatherbarrow 2001).

3.12. A hőmérséklet és a pH hatása az enzim aktivitására és stabilitására

A hőmérséklet- és a pH-függés vizsgálatokat minden esetben pNP-Xyl szubsztrát jelenlétében hajtottuk végre a 3.5.1. pontban leírtaknak megfelelően. Az aktivitás pH-függésének vizsgálatánál a reakció elegyek 1 ml-es végtérfogata tartalmazta a szubsztrátot (2 mM) az enzimet (1.4 µg), valamint 3.0 és 7.5 közötti pH értékeknél 0.1 M citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ puffert, míg pH 8.0 és 8.5 közötti értékek esetében 0.1 M TRIS-HCl puffert használtunk, 10 perces inkubációs idővel 50 °C-on.

A TfbXyl43 aktivitásának hőmérséklet-függését különböző hőmérsékleteken vizsgáltuk 10 és 100 °C között, pH 6.0, 0.1 M-os citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ pufferben a fentebb leírtakkal megegyező enzim és szubsztrát mennyiségek mellett.

A TfbXyl43 pH-stabilitását különböző pH-k esetében szintén vizsgáltuk 500 µl-es végtérfogatú oldatokban, 0.2 µg/µl enzim koncentráció mellett, 0.1 M-os citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ pufferben pH 4.0 és 7.0 között 50 °C-on. Az enzim hőstabilitását hasonló körülmények között vizsgáltuk 50, 60 és 70 °C-on, pH 6.0, 0.1 M-os citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ puffer jelenlétében.

A stabilitás vizsgálatok esetében mindegyik enzim oldatból, meghatározott időpillanatokban 10 µl mintát vettünk, majd megmértük a minták maradék aktivitását a 3.4.1. pontban leírtak szerint, 0.5 mM pNP-Xyl szubsztráttal, 0.1 M-os pH 6.0 citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ pufferben, 10 percig, 50 °C-on. Minden esetben három párhuzamos mérés átlagából kapott adatok alapján dolgoztunk.

3.13. Transzferáz aktivitás vizsgálatok

A transzferáz aktivitás vizsgálatokat 500 µl-es végtérfogatú elegyekben hajtottuk végre, amely tartalmazta a 10 mM xilobiózt vagy pNP-Xyl-t mint donort, 30 mM para-aminofenil-1-tio-β-D-xilopiranozidot (pAP-1-S-X1) mint akceptort, 50 µg TfbXyl43

enzimet, illetve 0.1 M-os pH 6.0 citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ puffert. Az így előállított reakcióelegyeket 50 °C-on inkubáltuk, majd belőlük, meghatározott időpillanatokban mintát vettünk, amelyeket HPLC-s módszerrel vizsgáltuk a 3.10. pontban már leírt készülék és oszlop segítségével. Az elválasztás során gradiens elúciót alkalmaztunk, amelyben a kezdeti oldószer összetétel MeCN:H₂O; 95:5-ről 20 perc alatt 50:50-re változott. Az áramlási sebesség 1 ml/perc volt, az eluált termékeket pedig 260 nm-es hullámhosszon diódasoros detektorral (DAD) követtük nyomon.

Végül a HPLC-s vizsgálatokat követően a keletkezett termékeket MALDI-TOF módszerrel azonosítottuk (Gyémánt és munkatársai 2001).

3.14. A kinetikai paraméterek pH-függésének vizsgálata

A pNP-Xyl hasítására vonatkozó kinetikai paraméterek (k_{cat} , k_{cat}/K_M) meghatározása 0.1-7 K_M közötti szubsztrát-koncentráció tartományban történt 0.1 M-os citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ pufferben pH 4.5 és 7.5 között, reakcióelegyenként 1.4 μg enzim jelenlétében. A kinetikai paramétereket a 3.11. pontban leírtakhoz hasonlóan a klasszikus Michaelis-Menten sebességi egyenlet alapján, nemlineáris regresszióval, három párhuzamos mérés átlagából határoztuk meg. Az enzimből található, és a katalízisben közvetlenül résztvevő aminosav oldalláncok disszociációs állandóit a diprotikus enzim modell alapján határoztuk meg (Cornish-Bowden 1995) a GraFit 5.0 nevű szoftver alkalmazásával (Leatherbarrow 2001).

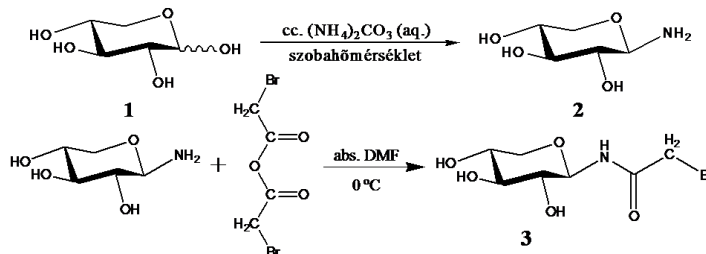
3.15. Inhibíciós vizsgálatok

Az inhibíciós vizsgálatokat, többféle szubsztrátanalóg vegyület felhasználásával végeztük, úgymint 1-tiometil-, 1-tioetil- és 1-tiopropil- β -D-xilopiranoziddal (0.01-2 K_i) valamint pAP-1-S-X1-al (0.1-10 K_i), β -D-xilopiranozil-aziddal (XylN₃) (0.1-10 K_i) és D-xilózzal (0.1-10 K_i). Az egyes K_i értékeket a Dixon-féle ábrázolás alapján határoztuk meg, 0.5 mM illetve 1 mM szubsztrát koncentrációt alkalmazva (Dixon 1953). Az aktivitásmérést a 3.5.1.-es pontban leírtaknak megfelelően végeztük. A kapott inhibíciós állandók, minden esetben, három párhuzamosan végzett reakció adatainak átlaga alapján kerültek meghatározásra.

3.16. A TfBXyl43 enzim kémiai módosítása

3.16.1. Az N-brómacetil- β -D-xilopiranozil-amin szintézise

Az N-brómacetil- β -D-xilopiranozil-amin (NBAXA) a TfBXyl43 enzim katalitikus aminosav oldalláncainak, mint potenciális affinitás jelölőjének szintézisét a következő séma szerint végeztük (16. ábra).



16. ábra. Az N-brómacetil- β -D-xilopiranozil-amin (NBAXA) szintézisének lépései.

Első lépésben a β -D-xilopiranozil-amint (**2**) szintetizáltuk a Kochetkov-féle aminálási módszer szerint (Likhosherstov és munkatársai 1986). (**1**) 5 g xilózt feloldottunk 10 ml desztillált vízben, majd pedig annyi $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ -ot adtunk az oldathoz, hogy az tútelítetté váljon. Ezt az elegyet 4 órán át kevertettük szobahőmérsékleten, közben pedig VRK-val (CH_2Cl_2 :MeOH; 6:4) követtük nyomon a reakció alakulását. Miután a xilóz elreagált, az elegyet szűrtük, a szűrletet -20°C -on lefagyasztottuk, majd pedig egy éjszakán át liofilizáltuk. A liofilizált port 20 ml forró MeOH-ba szuszpendáltuk, így a keletkezett β -D-xilopiranozil-amint feloldottuk, míg a feleslegben maradt $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ -ot nem. A kapott szuszpenziót leszűrtük, a szűrletet pedig vákuumban bepároltuk. A keletkezett (**2**) β -D-xilopiranozil-amin egy fehér por volt (4.4 g, 88%).

Második lépésben az NBAXA-t (**3**) a β -D-xilopiranozil-amin brómacetsav-anhidriddel történő brómacetilezéssel nyertük Kiss és munkatársai (2002) által megadott módszer szerint. Ehhez először elkészítettük a brómacetsav-anhidrid oldatot Thomas módszere szerint (Thomas 1977). Ennek során 2 g brómacetsavat oldottunk 2.5 ml abs. CH_2Cl_2 -ban argon alatt, majd jeges vízben 0°C -ra hűtöttük. Ehhez csepegtettük lassan az $\text{N,N}'$ -diciklohexilkarbodiimid (1.5 g) 2.5 ml-es abs. CH_2Cl_2 -os oldatát 0°C -on állandó kevertetés mellett. A reakcióelegyet ezután, 10 percig 0°C -on, majd 25 percig szobahőmérsékleten kevertettük. Végül a kicsapódott fehér színű $\text{N,N}'$ -diciklohexilkarbamidot leszűrtük és 2.5 ml abs. CH_2Cl_2 -nal mostuk.

Az így kapott brómacetsav-anhidrid (1.1 ekv, 7.37 mmol) oldatot, lassan csepegtetve, hozzáadtuk -5°C -on, az előzőleg 2.5 ml abs. dimetil-formamidban (DMF) feloldott β -D-

xilopiranozil-aminhoz (1 g; 6.7 mmol) állandó kevertetés mellett argon atmoszférában, majd az elegyet további 3 órán át kevertettük. Eközben a reakció előrehaladását VRK-val (CH_2Cl_2 :MeOH; 8:2) követtük. Ezután a felesleges CH_2Cl_2 -t vákuumban eltávolítottuk, a megmaradt DMF-es oldatot pedig oszlopkromatográfiával tisztítottuk (CH_2Cl_2 :MeOH; 7:3). A komponensek detektálást a 3.8. pontban leírtaknak megfelelően végeztük. A kromatográfia után 315 mg tiszta NBAXA-t kaptunk (18%-os hozam). Az így kapott terméket optikai forgatóképesség mérésével $[\alpha]_D +6.2^\circ$ (c 0.3 metanol) valamint ^1H és ^{13}C NMR módszerrel azonosítottuk Bruker AM-360 spektrométer segítségével (^1H , 360 MHz; ^{13}C , 90.75 MHz). NMR (CD_3OD); ^1H : δ 4.83 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 8.9 Hz, H-1), 3.85 (s, 2 H, Br- CH_2 -CO); ^{13}C : δ 174.21 (C=O) 82.13 (C-1) 78.83 (C-2), 73.78 (C-3) és 71.09 (C-4), 68.75 (C-5), 28.84 (CH_2 -Br) azonosítottuk amely értékek jó egyezést mutatnak az irodalmi adatokkal (Kiss és munkatársai 2002). Az így kapott NBAXA-t további felhasználásig szilárd halmazállapotban -20°C -on tároltuk.

3.16.2. A karboxilát oldalláncok specifikus kémiai módosítása

Az enzim karboxilát-csoportjainak specifikus kémiai módosítását 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDAC) katalizátor jelenlétében glicin-metil-észterrel hajtottuk végre (Lundblad és Noyes 1985). Az inaktíválódás kinetikájának vizsgálata során a TfBXyl43 enzimet (16 μg) 1 mM glicin-metil-észterrel 10 és 100 mM EDAC katalizátor jelenlétében inaktíváltuk 500 μl 100 mM pH 8.0-as foszfát puffert tartalmazó oldatban 50°C -on. Az inaktíválódás követésére meghatározott időpillanatokban az inaktíváló elegyből mintát vettünk (10 μl), és mértük az enzim maradék aktivitását 10 perces reakcióidővel, 1 mM pNP-Xyl szubsztráttal a 3.5.1. pontban leírtak szerint. Az összehasonlító elegy, a v_0 meghatározásához, ugyanazokat a komponenseket tartalmazta, mint az inaktíváló elegy, kivéve az EDAC-ot. Az így kapott eredmények alapján, a maradék aktivitások természetes alapú logaritmusát az idő függvényében ábrázoltuk (Kitz és Wilson 1962). Az így kapott egyenesek meredekségéből pedig meghatároztuk az egyes inaktívátor koncentrációkhoz tartozó látszólagos elsőrendű sebességi állandókat (k_{app}). Az inaktíválódási reakciókra jellemző kinetikai paramétereket, úgymint a látszólagos inaktívációs állandót (K_i), az inaktíváció sebességi állandóját (k_i) valamint az inaktíválódás hatékonyságát (k_i/K_i), az EDAC koncentrációk reciprokának függvényében ábrázolt $1/k_{\text{app}}$ értékek által adott egyenes alapján számítottuk ki (Kitz és Wilson 1962).

Azt, hogy az enzim aktív centrumában is bekövetkezik a kulcsfontosságú aminosav oldalláncok módosulása, kompetitív inhibitor jelenlétében történő inaktíválódás követésével

bizonyítottuk. Ennek során a TfbXyl43 enzimet (16 μg) 1 mM glicin-metil-észterrel, 70 mM EDAC-al inaktívtuk 10 mM β -D-xilopiranzil-azid (XylN_3) jelenlétében illetve annak hiányában 500 μl 100 mM pH 8.0-as foszfát puffer mellett 50 $^\circ\text{C}$ -on. Az inaktíválódást a reakcióelegyekből történő 10 μl -es minták aktivitásának lemérésével végeztük, a korábban leírtaknak megfelelően (lásd 3.5.1. pont).

Az inaktíválódás pH-függésének vizsgálatát az előzőekben leírtakhoz hasonló módon végeztük 70 mM EDAC és 1 mM glicin-metil-észter jelenlétében hét különböző pH-n 5.1 és 8.0 között 100 mM-os foszfát pufferben, pH 8.5-en és 9.0-en pedig 100 mM TRIS-HCl pufferben. Az egyes pH értékekhez tartozó látszólagos sebességi állandókat Kitz és Wilson módszere alapján határoztuk az előzőekben leírtak szerint. Az így kapott sebességi állandókat a pH függvényében ábrázoltuk, majd pedig a pontokhoz elméleti görbét illesztettünk a GraFit 5.0 program segítségével, így pedig meghatároztuk az inaktíválódott aminosav pK_A értékét (Leatherbarrow 2001).

3.16.3. Inaktívációs vizsgálatok NBAXA-val

A TfbXyl43 enzim inaktíválását szubsztrátanalóg N-brómacetil- β -D-xilopiranozil-aminallal (NBAXA) is elvégeztük. A kinetikai vizsgálatokat, ebben az esetben is 500 μl -es végtérfogatú reakcióelegyekben végeztük. Az egyes oldatok tartalmazták az enzimet (20 μg), az inaktívátort 20 és 100 mM közötti koncentráció tartományban és 200 mM-os pH 8.0-as foszfát puffert 50 $^\circ\text{C}$ -on. A maradék aktivitást és az inaktíválódás kinetikai paramétereit (k_{app} , K_i , k_i és k_i/K_i) az előzőekben leírtak szerint határoztuk meg illetve számítottuk ki (lásd 3.16.2. pont).

Az enzim aktív centrumának kémiai módosítással szembeni védelmét kompetitív inhibitor (β -D-xilopiranozil-azid) mellett történő inaktíválással bizonyítottuk. A mérés során a 20 μg β -D-xilozidáz enzimet 40 mM NBAXA-val inaktívtuk 10 mM β -D-xilopiranozil-azid jelenlétében, illetve annak hiányában, 500 μl 200 mM pH 8.0-as foszfát puffer mellett 50 $^\circ\text{C}$ -on. Az inaktíválódást, a korábban leírtak szerint, reakcióelegyekből történő 10 μl -es minták maradék aktivitásának lemérésével követtük nyomon (lásd 3.5.1. pont).

Az enzim kémiai módosításának pH-függését 40 mM NBAXA-val végeztük 50 $^\circ\text{C}$ -on hat különböző pH-n 5.2 és 8.0 között 200 mM foszfát pufferben, illetve pH 8.5-en és 9.0-en 200 mM TRIS-HCl puffer mellett. A kapott sebességi állandókat, az előzőekhez hasonlóan, ábrázolva a pH függvényében, és a pontokra elméleti görbét illesztve (GraFit 5.0, Leatherbarrow 2001) megkaptuk az inaktíválódott aminosav oldallánc pK_A értékét.

Az inaktíváló elegyek (500 μ l) minden esetben tartalmazták az enzimet (20 μ g), valamint 40 mM NBAXA-t, 200 mM pH 8.0 foszfát pufferben. Ezen elegyeket 50 °C-on inkubáltuk 40 mM XylN₃ (7.8 K_i) jelenlétében, illetve hiányában, majd pedig meghatározott időnként 10 μ l-es mintákat vettünk, amelyek segítségével meghatároztuk a kompetitív inhibitornak az inaktíválódásra gyakorolt hatását (lásd 3.5.1. pont).

Annak vizsgálatára, hogy a TfBXyl43 (50 μ g) aktív centrumában cisztein aminosav oldallánc módosult-e, az enzim reaktiválását 2-merkaptóetanol segítségével végeztük el. Ennek első lépése az volt, hogy az enzimet 40 mM NBAXA segítségével 200 mM pH 8.0 foszfát pufferben 6 órán át teljesen inaktíváltuk 50 °C-on. Ezt követően az inaktívátor feleslegét géلكromatográfiás módszerrel távolítottuk el egy PD-10 (GE Healthcare, 1.45×5.0 cm) oszlop segítségével. Ezután az enzimet 100 mM 2-merkaptóetanol oldatban inkubáltuk 3 órán át 50 °C-on.

3.16.4. CD spektroszkópiai vizsgálatok

A TfBXyl43 enzimet 40 mM NBAXA segítségével teljesen inaktíváltuk 50 °C-on 200 mM pH 8.0 foszfát pufferben. Ezt követően a 3.18. pontban leírtakhoz hasonlóan az inaktívátor feleslegét géلكromatográfiás módszerrel eltávolítottuk.

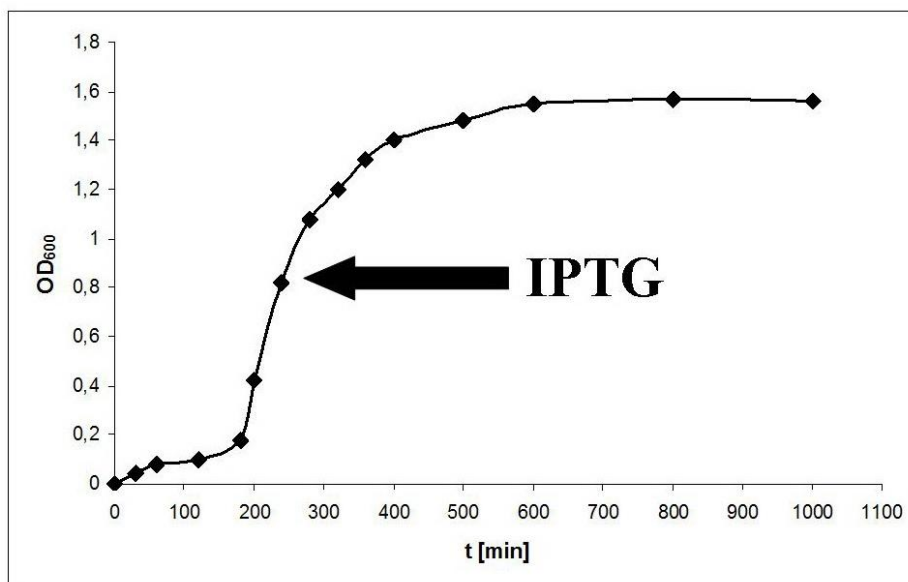
A CD spektrumokat Jasco-810 spektropolariméter segítségével rögzítettük 25 °C-on, 10 μ M aktív és 6.62 μ M NBAXA-val inaktívált enzimmel 10 mM pH=6.0-os foszfát puffer mellett 0.2 cm-es fény úthosszal rendelkező küvetában. Az aktív és inaktív enzimek másodlagos szerkezeti elemeinek a százalékos arányait a spektrumok dekonvolúciójával állapítottuk meg, amelyeket CONTINLL, CDSST és SELCON3 programok segítségével végeztünk el (Whitmore és Wallace 2004 és 2008).

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. A rekombináns TfbXyl43 enzim expressziója és tisztítása

A TfbXyl43 enzim heterológ expresszióját *E. coli* BL21(DE3) expressziós törzsben végeztük, amely tartalmazta az enzim génjét hordozó pET28(a) vektor konstrukciót. A pET vektor konstrukciókra az a jellemző, hogy a plazmidokba épített célgének expressziója IPTG-vel, a T7/lac hibrid promóter jelenlétének következtében, indukálható. Az IPTG hozzáadást követően a célgén előtt található T7/lac hibrid promóter operátor régiójáról leválik a LacI tetramer, így a szintetizálódott T7 RNS polimeráz hozzá tud kötödni a T7/lac hibrid promóterhez, és megindul a célgén transzkripciója.

Az enzim expresszióját, a tenyésztési körülmények változtatásával (IPTG koncentráció, indukció fázisa, aeráció) optimalizáltuk 37 °C-on. Ezen vizsgálatok alapján kiderült, hogy a legnagyobb enzimtermelési kihozatalt akkor érhetjük el, ha a tenyészeteket $OD_{600} = 0.7-0.9$ között indukáljuk 0.4 mM-os IPTG-vel és az aerációt 200 rpm-el végezzük. Azt követően, hogy a sejtek növekedése elérte a korai stacioner fázist ($OD_{600} \cong 1.4-1.6$) a tenyészetek növekedését leállítottuk. Ilyen körülmények között sikerült nagy mennyiségű szolubilis, nagy aktivitással rendelkező rekombináns xilán 1,4- β -xilozidáz enzimet előállítani. Egy ilyen tipikus növekedési görbét láthatunk a 17. ábrán.



17. ábra. A TfbXyl43 enzim génjét hordozó pET28(a) plazmiddal transzformált *E. coli* BL21(DE3) expressziós törzs növekedési görbéje 37°C-on, 50 μ g/ml kanamicin antibiotikum jelenlétében. Az ábrán az indukció látható, amely $OD_{600}=0.83$ -nál történt úgy, hogy az oldat koncentrációja IPTG-re nézve 0.4 mM-os legyen.

A megnevesztett tenyészetet ezután összegyűjtöttük, majd pedig a sejteket feltártuk a 3.3.1. és 3.3.2. pontokban leírtaknak megfelelően.

A feltárt, szonikált felülúszót először His-tag affinitás kromatográfiával előtisztítottuk (3.4.1. pont szerint). Ezt azért tehetjük meg, mert a rekombináns fehérje egy 6 hisztidinből álló fúziós peptid szakaszt tartalmazott a C terminális végén.

Az előzőekben kapott aktív frakciókat további anioncserélő (DEAE) kromatográfiás tisztításnak vetettük alá (lásd 3.4.2 pont). Azért választottuk ezt a módszert, mert az enzim aminosav szekvenciája alapján az elméletileg számított izoelektromos pont $pI=5.60$ -nak adódott. Ezt az értéket az ExPASy Proteomics Server-en található „Compute pI/Mw tool” (http://expasy.org/cgi-bin/pi_tool) alkalmazás segítségével határoztuk meg.

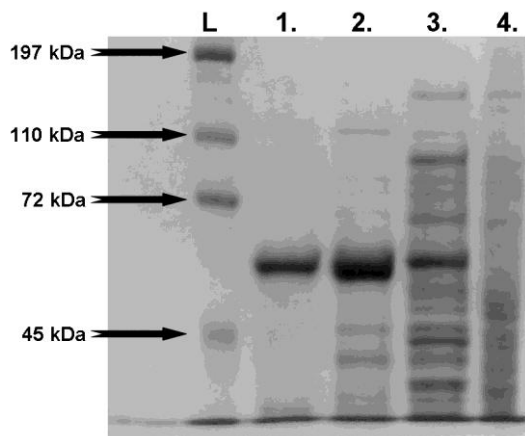
Az egyes tisztítási lépések után az aktivitás és a fehérje mennyiségének változásait a 1. táblázatban tüntettük fel. Az enzim aktivitását pNP-Xyl szubsztrát segítségével követtük a 3.5.1. pontban leírtak szerint, a fehérje mennyiségeket pedig a Bradford módszerrel (3.6.3. pontban leírtaknak megfelelően) határoztuk meg.

1. táblázat. A TfbXyl43 enzim tisztítási lépéseinek kihozatali táblázata 6×1 L *E.coli* BL21(DE3) tenyészet esetében.

Minta	Összfehérje mennyiség [mg]	Összaktivitás (U)[μ M/min]	Specifikus aktivitás [U/mg]	Kitermelés [%]
Szonikált felülúszó	1229.5	67.2	0.0546	100
HiTrap TM Chelating HP oszlopon megkötődött TfbXyl43	389.5	64.5	0.165	95.5
Pharmacia Sephadex DEAE (13 cm \times 3,8 cm; 150 ml) oszlopon megkötött TfbXyl43	224	61.3	0.274	91.2

1 U (unit) az a *para*-nitrofenolát mennyiség μ M-ban kifejezve, amely a reakció során felszabadul egy perc alatt.

Az egyes tisztítási lépések után kapott fehérje minták homogenitását SDS-PAGE módszerrel ellenőriztük (lásd 3.7.1. pont). Ezen vizsgálat során az enzim tisztulásának folyamatát követtük nyomon (18. ábra).



18. ábra. A TfBXyl43 enzim tisztítási lépéseinek SDS-PAGE analízise. Az egyes fehérje mintákat 8 %-os gélen futtattuk. **L.:** Fehérje Létra (BioRad, Prestained Broad Range SDS-PAGE Standard Cat.No. 161-0318); **1.:** DEAE Sepharose-al tisztított minta; **2.:** Amersham Hi Trap™ Chelating HP 5 ml-es oszloppal tisztított minta; **3.:** Szonikált felülúszóból vett minta; **4.:** Nem transzformált *E. Coli* BL21(DE3)-ből vett minta.

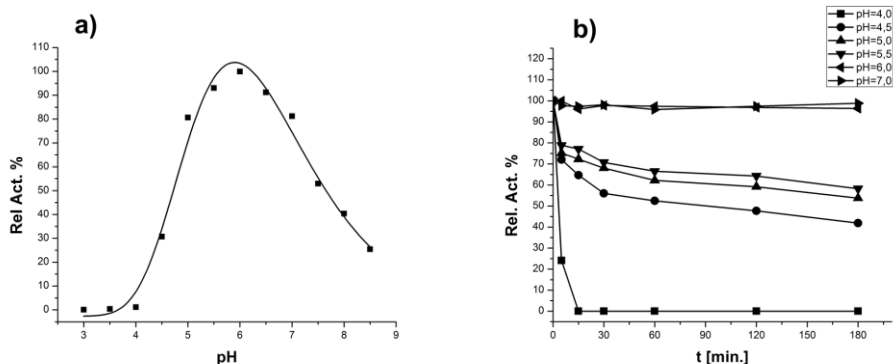
Az SDS-PAGE gélen jól láthatóan 61 kDa-nál egy erőteljes sáv jelenik meg, amely jó egyezést mutat TfBXyl43 enzim monomerjének számított molekulatömegével (http://expasy.org/cgi-bin/pi_tool alapján). Ez a sáv nem látható, a transzformálatlan *E. coli* BL21(DE3) mintában.

A rekombináns TfBXyl43 enzim expressziója során, a 6×1 L tenyészetből, a feltárt, szonikált felülúszóban összesen 245.6 mg (41 mg/L) enzim volt, amelyből a tisztítási lépések után 91.2 %-os kihozattal 224 mg (37.3 mg/L), több mint 95 %-os tisztaságú, fehérjét kaptunk (18. ábra). A tisztítás közben a specifikus aktivitás ötszörösére növekedett (1. táblázat). A további vizsgálatainkhoz az így kapott tiszta és homogén enzim oldatot használtuk fel.

4.2. A TfBXyl43 enzim biokémiai jellemzése

4.2.1 A pH és a hőmérséklet hatása az enzim aktivitására és stabilitására

Az optimális működési paraméterek meghatározásához, először megvizsgáltuk az enzim aktivitásának pH függését pH 3.0 és 8.5 közötti értékeken, míg a pH stabilitást 4.0 és 7.0 közötti értékeken követtük nyomon (19. ábra).

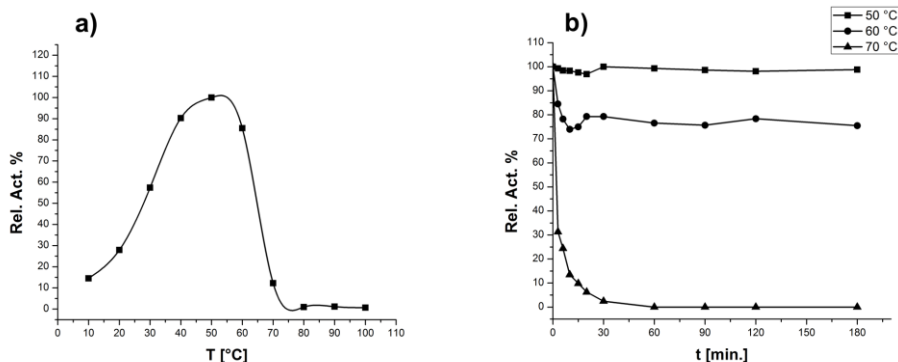


19. ábra. A pH hatása a TfBXyl43 enzim aktivitására illetve stabilitására. **(a)** A pNP-Xyl (2 mM) szubsztrát enzim (1.41 µg) hidrolízisének pH függése, pH 3.0-7.5 között 0.1 M citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ pufferben, pH 8.0 és 8.5 értékeken 0.1 M TRIS-HCl pufferben, 50 °C-on. **(b)** A pH hatása a TfBXyl43 enzim stabilitására pH 4.0 és 7.0 között, 0.1 M-os citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ pufferben 3 órán át 50 °C-on.

A kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy az enzim pH optimuma 6.0-nak (19a. ábra) adódott. Ezen felül a 19a. ábráról az is leolvasható, hogy az enzim a pH optimumához képest a savasabb tartományokban, egészen pH 5.0-ig, illetve a semlegesebb értékeknél egészen pH 7.0-ig még jelentős aktivitással (több mint 80 %) rendelkezik. Azonban pH 5.0 alatt és pH 7.0 feletti értékeknél már jelentősen veszít az enzim az aktivitásából. Ez a jelenség annak tudható be, hogy mind a savasabb illetve mind a bázikusabb pH-n az enzim aktív centrumában olyan aminosavak is protonálódnak illetve deprotonálódnak, amelyek alapvetően fontos szerepet játszanak a katalitikus folyamatban.

A pH-stabilitás vizsgálatok eredményei (19b. ábra) azt mutatják, hogy az enzim, a vizsgálat teljes időtartama alatt, leginkább a pH optimumán (pH 6.0) és semleges pH-n (pH 7.0) őrzi meg a stabilitását 50 °C-os inkubáció mellett. Azonban 3 óra inkubálás után savasabb pH értékeknél (pH 4.5-5.5) jelentős mértékben veszít (40-50 %) a stabilitásából. Viszont pH 4.0-nél kb. 15 perc inkubálás után teljesen elveszíti az aktivitását. Ezen vizsgálatok során tapasztalt jelenségek háttérében egyértelműen az áll, hogy az enzim pH optimuma alatti (pH 4.0-5.5) értékeknél olyan kulcsfontosságú felszíni aminosav oldalláncok is protonálódnak, amelyeknek a deprotonált állapotban való maradása elengedhetetlen lehet az enzim oldatfázisban tartásához.

A TfBXyl43 enzim aktivitásának hőmérsékletfüggését 10 és 100 °C közötti hőmérséklet tartományban, míg hőstabilitását 50, 60 és 70 °C-on vizsgáltuk (20. ábra).



20. ábra. A hőmérséklet hatása a TfBXyl43 enzim aktivitására illetve stabilitására. **(a)** A pNP-Xyl (2 mM) szubsztrát enzim (1.41 µg) hidrolízisének hőmérséklet függése, 0.1 M pH 6.0 citromsav/Na₂HPO₄×2H₂O puffer jelenlétében 10-100 °C közötti hőmérsékleteken. **(b)** A TfBXyl43 enzim hőstabilitásának vizsgálata 0.1 M pH 6.0 citromsav/Na₂HPO₄×2H₂O puffer jelenlétében 3 órán át 50, 60 és 70 °C-on.

A 20a. ábra adataiból kiderül, hogy az enzim hőmérséklet optimuma egyértelműen 50 °C-on van. Továbbá az ábrából az is kiolvasható, hogy az enzim aktivitásának több mint 85 %-a megmarad 40 és 60 °C-os hőmérsékleten. 10 és 30 °C között pedig a rendszer hőmérséklete még nem elegendő ahhoz, hogy az enzim felvegye a katalitikusan leghatékonyabb konformációját, míg 60 °C felett a jelentős aktivitás csökkenés az enzim denaturációjával magyarázható.

Az enzim hőstabilitásának vizsgálata (20b. ábra) során egyértelműen kiderült, hogy az optimuma feletti hőmérsékleten (60 és 70 °C) különböző mértékben ugyan, de veszít az aktivitásából a vizsgált időtartam alatt. 60 °C-on kb. 20 %-os aktivitás csökkenés tapasztalható 20 perc elteltével, amely a reakció további részében már nem változik. 70 °C-on azonban már 60 perc inkubálás után az enzim teljesen elveszíti az aktivitását. Ezek alapján az enzim fél élettideje 7.4 percrek, míg a hő inaktiválás állandója $1.69 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ -nek adódott. Ennek háttérében az áll, hogy az egyre magasabb hőmérsékletek egyre nagyobb intramolekuláris hőmozgást indukálnak, amelynek következtében az enzim egyre kevésbé tudja megtartani a biológiailag aktív konformációját, és így denaturalódik. A TfBXyl43 magasabb hőmérsékleten mutatott hőérzékenysége nagy hasonlóságot mutat a *Thermobifida fusca* TM51-ből származó β-D-mannozidáznál kapott eredményekkel (Béki és munkatársai 2003).

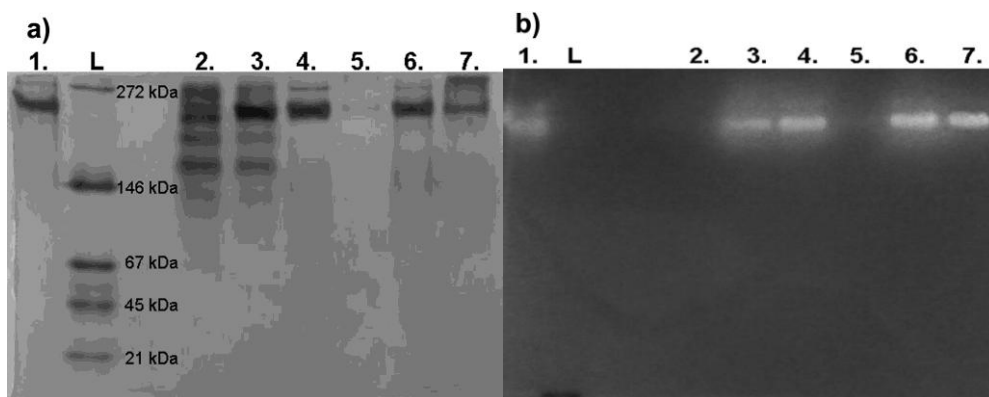
Az enzim aktivitásának illetve, stabilitásának pH- valamint hőmérséklet-függésének vizsgálata alapján kapott eredmények tükrében kimondhatjuk, hogy a TfBXyl43 optimális stabilitási körülményei nagymértékben megegyeznek az aktivitás optimális paramétereivel

(pH 6.0, 50 °C). Ennek a legkésebb bizonyítéka az, hogy az enzim ezen körülmények között több mint 168 órán át képes volt 100 %-ban megtartani az aktivitását. Ez nem minden enzim esetében van így, ugyanis például az *Aspergillus Carbonarius*-ból izolált xilán 1,4- β -xilozidáz esetében az aktivitás hőmérséklet optimuma 60 °C, míg a stabilitás hőmérséklet optimuma 50 °C (Kiss és Kiss 2000). Ezek az eredmények bizonyítják továbbá azt is, hogy a TfBXyl43 valóban egy termofil enzim, amely semleges, valamint enyhén savas közegben működik a leghatékonyabban.

Összességében elmondhatjuk, hogy a xilán 1,4- β -xilozidáz enzimnek mind a pH, mind pedig a hőmérséklet optimum adatai nagyon közel esnek a korábban már közölt *Thermobifida fusca*-ból származó intracelluláris β -D-mannozidáz, illetve β -D-glükozidáz enzimek optimális paramétereikhez (Béki és munkatársai 2003, Spiridonov és Wilson 2001).

4.2.2. Az enzim natív molekulatömegének meghatározása és zimográfias vizsgálata

A TfBXyl43 enzim natív molekulatömegének meghatározását, valamint zimográfias vizsgálatát a 3.7.2. pontban leírtaknak megfelelően natív PAGE módszerrel végeztük el. Az analízis során az egyes mintákat különböző kémiai és fizikai hatásoknak tettük ki vizsgálva azt, hogy milyen jellegű kölcsönhatások tarthatják egyben az enzim esetleges negyedleges szerkezetét (21. ábra).



21. ábra. Az enzim vizsgálata natív PAGE módszerrel. (a) A különböző módon kezelt fehérje mintákat 8 %-os natív PAGE gélen futtattuk. (b) A zimográfias vizsgálatot 10 mM 4-metilumbelliferil- β -D-xilopiranzid szubsztráttal végeztük 100 mM pH 6.0-os citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ puffer jelenlétében, 20 percen át, 50 °C-on. A reakció során felszabadult 4-metilumbelliferolt 354 nm-es gerjesztő UV fény mellett fluoreszcenciásan 460 nm-es hullámhosszon detektáltuk. **1.:** kezeletlen kontroll; **L.:** Natív fehérje létra (Serva Native Marker Cat.No. 39219.01); **2.:** 1 % SDS-el 70 °C-on 20 percig hőkezelt minta; **3.:** 1 % SDS-el kezelt minta; **4.:** 5 mM DTT-vel kezelt minta; **5.:** 5 mM DTT-vel 70 °C-on 20 percig hőkezelt minta; **6.:** 5 mM EDTA-val kezelt minta; **7.:** 5 mM EGTA-val kezelt minta.

A 21a. ábrán, jól láthatóan az enzim 240-250 kDa környékén, egyetlen sávként jelenik meg, amely közel négyszer akkora, mint az SDS-PAGE vizsgálatoknál kapott 61 kDa molekulatömeg érték (18. ábra). Ez az eredmény bizonyítja, hogy a *Thermobifida fusca*-ból származó xilán 1,4- β -xilozidáz, natív körülmények között, egy homotetramer fehérje, amiből egyértelműen következik, hogy van negyedleges szerkezete. Hasonló eredményre jutottak a *Geobacillus stearothermophilus* illetve a *Selenomonas ruminantium* ugyancsak a GH43-as családba tartozó xilán 1,4- β -xilozidázainak röntgenkristallográfiás vizsgálatai során is (Brüx és munkatársai 2006, Brunzelle és munkatársai 2008).

A 21b. ábrán, a zimográfiás vizsgálatok pedig láthatóan azt mutatják, hogy az enzim egyedül a tetramer formájában aktív. Ezen felül pedig az is jól látható, hogy az enzim negyedleges szerkezete, és ebből kifolyólag az aktivitása is, ellenállt mind az 5 mM-os DTT-nek (4.), mind az EDTA-nak (6.) illetve EGTA-nak (7.). Ezen eredmények bizonyítják, hogy az enzim negyedleges szerkezetének kialakításában nem játszanak szerepet sem a diszulfid hidak sem pedig fém ionok. Az 1 %-os SDS-nek (3.) azonban sikerült részben degradálnia a fehérje negyedleges szerkezetét, aminek az oka feltehetően az lehet, hogy az SDS a negyedleges szerkezetet fenntartó hidrofób kölcsönhatásokat részben megszünteti. Viszont minden olyan esetben (2. és 5. minta), ahol 20 perces hőkezelésnek tettük ki az enzimet 70 °C-on, az teljes mértékben és irreverzibilis módon elvesztette aktivitását, összhangban a korábban tett megállapításokkal (5.1.2. pont).

4.3. A xilán 1,4- β -xilozidáz enzim kinetikai paramétereinek meghatározása

Az enzim kinetikai paramétereinek, és egyúttal szubsztrát specifikitásának, meghatározását a 3.11. pontban leírtak szerint végeztük el, mind természetes (xilobióz) mind, mesterséges (pNP-Xyl, pNP-Ara, pNP-Glc) szubsztrátok esetén. A vizsgálatok során kapott kinetikai paraméterek az alábbi táblázatban kerültek összefoglalásra (2. táblázat).

2. táblázat. A TfbXyl43 enzim kinetikai paramétereinek összefoglaló táblázata.

Szubsztrát	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ ×mM ⁻¹]
pNP- β -D-xilopiranozid	0.71±0.05	117.5±2.2	165.5±4.1
xilobióz	1.55±0.15	63.5±3.2	41±2.3
pNP- α -L-arabinopiranozid	—	—	—
pNP- β -D-glükopiranozid	—	—	—

Az egyes kinetikai értékeket nemlineáris illesztéssel, a GraFit 5.0 nevű szoftver segítségével, határoztuk meg három párhuzamos adat átlagainak alapján. A reakciókat 0.1 M pH 6.0 citromsav/Na₂HPO₄×2H₂O pufferben 1.41 μ g enzim jelenlétében végeztük, 10 percen át 50 °C-on.

A feltüntetett K_M értékek azt mutatják, hogy a pNP-Xyl összességében jobban kötődik az enzimhez, mint a xilobióz. Ez azt jelenti, hogy az enzim aktív centrumának aglikon kötőhelyén hidrofób karakterű aminosav oldalláncok játszanak szerepet a szubsztrát kötésben.

A k_{cat} értékeket szemügyre véve azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az enzim közel kétszer olyan gyorsan képes elbontani a pNP-Xyl-t mint a xilobiózt. Ennek oka abban keresendő, hogy a 4-Nitrofenil csoport sokkal jobban távozó, mint a xilozil csoport. A 2. táblázatban feltüntetett k_{cat} értékeket összehasonlítva a más enzimeknél mértekkel kiderül, hogy a TfBXyl43 sokkal gyorsabban képes hasítani a szubsztrátját, mint például az *Aspergillus awamori* X-100-ból (17.5 s^{-1}) (Eneyskaya és munkatársai 2007), vagy a *Geobacillus palladius*-ból (18.9 s^{-1}) származó enzimek (Quintero és munkatársai 2007) esetében.

A hasítási hatékonyság értéke (k_{cat}/K_M) az enzimnek közel négyszer nagyobb a pNP-Xyl szubsztrátnál, mint a xilobióznál. Összességében kijelenthetjük, hogy a pNP-Xyl sokkal jobb szubsztrátja az enzimnek, mint a xilobióz.

3. táblázat. Különböző bakteriális, valamint fungális szervezetekből származó xilán 1,4- β -xilozidáz enzimek aminosav szekvencia azonosságának és katalitikus hatékonyságának összehasonlító táblázata.

Katalitikus hatékonyság (k_{cat}/K_M)					
Organizmus	Aminosav szekvencia		pNP-Xyl	xilobióz	Referencia
	egyezés	hasonlóság			
<i>Thermobifida fusca</i> TM51 GH43	-	-	$165 \text{ s}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$	$41 \text{ s}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$	-
<i>Bacillus halodurans</i> C-125 GH39	28%	38%	$0.61 \text{ s}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$	-	Smaali és munkatársai 2006
<i>Aspergillus awamori</i> X-100 GH3	36%	46%	$70 \text{ s}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$	-	Eneyskaya és munkatársai 2007
<i>Bacillus halodurans</i> C-125 GH43	48%	64%	$2.75 \text{ s}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$	-	Smaali és munkatársai 2006
<i>Selenomonas ruminantium</i> GH43	46%	60%	$44.2 \text{ s}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$	$90.2 \text{ s}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$	Jordan és munkatársai 2007; Jordan 2008
<i>Bacillus pumilus</i> GH43	43%	59%	$5.1 \text{ s}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$	$6.2 \text{ s}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$	Kerstens-Hilderson és munkatársai 1969
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> IT-08 GH43	34%	51%	$0.33 \text{ s}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$	$0.0051 \text{ s}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$	Wagschal és munkatársai 2009
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> T-6 GH43	45%	60%	$3.3 \text{ s}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$	-	Shallom és munkatársai 2005

A 3. táblázat adataiból megállapítható, hogy az általunk vizsgált enzim lényegesen hatékonyabban bontja a pNP-Xyl-ot, mint az összes többi törzsből származó enzim. A vizsgált enzimek közül a *Selenomonas ruminantium*-ból származó enzim hatékonyabban, míg a másik két enzim sokkal kevésbé hatékonyabban képes bontani a xilobiózt.

A TfBXyl43 azonban nem fejtett ki semmilyen hidrolitikus aktivitást a pNP-Ara szubsztráton. Ennek magyarázata abban keresendő, hogy a C-4 helyzetű hidroxil csoport fontos szerepet tölthet be a szubsztrát kötődésben, ellentétben például az *Aspergillus carbonarius*-ból izolált vagy a *Geobacillus thermoleovorans IT-08*-ból származó xilán 1,4- β -xilozidázzal, amelyek esetében sikerült α -L-arabinozidáz aktivitást is kimutatni (Kiss és Kiss 2000, Wagschal és munkatársai 2009). Ezen kívül az enzimnek a pNP-Glc szubsztráton sem volt kimutatható aktivitása, amely azzal magyarázható, hogy a glükózon a C-5-ös pozícióban lévő hidroxil-csoport jelenléte a molekulában, szterikus gátként megakadályozza a molekula megfelelő kötődését az enzim aktív centrumába.

Ezen megállapításokat összegezve kimondhatjuk, hogy a TfBXyl43 enzim a szubsztrát glikon részére nézve nagy specifitást mutat, tekintettel arra, hogy kizárólag xilóz-tartalmú szubsztrátokon fejtett ki aktivitást. Ezzel szemben az aglikon részre nézve már nem tapasztaltunk ilyen nagyfokú specifitást, mivel mind a xilozil-, mind pedig a 4-Nitrofenil-csoportokat tartalmazó szubsztrátokat, amelyek meglehetősen különböző kémiai karakterűek, egyaránt képes volt hidrolizálni.

4.4. A kinetikai paraméterek pH-függésének vizsgálata

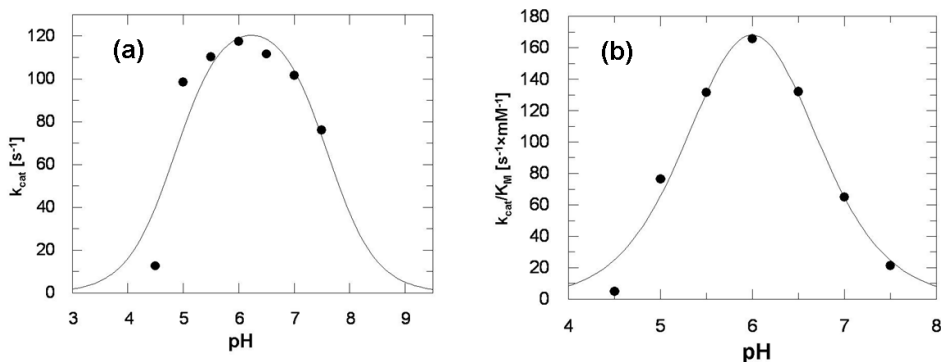
A kinetikai paraméterek (k_{cat} , k_{cat}/K_M) pH-függésének analízise alapvetően fontos információt szolgáltat a katalitikusan aktív aminosav oldalláncok savi disszociációs állandóiról valamint azok protonáltsági fokáról. Ezen vizsgálatokat a 3.14. pontban leírtak szerint hajtottuk végre. Amíg a k_{cat} pH függése révén az enzim-szubsztrát komplexben lévő katalitikus aminosav oldalláncok savi disszociációs állandóit lehet meghatározni (22a ábra), addig a k_{cat}/K_M pH-függéséből ugyanezen értékeket lehet megadni szabad enzim esetében (22b ábra). A TfBXyl43 enzim kísérletileg meghatározott pH-függő k_{cat} és k_{cat}/K_M adataira illeszkedő elméleti görbét az (1) és (2) egyenletek alapján számítottuk ki.

$$k_{cat} = \frac{\tilde{k}_{cat}}{1 + ([H^+] / K_{ES1}) + (K_{ES2} / [H^+])} \quad (1)$$

$$k_{cat}/K_M = \frac{\tilde{k}_{cat}/\tilde{K}_M}{1 + ([H^+]/K_{E1}) + (K_{E2}/[H^+])} \quad (2)$$

Ahol \tilde{k}_{cat} és $\tilde{k}_{cat}/\tilde{K}_M$ a pH-tól független kinetikai paramétereket, a K_{ES1} és a K_{ES2} az enzim-szubsztrát komplexre vonatkozó, míg a K_{E1} és K_{E2} pedig a szabad enzimre vonatkozó savi disszociációs állandó értékeket jelentik.

Így a k_{cat} pH-függése alapján számolt disszociációs állandók az enzim-szubsztrát komplex esetében $pK_{ES1}=4.85\pm 0.23$ és $pK_{ES2}=7.60\pm 0.28$ -nak adódtak (22a. ábra). A k_{cat}/K_M pH-függését vizsgálva, a szabad enzimre vonatkozóan a legjobban illeszkedő haranggörbét $pK_{E1}=5.55\pm 0.19$ és $pK_{E2}=6.44\pm 0.19$ esetében kaptuk (22b. ábra).



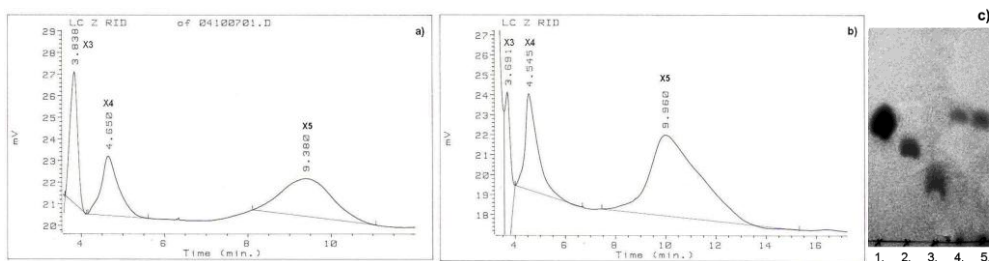
22. ábra. Az enzim kinetikai paramétereinek (k_{cat} (a) és a k_{cat}/K_M (b)) pH-függésének vizsgálata 0.1-5 mM közötti szubsztrát koncentráció tartományt alkalmazva, 0.1 M citromsav/ $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ puffer jelenlétében, pH 4.5 és 7.0 között 1.41 μg enzim mellett végeztük, 10 percen át 50 °C-on. A kapott pontokhoz legjobban illeszkedő görbéket, és így az egyes savi disszociációs állandókat, nemlineáris illesztéssel az (1) és (2) egyenlet alapján határoztuk meg.

A kapott elméleti görbék igen jó egyezést mutattak, a különböző pH-kon meghatározott k_{cat} és k_{cat}/K_M kísérleti értékekkel (22a. és 22b. ábra) így jogosan következtethetünk arra, hogy két ionizálható aminosav oldallánc játszik szerepet a szubsztrát hidrolízisében. Az enzim pH optimumán ezek közül az egyik deprotonált, míg a másik protonált formában van jelen (Cornish-Bowden 1995).

Ezek az eredmények együttesen azt mutatják, hogy a TfBXyl43 aktív centrumában egy katalitikus nukleofil és egy katalitikus sav/bázis oldallánc együttes jelenléte szükséges a szubsztrát sikeres hidrolíziséhez. Hasonló eredményekről számoltak be korábban az *Aspergillus carbonarius*-ból valamint az *Aspergillus awamori* X-100-ból izolált xilán 1,4- β -xilozidázok esetében (Kiss és munkatársai 2002, Eneyskaya és munkatársai 2007).

4.5. Az enzim szubsztrát-specifitásának vizsgálata xilooligomerekre

Miután korábban az 4.3. pontban megállapítottuk azt, hogy a TfBXyl43 a természetes szubsztrátjai közül a xilobiózt képes elbontani, megvizsgáltuk azt is, hogy milyen más polimerizáció-fokú xilooligomereken tudja még az enzim a hidrolitikus aktivitását kifejteni. Ennek meghatározását HPLC-s analízissel, a 3.10. pontban leírtaknak megfelelően végeztük. Ezek alapján az enzim hidrolitikus aktivitását xilotrióz, xilotetraóz és xilopentaóz szubsztrátokon vizsgáltuk meg. A meghatározás során az alkalmazott detektorra (törésmutató index, RI) való tekintettel izokratikus elúciót kellett alkalmaznunk. Először az enzimet nem tartalmazó elegyet mértük meg (23a. ábra), majd pedig az enzim hozzáadását követően 3 óra elteltével újra lemértük a reakcióelegyet (23b. ábra). A xilobióz és xilotrióz teljes enzimatis hidrolízisét pedig VRK módszerrel követtük (23c. ábra).



23. ábra. A TfBXyl43 enzim szubsztrát-specifitásának meghatározása különböző polimerizáció-fokú xilooligomerekre. A HPLC-s analízist izokratikus elválasztással, MeCN:H₂O 6:4 arányú eluens összetétel mellett végeztük. **(a)** a xilotriózt, -tetraózt és -pentaózt tartalmazó elegy az enzim hozzáadása előtt, 100 mM pH 6.0 citromsav/Na₂HPO₄×2H₂O puffer jelenlétében. **(b)** az enzim (30 µl, 15 µg) által hidrolizált reakció elegy 3 óra inkubáció után 50 °C-on. **(c)** A xilobióz és xilotrióz enzimatis hidrolízisének VRK-s vizsgálata egy óra után 15 µg TfBXyl43 jelenlétében, i-BuOH:EtOH:H₂O-t (5:5:3) alkalmazva mozgó fázisként: 1. xilóz, 2. xilobióz, 3. xilotrióz a reakció kezdetén; 4. xilobióz és 5. xilotrióz hidrolizátumok 1 óra enzimatis emésztést követően.

Összehasonlítva a 23a. és 23b. ábrákon látottakat megállapíthatjuk, hogy az enzim hatására csak a xilotrióz mennyiségében tapasztalható jelentős csökkenés, míg xilotetraóz és xilopentaóz esetében nem tapasztalható érdemi változás. A 23c. ábra pedig azt mutatja, hogy ez enzim nemcsak a xilobiózt, hanem a xilotriózt is xilózzá bontja. Ezen eredmények azt bizonyítják, hogy a xilotrióznál magasabb polimerizáció-fokú xilooligomerek már nem szubsztrátjai az enzimnek.

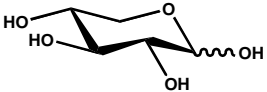
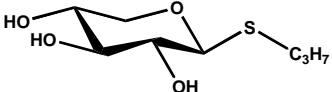
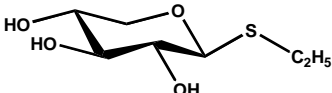
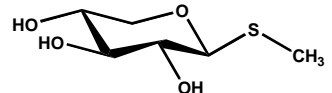

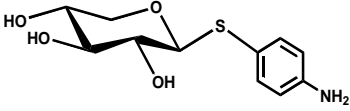
Ezen megállapítások alapján kijelenthetjük, hogy a TfBXyl43 enzim valóban egy exo-hidroláz, amely a háromnál magasabb polimerizáció-fokú oligomereket már egyáltalán nem képes hidrolizálni.

4.6. Inhibíciós vizsgálatok

Az enzim működése szempontjából igen nagy jelentőséggel bír a szubsztrátkötő hely feltérképezése. Ennek részletesebb tanulmányozása érdekében szükségesnek láttuk inhibíciós vizsgálatok elvégzését is.

Amint az a korábbi kinetikai vizsgálatok során kiderült (4.3. pont) a TfBXyl43 igen nagy specifitást mutat a szubsztrát glikon gyűrűjének sztereokémiájára, jelezve ezáltal annak jelentőségét a megkötődésben. Mivel az enzim sem a pNP-Ara-t sem pedig a pNP-Glc-t nem volt képes hidrolizálni, így levonhattuk azt a következtetést, hogy mind a C-4 helyzetű hidroxil csoport térállása, mind pedig a C-5 helyzetű hidroximetil csoport hiánya egyaránt fontos a szubsztrát aktív centrumba történő megfelelő illeszkedésében. Ugyanakkor a különböző aglikonnal rendelkező xilóz származékok, különböző mértékben ugyan, de gátolták az enzim működését (4. táblázat). Ezen vegyületek, mind kompetitív módon kötődtek az enzimhez. Az inhibíciós vizsgálatokat a 3.15. pontban leírtaknak megfelelően végeztük.

4. táblázat. A TfBXyl43 enzim kompetitív gátlószereinek inhibíciós állandó (K_i) értékeinek összefoglaló táblázata különböző aglikonnal rendelkező β -D-xilopiranozid származékok esetében.

Kompetitív inhibitorok	Szerkezet	K_i [mM]
D-xilóz		67
Propil-1-tio- β -D-xilopiranozid		14.4
Etil-1-tio- β -D-xilopiranozid		12.8
Metil-1-tio- β -D-xilopiranozid		10.7
β -D-xilopiranozil-azid		5.1
<i>para</i> -aminotiofenil-1-tio- β -D-xilopiranozid		4.5

A meghatározásokat 0.1 M pH=6.0-os citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ puffer jelenlétében, 0.5 mM és 1 mM pNP-Xyl mellett végeztük 10 percen át 50 °C-on. A kapott K_i értékeket Dixon módszere alapján határoztuk meg (Dixon 1953).

A kapott inhibíciós állandók értékei alapján kijelenthetjük, hogy a D-xilóz a legkisebb, míg a para-aminofenil-1-tio- β -D-xilopiranozid valamint a β -D-xilopiranzil-azid a legnagyobb affinitással kötődik az enzim aktív centrumába.

A K_i alapján a D-xilózáról azt mondhatjuk, hogy nem igazán hatékony gátlószere az enzimnek, ennek azonban fontos élettani jelentősége lehet az enzim, ezáltal pedig maga sejt működésére nézve.

A vizsgált vegyületek közül az előbbihez képest, az metil-1-tio- β -D-xilopiranozid, etil-1-tio- β -D-xilopiranozid és az propil-1-tio- β -D-xilopiranozid már hatékonyabb inhibitoroknak bizonyultak. Ez azt jelzi, hogy az alifás oldalláncok hidrofób karakterének van jelentősége az enzim aktív centrumába történő kötődés esetén. Ráadásul a tiometil, tioetil és tiopropil csoportokat tartalmazó vegyületek esetében egyre kisebb affinitás mutatkozik a kötődést illetően, ami arra utal, hogy az alifás láncok méretének növekedése nem kedvez a megfelelő enzim-inhibitor komplex kialakulásának.

A TfBXyl43 enzim aktív centrumába a legnagyobb affinitással a β -D-xilopiranozil-azid illetve a para-aminofenil-1-tio- β -D-xilopiranozid vegyületek kötődtek. Ezek az adatok azt bizonyítják, hogy a hidrofób jelleg mellett, igen jelentős π - π kölcsönhatások is szerepet játszanak az inhibitor kötődésében, amennyiben az aglikon aril- vagy azid-csoport.

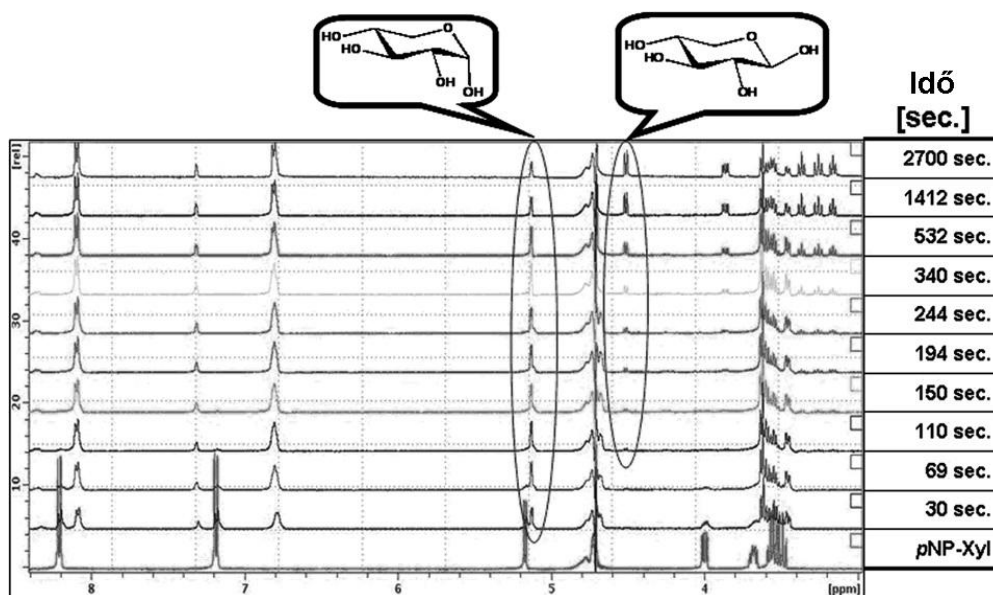
Összegezve az inhibíciós és a kinetikai (4.3. pont) vizsgálatok eredményeit azt mondhatjuk, hogy a TfBXyl43 aktív centrumában, az aglikon-kötőhelyen egy vagy több aromás oldallánc vesz részt a szubsztrát vagy inhibitor megkötésében. Ezek hasonlóságot mutatnak a *Penicillium wortmanni*-ből izolált xilán 1,4- β -xilozidázoknál tett következtetésekkel (Deleyn és munkatársai 1980).

4.7. Az enzimreakció sztereoszelektivitásának időbeli követése $^1\text{H-NMR}$ segítségével

Azért, hogy választ kapjunk arra a kérdésre, hogy az enzim milyen mechanizmus szerint (2.4.2.1. pont) hasítja a szubsztrátját (pNP-Xyl), vizsgáltuk a reakció során keletkező termék(ek) anomer konfigurációjának időbeli változását, $^1\text{H-NMR}$ segítségével. A vizsgálatot a 3.9. pontban leírtaknak megfelelően végeztük. Ennek során az enzim viszonylag nagy mennyiségben volt jelen (2 mg) a pNP-Xyl szubsztráthoz képest (2 mg) annak érdekében, hogy rövid idő alatt olyan jelentős mennyiségű termék felszabadulás

következzen be, amely nagy biztonsággal detektálható a módszer adta keretek között, még azelőtt, hogy az tovább alakulhatna.

A hidrolízis időbeli követése során, közvetlenül a reakció elején, a 30. másodpercnél egy új dublett megjelenését tapasztaltuk, 5.17 ppm-es kémiai eltolódással és 3.57 Hz-es csatolási állandóval, amely egyértelműen a keletkező termék (D-xilóz) α anomer konfigurációjára utal (24. ábra).



24. ábra. A TfBXyl43 enzim (2 mg) által hidrolizált pNP-Xyl szubsztrát (2 mg) reakciójának időbeli követése ^1H -NMR spektroszkópiával. A hidrolízist 50 mM-os pH 6.0 deuterált citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ puffert mellett végeztük 27 °C-on. A legelső spektrum a pNP-Xyl-ről készült az enzim hozzáadása előtt.

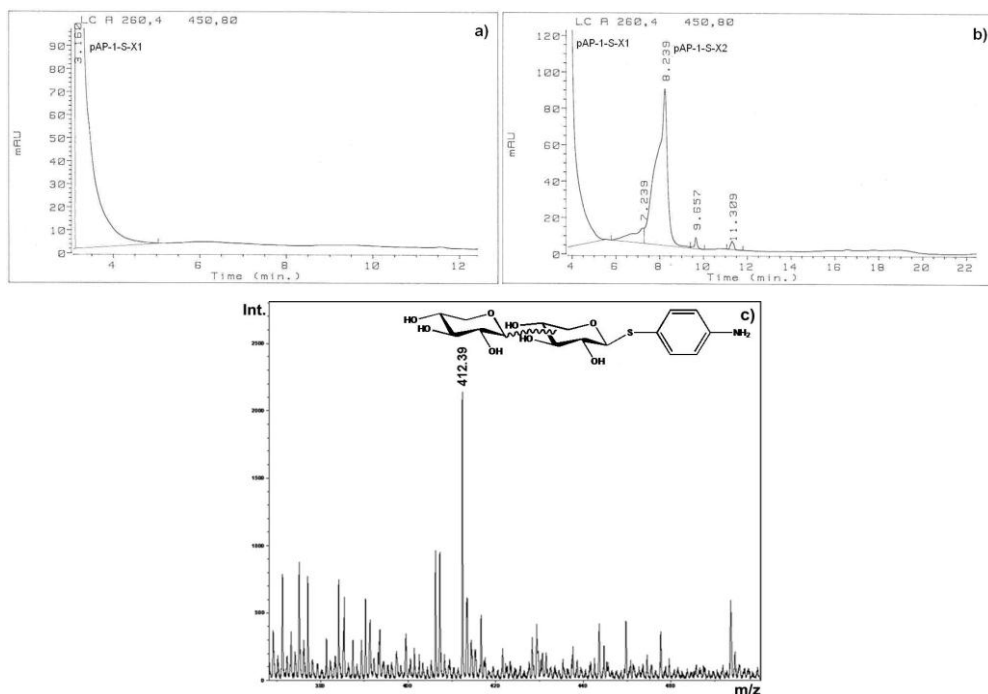
Az enzim hozzáadását követően látható, hogy a 30. valamint a 69. másodpercnél rögzített spektrumok esetén a kiindulási anyag még jelen van a rendszerben, míg a 110. másodpercben rögzített spektrumnál jól látható, hogy a szubsztrát teljesen elfogyott, a hidrolitikus folyamat lejátszódott.

A 110. másodperchez tartozó spektrumban egy újabb dublett (4.52 ppm-es kémiai eltolódással és 7.27 Hz-es csatolási állandóval) jelent meg, ami a mutarotáció következtében keletkező β -anomer megjelenésére utal (24. ábra). A β -anomer viszonylag gyors keletkezésének legfőbb oka ilyen alacsony hőmérsékleten (27 °C, amikor az enzim hőmérséklet optimuma 50 °C) az, hogy a xilóz - lévén, hogy egy pentóz - konformatív sokkal instabilabb, mint általában a hexózok, ezért a mutarotációja is sokkal gyorsabban következik be.

A $^1\text{H-NMR}$ mérések alapján bizonyítást nyert az a tény, hogy az általunk vizsgált TfBXyl43 a szubsztrátját (pNP-Xyl), inverziós mechanizmus szerint hidrolizálja (4b. ábra).

4.8. A TfBXyl43 enzim transzferáz aktivitásának vizsgálata

Az 4.7. pontban kapott eredmények alapján bizonyítottuk, hogy a TfBXyl43 enzim inverziós mechanizmus szerint hasítja a szubsztrátját (pNP-Xyl). Ennek fényében különösen érdekesnek bizonyult az, amikor a 3.13. pontban leírtak szerinti reakcióelegyet megvizsgálva a HPLC-s kromatogramon egy új, addig ismeretlen termék megjelenését tapasztaltuk az előzetesen várt D-xilóz és pNP mellett (25. ábra).



25. ábra. A TfBXyl43 enzim transzferáz aktivitásának vizsgálata. **(a)** a kontrol oldat, amely tartalmazza a donort (pNP-Xyl, 10 mM, 200 μl) az akceptort (pAP-1-S-X1) és a puffert (270 μl , 10 mM-os pH 6.0 citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) az enzim nélkül 50 °C-on. **(b)** az enzim (30 μl , 50 μg) hozzáadása után a reakcióelegy 3 óra inkubáció után 50 °C-on. **(c)** a reakcióelegy MALDI-TOF módszerrel felvett tömegspektruma.

3 órás inkubáció után a reakcióelegy vizsgálata során egy új termék jelent meg a kromatogramon 8.2 perces retenciós idővel, amelynek 260 nm hullámhosszon elnyelése volt (25b. ábra). Ezek alapján ez csak olyan termék lehetett, amelynek rendelkeznie kellett para-aminotiofenil csoporttal, mivel csak az ilyen funkcióval rendelkező anyagok nyelnek el ezen hullámhosszon. Az újonnan megjelenő terméket további MALDI-TOF MS vizsgálatoknak

vetettük alá, amely alapján kiderült, hogy az új termék molekulatömege (m/z) 412.39-nek adódott amely a para-aminofenil-1-tio- β -D-xilobiozidnak (pAP-1-S-X2, C₁₆H₂₃NO₈Na) felel meg (25c. ábra). A pAP-1-S-X2 keletkezése az enzim reakció során bizonyítja az enzim transzglykozilező aktivitását, amelynek következtében a pNP-Xyl donor hidrolízise során egy xilozil csoportot átvitt a pAP-1-S-X1 akceptorra.

Hasonló eredményeket kaptunk abban az esetben is, ha a pNP-Xyl helyett donorként xilobiózt használtunk ugyanolyan koncentráció viszonyok és körülmények mellett. A reakció teljes konverziója xilobióz donor esetében 1.6%-nak, míg pNP-Xyl esetében 3.2%-nak adódott. Ez igencsak meglepő eredmény tekintettel arra, hogy legjobb tudásunk szerint, nem sok inverziós mechanizmus szerint hasító β -D-xilozidáz enzim esetében írtak le hasonló jelenséget.

4.9. A katalitikusan aktív aminosav oldalláncok kémiai módosításának kinetikai vizsgálata

A katalitikus folyamatban részt vevő oldalláncok kémiai módosításának kinetikai vizsgálata során, az enzimaktivitás változását, különböző inaktivátor koncentrációk mellett követtük az idő függvényében. Mindegyik általunk vizsgált inaktiválódási folyamat esetében a maradék aktivitás természetes alapú logaritmusát ábrázolva az idő függvényében egyeneseket kaptunk, amelyek alapján megállapítottuk, hogy az inaktiváció látszólagos elsőrendű kinetika szerint játszódott le. Ennek alapján az adott inaktivátor először reverzibilisen kötődik az enzimhez, ezáltal egy átmeneti jellegű enzim-inaktivátor komplexet alakítva ki, ezt követően pedig bekövetkezik a tényleges kovalens kötés kialakítása, ahogy azt már más enzimek esetén is leírták (Keresztessy és munkatársai 1994, Komissarov és munkatársai 1995, Kiss és munkatársai 2002, Stubbs és munkatársai 2008):



ahol E a xilán 1,4- β -xilozidáz enzim, I az inaktivátor, [E*I] az enzim-inaktivátor komplex, E-I az inaktivátor által kovalensen módosított enzim, K_i a látszólagos inaktiválódási állandó, k_i pedig az inaktiválódás sebességi állandója.

A módosítási reakciók látszólagos elsőrendű sebességi állandóit (k_{app}), Kitz és Wilson által megadott módszert (1962) követve, az egyenesek meredeksége alapján határoztuk meg.

$$\ln \frac{v_0}{v} = \frac{k_i \cdot t}{1 + K_i / [I]} = k_{app} \cdot t \quad (3)$$

ahol v_0 a kezdeti sebességet jelöli, v a t időpontban mért sebességet, $[I]$ pedig az inaktívátor koncentrációját mutatja.

Amennyiben megismerjük a k_{app} értékeket úgy lehetőségünk nyílik az inaktíválódási folyamatot jellemző további kinetika paraméterek (k_i , K_i és k_i/K_i) meghatározására is (Kitz és Wilson 1962, Pétra 1971), tekintettel arra, hogy a látszólagos sebességi állandó megadható úgy is, hogy:

$$k_{app} = \frac{k_i \cdot [I]}{K_i + [I]} \quad (4)$$

amely alapján a k_{app} inaktívátor koncentráció függése kifejezhető:

$$\frac{1}{k_{app}} = \frac{K_i}{k_i} \cdot \frac{1}{[I]} + \frac{1}{k_i} \quad (5)$$

Az (5) egyenlet pedig nem más, mint egy egyenes egyenlete, amelynek alapján a látszólagos sebességi állandó (k_{app}) értékek reciprokát ábrázolva az inaktívátor koncentráció reciprokának függvényében, az y tengely metszetéből meghatározható az inaktíválódás sebességének állandója (k_i) ennek ismeretében pedig az egyenes meredekségéből a látszólagos inaktíválódási állandó (K_i) már könnyen kiszámítható.

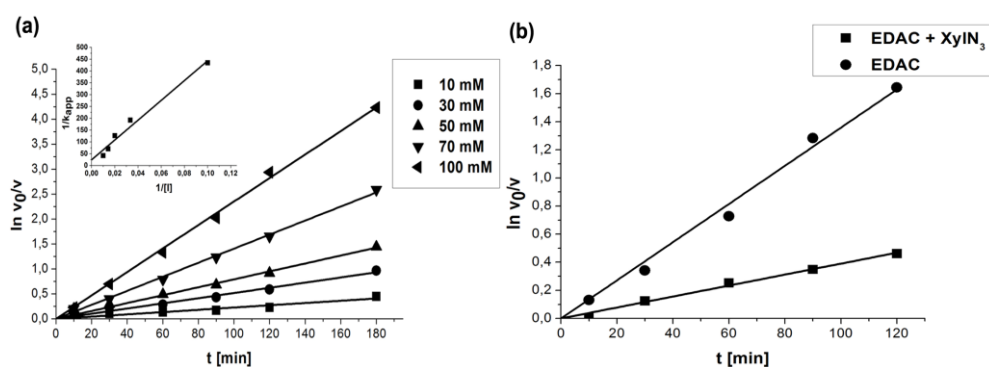
4.9.1. A karboxil oldalláncok specifikus kémiai módosítása

Annak érdekében, hogy bizonyítani tudjuk a karboxil aminosav oldalláncok részvételét a katalitikus folyamatban, a TfBXyl43 enzimet specifikus kémiai reagensekkel módosítottuk. Ennek során vízben oldódó 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimidet (EDAC) használtunk, nukleofilként pedig glicin-metil-észtert (Lundblad és Noyes 1985), amely az 5. ábrán látható módon fejt ki inaktíváló hatását. Az inaktíválási reakciók követését a 3.16.2. pontban leírtak szerint végeztük el.

A TfBXyl43 enzim EDAC-cal történő specifikus kémiai módosítása, glicin-metil-észter jelenlétében, azt mutatta, hogy az inaktíválódás hőmérsékletfüggő folyamat. 90 perces inkubáció után 20 °C-on 70 mM EDAC és 1 mM glicin-metil-észter mellett az enzim több mint 10 %-ot veszített a katalitikus aktivitásából. 35 °C-on ugyanilyen körülmények között több mint 20 %-os aktivitás csökkenést figyelhattunk meg. A legjelentősebb csökkenést az 50 °C-on történő inkubáció esetén tapasztaltuk, amely több mint 64 %-nak adódott. Fontos még megemlítenünk azt is, hogy az enzim 120 percen át tartó 50 °C-os inkubációt követően teljes mértékben elveszítette az aktivitását.

Ezen eredmények alapján joggal feltételezhetjük, hogy egy ilyen termofil enzim esetében is, mint az általunk vizsgált TfBXyl43, a közeg hőmérsékletének növekedése elősegíti az aktivitás kifejtéséhez leginkább alkalmas fehérje konformáció kialakulását. Ez mindenképpen elengedhetetlen az inaktívatornak aktív centrumba történő illeszkedéséhez és ebből kifolyólag, a módosítási reakció szempontjából optimális, enzim-inaktívator komplex létrejöttéhez. Ezen következtetésünk szoros összefüggést mutat az enzim aktivitásának hőmérséklet függésénél – a megfelelő enzim-szubsztrát komplex kialakulására – korábban tett megállapításokkal (lásd 4.3. pont).

Az EDAC-al katalizált glicin-metil-észteres inaktíválódási folyamat esetében, a maradék aktivitás természetes alapú logaritmusát ábrázoltuk az idő függvényében (26a. ábra).



26. ábra. A TfBXyl43 specifikus kémiai módosítása vízoldható karbodiimiddel (EDAC) megfelelő nukleofil (glicin-metil-észter) jelenlétében. (a) az enzimet (16 μ g) különböző koncentrációjú EDAC-cal inaktíváltuk 100 mM pH 8.0 foszfát pufferben 50 °C-on 1 mM glicin-metil-észter mellett. Az egyes reakció elegyekben a következő EDAC koncentrációkat alkalmaztuk: 10 mM (■), 30 mM (●), 50 mM (▲), 70 mM (▼), 100 mM (◄). Megfelelő időpontokban történt mintavétellel meghatároztuk az enzim maradék aktivitását 1 mM pNP-Xyl szubsztráttal 100 mM pH 6.0 citromsav/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ pufferben 10 percig 50 °C-on. A kisebbik, beillesztett ábrán a számított k_{app} értékek reciprokát ábrázoltuk az inaktívator koncentrációk reciprokának függvényében. (b) a β -D-xilopiranozil-azid, mint kompetitív inhibitor, aktív centrumot védő hatása a kémiai módosítással szemben az EDAC-cal végzett inaktíváció esetében. Az enzimet (16 μ g) 70 mM EDAC-cal 1 mM glicin-metil-észter mellett inkubáltuk 100 mM pH 8.0 foszfát pufferben 50 °C-on, 10 mM XylIN₃ jelenlétében (■) illetve annak hiányában (●). A maradék aktivitást a 3.16.2. pontban leírtak szerint határoztuk meg.

Ezt követően a 26a. ábra és a (3) egyenlet alapján, az egyes EDAC koncentráció értékekhez tartozó látszólagos elsőrendű sebességi állandó (k_{app}) értékeket, az egyenesek meredekségeiből számítottuk ki. Ezután a kiszámított k_{app} értékek reciprokát ábrázolva az inaktívator koncentrációk reciprokának függvényben az (5) egyenlet alapján meghatároztuk az inaktíválódás kinetikai paramétereit. Ezek eredményeképpen az inaktíválódás sebességi

állandója $k_i = 0.0406 \text{ min}^{-1}$ -nak, az inaktívátor kötődési állandója $K_i = 170.2 \text{ mM}$ -nak, míg az inaktíválódás hatékonysága $k_i/K_i = 2.39 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}/\text{mM}$ -nak adódott.

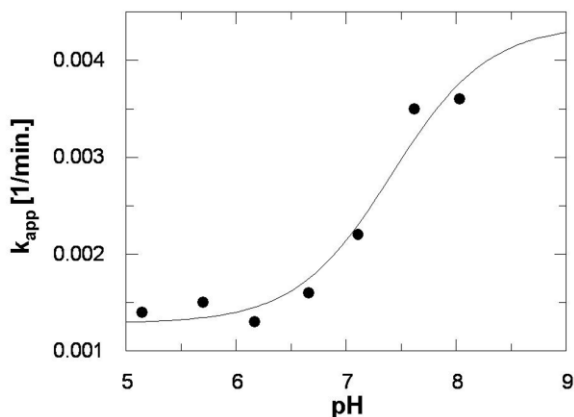
Azért, hogy be tudjuk bizonyítani, hogy az EDAC katalizált glicin-metil-észter által módosított karboxil aminosav oldallánc valóban az aktív centrumban található, az enzim egyik hatékony kompetitív inhibitora, a β -D-xilopiranozil-azid (XylN_3) (lásd 4.4. pont), jelenlétében és hiányában újra elvégeztük az inaktíválási reakciót. A vizsgálat során kiderült, hogy az inaktíválódás sebessége 10 mM ($1.95 K_i$) XylN_3 alkalmazása mellett, több mint harmadára $1.36 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ -ről $4 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ -re csökkent (26b. ábra).

A kapott eredmények alapján kimutattuk, hogy a kompetitív inhibitor (XylN_3) kötődése révén, részlegesen megvédte a xilán 1,4- β -xilozidázt az EDAC és glicin-metil-észter okozta inaktívációval szemben. Ez a tény pedig egyértelműen azt bizonyítja, hogy a módosított aminosav oldallánc, amely az enzim aktív centrumában található karboxil-csoportot tartalmaz és meghatározó szerepet játszik a katalitikus folyamatban.

Éppen ezért, hogy a módosított karboxil-csoportot tartalmazó oldallánc savi disszociációs állandóját meghatározzuk, szükséges volt a karbodiimides módosítás sebességét különböző pH értékeknél meghatározni.

$$k_{app} = \frac{\tilde{k}_{app} x}{1 + [H^+]/K_A} \quad (6)$$

ahol x az inaktívátor (EDAC) koncentrációja, K_A pedig a módosított aminosav oldallánc savi disszociációs állandója.



27. ábra. Az TfBXyl43 karbodiimides inaktívációjának pH-függése. Az enzimet ($16 \mu\text{g}$) 70 mM EDAC-cal 1 mM glicin-metil-észter jelenlétében 100 mM foszfát pufferben pH 5.1 és 8.0 között inkubáltuk $50 \text{ }^\circ\text{C}$ -on. A reakció során a maradék aktivitás alakulását a 3.16.2. pontban leírtaknak megfelelően követtük nyomon. A kapott k_{app} értékekhez

legjobban illeszkedő görbét, és így a módosított oldallánc disszociációs állandóját, nemlineáris illesztéssel a (6) egyenlet alapján határoztuk meg.

Amint az 27. ábrán is jól látható, az elméleti görbe $K_A = 3.8 \times 10^{-8}$ értéknél mutatta a legpontosabb illeszkedést a kísérletileg meghatározott sebesség értékekhez, ebből adódóan az EDAC-cal módosított aminosav oldallánc savi disszociációs állandója $pK_A = 7.42 \pm 0.22$ -nek adódott, a (6) egyenlet alapján. Az így kapott érték, hibahatáron belül, igen közeli egyezést mutat a k_{cat} pH-függésénél meghatározott értékhez $pK_{ES2} = 7.6 \pm 0.28$ (lásd 4.4. pont), amely azt bizonyítja, hogy az enzim teljes inaktiválódása akkor következik be, amikor a katalitikus sav/bázis oldallánc deprotonált formában van.

Összegezve a kapott eredményeket megállapíthatjuk, hogy a TfBXyl43 enzimet az glicin-metil-észter EDAC mellett teljes mértékben inaktíválta. A kompetitív inhibitor jelenlétében végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a módosított oldallánc az aktív centrumban található. Ezáltal a lehetséges aminosavak köre immár potenciálisan kettőre szűkült, a katalitikus nukleofilra, valamint a katalitikus sav/bázisra. Az inaktiválódási reakció pH függésénél kapott eredmények pedig arra utalnak, hogy a hidrolitikus folyamatban részt vevő két aminosav oldallánc közül nagy valószínűséggel a katalitikus sav/bázis módosult.

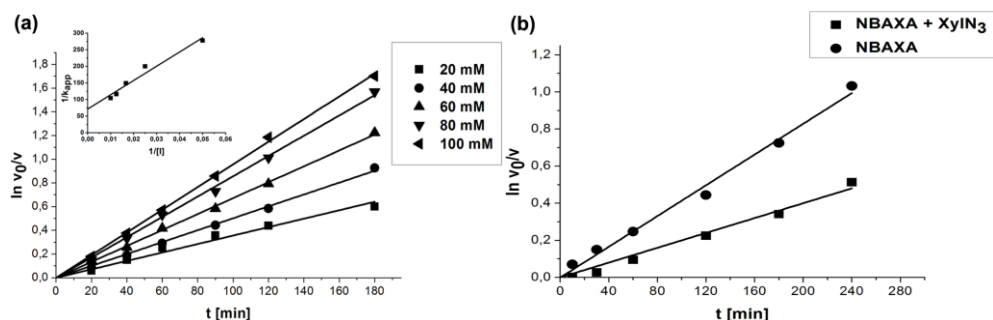
4.9.2. Az *N*-brómacetil- β -D-xilopiranozil-aminnal (NBAXA,) mint affinitás-jelölővel végzett vizsgálatok

Ahogy arról már korábban, az irodalmi áttekintésben is szó esett, a glikozid-hidrolázok esetében a katalitikusan aktív aminosavak módosításának egyik lehetséges eszköze lehet például az affinitás-jelölők használata. Korábbiakban már számos esetben számoltak be ezen vegyületek sikeres szintéziséről és alkalmazásáról különböző glikozidázok esetében (Plapp 1982, Black és munkatársai 1993, Keresztessy és munkatársai 1994, Tull és munkatársai 1996, Kiss és munkatársai 2002, Jäger és Kiss 2005). Azonban szűkebb értelemben véve elmondható, hogy az inverziós glikozidázok esetében eddig még nem alkalmazták ezeket a vegyületeket, különösen nem az olyan enzimek esetében, mint az általunk vizsgált TfBXyl43. Az enzim katalitikus aminosav oldalláncainak azonosítására az *N*-brómacetil- β -D-xilopiranozil-amint (NBAXA), mint lehetséges affinitás-jelölőt szintetizáltuk. A szintézist a 3.16.1. pontban leírtaknak megfelelően végeztük el.

Az NBAXA teljes mértékben képes volt inaktíválni a TfBXyl43 enzimet, ezen kívül az inaktiválódás ebben az esetben is hőmérséklet-függést mutatott, hasonlóan az EDAC, glicin-metil-észternél leírtakhoz. A vizsgálat során az enzimet 40 mM NBAXA mellett 90

percen át inkubáltuk különböző hőmérsékleteken, és az EDAC, glicin-metil-észteres inaktivációnál tapasztaltakkal összhangban itt is 50 °C-on, vagyis a hőmérsékleti optimumán, inaktiválódott az enzim a leggyorsabban és leghatékonyabban.

A kémiai módosítás kinetikai paramétereit csak úgy, mint korábban, a maradék aktivitás természetes alapú logaritmusának az idő függvényében történő ábrázolása alapján határoztuk meg (28a. ábra).



28. ábra. A TfBXyl43 inaktivációja NBAXA-val. **(a)** Az enzimet (20 μ g) 200 mM pH 8.0 foszfát puffer jelenlétében inkubáltuk 50 °C-on 20 mM (■), 40 mM (●), 60 mM (▲), 80 mM (▼) és 100 mM (◄) NBAXA-val. Adott időpontokban történő mintavétellel meghatároztuk az enzim maradék aktivitását 1 mM pNP-Xyl szubsztrát segítségével 10 mM pH 6.0 citromsav/Na₂HPO₄×2H₂O pufferben 10 perces inkubációs időt alkalmazva 50 °C-on. A kisebbik, beillesztett ábrán a számított k_{app} értékek reciprokát ábráztuk az inaktivátor koncentrációk reciprokának függvényében. **(b)** A kompetitív inhibitor (XylN₃), aktív centrumot védő hatása az NBAXA által végzett kémiai módosítással szemben. A mérés során az enzimet (20 μ g) 40 mM NBAXA-val inkubáltuk 200 mM pH 8.0 foszfát pufferben 50 °C-on, 10 mM XylN₃ jelenlétében (×) illetve annak hiányában (◊). A reakció során a maradék aktivitást a 3.16.3. pontban leírtak szerint határoztuk meg.

A 28a. ábra és a (3) egyenlet nyomán, a kapott egyenesek meredekségeiből kiszámítottuk az egyes NBAXA koncentráció értékekhez tartozó látszólagos elsőrendű sebességi állandó (k_{app}) értékeket. Ezt követően, hasonlóan a korábban leírtakhoz, a kapott k_{app} értékek reciprokát az inaktivátor koncentrációk reciprokának függvényében ábráztuk és az (5) egyenlet alapján meghatároztuk az inaktiválódás kinetikai paramétereit. Ezek alapján az inaktiválódás sebességi állandója $k_i = 0.014 \text{ min}^{-1}$ -nak, az inaktivátor kötődési állandója $K_i = 60.2 \text{ mM}$ -nak, míg az inaktiválódás hatékonysága $k_i/K_i = 2.33 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}/\text{mM}$ -nak adódott.

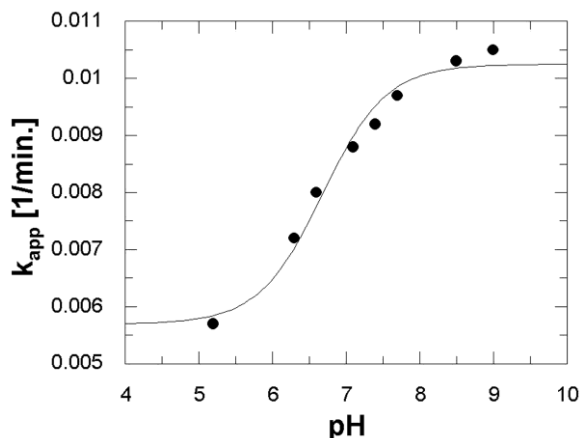
Az 4.9.1. pontban leírtakhoz hasonlóan, az NBAXA-val történő kémiai módosítás során is megvizsgáltuk azt, hogy a XylN₃ mint kompetitív inhibitor jelenléte megvédi-e az aktív centrumot az inaktiválódástól. A kapott eredmények alapján egyértelműen kiderült,

hogy a XylN₃ jelenléte csökkentette az inaktiválódás látszólagos elsőrendű sebességi állandóját kevesebb, mint a felére, $4.1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ -ről $2.0 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ -re (28b. ábra).

Összességében mind a 28b. ábra, mind pedig a meghatározott k_{app} értékek azt mutatják, hogy a XylN₃, a kötődése révén, részlegesen megvédte a xilán 1,4- β -xilozidáz enzim aktív centrumát az NBAXA által okozott kémiai módosítással szemben, ami egyértelműen bizonyítja, hogy a módosított aminosav oldallánc az aktív centrumban található, és lényeges szerepet játszik a szubsztrát hidrolízisében. Ennek a legfőbb magyarázata abban van, hogy az NBAXA egy szubsztrátanalóg vegyület. Emiatt sokkal nagyobb annak a valószínűsége, hogy a molekula a szubsztráthoz hasonló térhelyzetben kötődik az aktív centrumba, – az EDAC-cal és a glicin-metil-észterrel ellentétében – melynek következtében a reaktív brómacetil csoport az anomer centrum környékén található katalitikus aminosav oldalláncok valamelyikével tud kovalens kötést létesíteni.

Mindezekon felül megvizsgáltuk azt is, hogy az enzim a teljes inaktiválódás után 2-merkaptóetanol segítségével újra aktiválható-e. Ennek érdekében az enzimet teljesen inaktiváltuk NBAXA-val 6 órán át, majd pedig az inaktivátor felesleg eltávolítása után 2-merkaptóetanol jelenlétében inkubáltuk 3 órán át, amelynek hatására az enzim aktivitása semmilyen mértékben nem regenerálódott (lásd 3.18. pont). Az enzim tiolos reaktiválásának teljes hatástalansága azt bizonyítja, hogy ciszteinil csoport nem vesz részt közvetlenül sem a katalitikus folyamatban, sem a szubsztrát megkötésben sem pedig az aktív centrum megfelelő térszerkezetének kialakításában úgy, mint ahogy azt az *E. coli*-ből származó β -D-galaktózidáz enzim esetében leírták (Naider és munkatársai 1972).

Annak érdekében, hogy meg tudjuk határozni az NBAXA által módosított aminosav oldallánc pK_A értékét, hasonlóan az EDAC, glicin-metil-észteres inaktiváláshoz (lásd 4.9.1. pont), meg kellett határoznunk az egyes látszólagos elsőrendű sebességi állandókat különböző pH-k esetén (29. ábra).



29. ábra. Az xilán 1,4- β -xilozidáz NBAXA-val történő kémiai módosításának pH-függése. Az enzimet (20 μ g) 40 mM NBAXA-val 200 mM foszfát pufferben pH 5.1 és 8.0 között, illetve 200 mM TRIS-HCl pufferben pH 8.5 és 9.0 között inkubáltuk 50 °C-on. A maradék aktivitás változását reakció során a 3.16.3. pontban leírtaknak megfelelően követtük. A kémiailag módosított oldallánc savi disszociációs állandóját, a kapott k_{app} értékekhez legjobban illeszkedő görbéből, a (6) egyenlet alapján, nemlineáris illesztéssel határoztuk meg.

Az NBAXA által alkilezett aminosav oldallánc esetében, a kísérletileg meghatározott sebesség értékekhez, az elméleti görbe $K_A = 2.1 \times 10^{-7}$ értéknél mutatta a legpontosabb illeszkedést, így a (6) egyenlet alapján, a kémiailag módosított aminosav oldallánc savi disszociációs állandója $pK_A = 6.68 \pm 0.1$ -nek adódott. Ez az érték meglehetősen közel esik a k_{cat}/K_M pH függésénél kapott értékhez $pK_{E2} = 6.44 \pm 0.19$ (lásd 4.4. pont). Hasonlóan az EDAC glicin-metil-észteres inaktiváláshoz az enzim teljes inaktiválódása ez esetben is akkor következik be, amikor a katalitikus sav/bázis oldallánc deprotonált formában van.

Ezen eredményeket, összevetve a karbodiimides kémiai módosításnál kapott értékekkel, arra a következtetésre juthatunk, hogy a katalitikus sav/bázis sokkal jelentősebb szerepet játszik a katalitikus folyamatban az inverziós enzimeknél, mint a retenciós enzimeknél.

Ahogy arra már a korábbiakban is utaltunk, mind az EDAC, glicin-metil-észter jelenlétében, mind pedig az NBAXA által végzett kémiai módosítások esetében meghatároztuk az inaktiválódás kinetikai paramétereit Kitz és Wilson módszere alapján. A kapott kinetikai paramétereket elemezve megállapíthatjuk, hogy mind az NBAXA mind pedig az EDAC, glicin-metil-észter mellett végzett kémiai módosítás összességében nagyon hasonló inaktiválódási hatékonyságot (k_i/K_i) mutat. Az NBAXA-nál meghatározott k_i/K_i érték több mint kétszer nagyobb ($k_i/K_i = 2.33 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}/\text{mM}$), a cassava linamaráz esetében

kapott értékeknél, ahol az inaktivációt a hasonló jellegű N-brómacetil- β -D-glükopiranozil-aminnal végezték para-Nitrofenil- β -D-glükopiranozid szubsztrát mellett ($k_i/K_i = 1.08 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}/\text{mM}$) (Keresztessy és munkatársai 1994). Azonban közel nyolcszor kisebb az általunk mért inaktiválási hatékonyság, mint amit az *Aspergillus carbonarius*-ból izolált xilán 1,4- β -xilozidáznál kaptak ugyanezen inaktivátor esetében ($k_i/K_i = 1.90 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}/\text{mM}$) (Kiss és munkatársai 2002). Az EDAC, glicin-metil-észternél kapott k_i/K_i értékeket összehasonlítva ($k_i/K_i = 2.39 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}/\text{mM}$) pedig azt tapasztalhatjuk, hogy az *Aspergillus carbonarius*-ból származó xilán 1,4- β -xilozidázt több mint százszor hatékonyabban képes inaktiválni ez az inaktivátor, mint a mi általunk vizsgált enzimet.

A kapott sebességi állandókat (k_i) összehasonlítva az NBAXA-val ($k_i = 0.014 \text{ min}^{-1}$) illetve az EDAC-cal glicin-metil-észter ($k_i = 0.0406 \text{ min}^{-1}$) mellett végzett kémiai módosítások esetén azt tapasztaljuk, hogy a karbodiimid katalizálta kémiai módosítás közel háromszor olyan gyorsan megy végbe a karboxil-csoportokon, mint a másik inaktivátor esetében. Ez a jelenség könnyen érthetővé válik abban a pillanatban, amint figyelembe vesszük azt a tényt, mely szerint az EDAC a karboxil-csoportokra egy specifikus aktiváló szer, míg az NBAXA brómacetil csoportja nem, amely megállapítás összhangban van az *Aspergillus carbonarius*-ból izolált enzimmél tapasztaltakkal (Kiss és munkatársai 2002). A k_i értékeket más xilán 1,4- β -xilozidáznál mértekkel összehasonlítva pedig azt láthatjuk, hogy az NBAXA esetében az *Aspergillus carbonarius*-os enzimmél közel hatszor nagyobb inaktiválódási sebességet határoztak meg ($k_i = 0.08 \text{ min}^{-1}$), míg az EDAC-cal végzett módosításnál ugyanez az érték közel tizenötször nagyobb ($k_i = 0.60 \text{ min}^{-1}$) különbséget mutat az általunk vizsgált enzimmél kapott értékekhez képest (Kiss és munkatársai 2002).

A látszólagos inaktiválódási állandó (K_i) értékeket vizsgálva megállapíthatjuk viszont azt, hogy az NBAXA ($K_i = 60.2 \text{ mM}$) közel háromszor nagyobb affinitással képes kötődni az enzim aktív centrumába, mint az EDAC és a glicin-metil-észter ($K_i = 170.2 \text{ mM}$). Ez a jelenség pedig azzal magyarázható, hogy amíg az NBAXA szerkezete szubsztrátanalóg, addig sem az EDAC-é, sem pedig a glicin-metil-észteré nem az, ebből adódóan sokkal jobban képes illeszkedni az NBAXA az enzim aktív centrumába. Ezt a jelenséget továbbá az a tény is alátámasztja, hogy az NBAXA-val történő inaktiválás esetén négyszer annyi kompetitív (40 mM XylN₃) inhibitorot kellett használnunk, mint az EDAC, glicin-metil-észter történő inaktiválás esetén (10 mM XylN₃), annak érdekében, hogy kiszorítsuk az inaktivátort (NBAXA) az aktív centrumból. Amennyiben a kapott K_i értékeket összevetjük az *Aspergillus carbonarius*-os xilán 1,4- β -xilozidáznál meghatározottakkal, ugyanezen inaktivátorokra nézve, akkor azt tapasztaljuk, hogy lényegében mindkét inaktivátor nagyobb

affinitást mutat annak az enzimnek aktív centruma iránt (EDAC, glicin-metil-észter $K_i = 23.3$ mM, NBAXA $K_i = 42$ mM), mint az általunk vizsgált esetben (5. táblázat).

5. táblázat. A *Thermobifida fusca*-ból és az *Aspergillus carbonarius*-ból származó xilán 1,4- β -xilozidáz enzimek NBAXA-val valamint EDAC-cal végzett inaktiválási reakciók kinetikai paramétereinek összehasonlító táblázata.

Enzim	Inaktivátor	k_i [min ⁻¹]	K_i [mM]	k_i/K_i [min ⁻¹ /mM]
<i>Thermobifida fusca</i> xilán 1,4- β -xilozidáz	EDAC	0.0406	170.2	2.39×10^{-4}
	NBAXA	0.014	60.2	2.33×10^{-4}
<i>Aspergillus carbonarius</i> xilán 1,4- β -xilozidáz	EDAC	0.6	23.3	2.6×10^{-2}
	NBAXA	0.08	42	1.90×10^{-3}

Összességében a kapott eredmények azzal magyarázhatók, hogy míg az *Aspergillus carbonarius*-ból izolált xilán 1,4- β -xilozidáz egy fungális, retenciós mechanizmus szerint hasító glikozid-hidroláz, addig a mi vizsgáldásunk középpontjában álló *Thermobifida fusca* TM51-ből származó enzim egy bakteriális, inverziós mechanizmus szerint hasító enzim. Ezek alapján pedig már a tapasztalt különbségek sokkal könnyebben érthetővé válnak tekintve, hogy a két mechanizmus szerint hasító enzim aktív centrumára teljesen más geometriai elrendeződés jellemző (4. ábra).

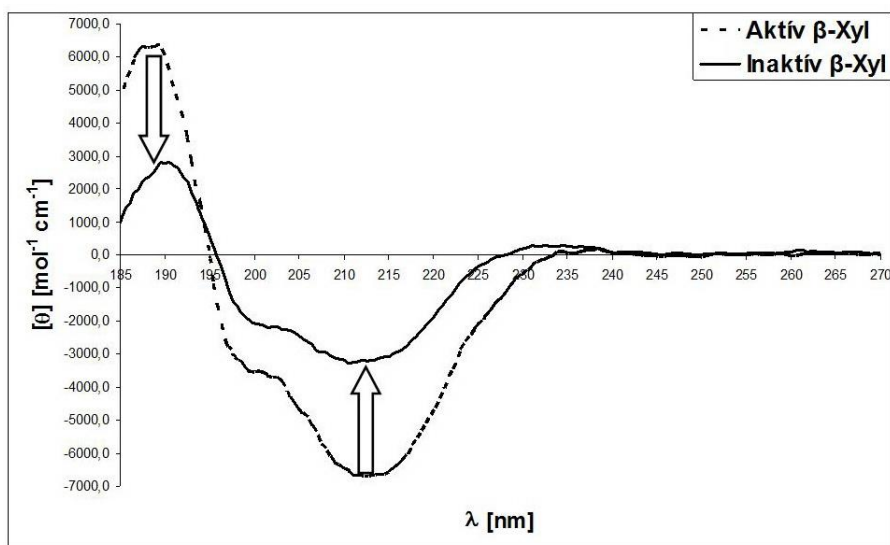
4.10. Az NBAXA által módosított valamint a nem módosított xilán 1,4- β -xilozidáz enzim CD spektroszkópiai vizsgálata

A TfBXyl43 enzim monomer alegysége alapvetően kétféle jellegzetes szerkezeti részből áll. Az egyik ilyen forma a polipeptid lánc N-terminális végén található ötlapátos β -propeller szerkezetű katalitikus egység, a másik pedig egy β -szendvics szerkezetű szénhidrát kötő modul. Ezek a szerkezeti formák jellegzetesnek mondhatók a GH43 családba tartozó enzimek esetében (Brüx és munkatársai 2006, Brunzelle és munkatársai 2008).

A fehérjék jellegzetes másodlagos szerkezeti formáinak megjelenítésére, és a bennük bekövetkező változások nyomon követésére az egyik legszélesebb körben alkalmazott módszer a CD spektroszkópia (Chen és munkatársai 1972). Tekintettel arra, hogy az általunk vizsgált fehérje szerkezete jelentős részben β -redős, illetve rendezetlen szakaszokból áll, így csak ezen szerkezeti elemek vizsgálatára koncentráltunk a CD spektrumok elemzése során (5. táblázat). Ennek megfelelően a β -redők karakterisztikus

negatív maximummal jelennek meg 210 és 215 nm közötti, míg pozitívvál 190 és 195 nm közötti hullámhossz tartományban. Ezzel szemben, a rendezetlen szakaszok 190 és 195 nm között jellegzetesen negatív maximumot, míg 210 és 215 nm között enyhén pozitív jelet adnak (30. ábra).

Miután a TfBXyl43 enzimet sikeresen inaktívtuk NBAXA-val, az inaktíválódás következtében bekövetkező változásokat a másodlagos szerkezetben, CD spektroszkópia segítségével követtük nyomon és hasonlítottuk össze a kémiai nem módosított fehérjével (30. ábra). A vizsgálatokat a 3.16.4. pontban leírtak szerint hajtottuk végre.



30. ábra. A 10 μM aktív és 6.62 μM inaktív xilán 1,4- β -xilozidáz enzim oldatokról rögzített CD spektrumok összefoglaló ábrája, ahol a moláris ellipticitást (Θ) ábrázoltuk a hullámhossz (λ) függvényében. A felvételek 10 mM pH 6.0 foszfát puffer mellett történtek 25 °C-on. Az ábrán 210-215 nm-nél pozitív, míg 190-195 nm-nél negatív eltolódás figyelhető meg az inaktívált enzim esetében.

Az aktív és az inaktív enzimekről felvett spektrumok összevetése alapján bizonyítható, hogy a kémiai módosítás következtében a fehérje másodlagos szerkezete igen jelentős torzulást szenvedett (30. ábra). Ennek számszerűsítésére elvégeztük a görbék dekonvolúciós kiértékelését is, amely alátámasztotta az előbbi megállapításunkat (6. táblázat).

6. táblázat. Az aktív, valamint az inaktív xilán 1,4- β -xilozidáz enzimek CD spektrumainak CONTINLL, CDSSRT és SELCON3 programok segítségével elvégzett dekonvolúciós kiértékelése.

Enzim	α-hélix	β-redő	β-hurok	Rendezetlen
Aktív TfBXyl43	2.6-4.8 %	38.3-43.3 %	19.6-22.4 %	32.2-34.7 %
Inaktív TfBXyl43	2.5-3.5 %	29.6-32.9 %	14.7-17.3 %	47.5-52.1 %

A kapott spektrumok dekonvolúciós kiértékelése alapján kiderült, hogy az enzim β -redő, illetve β -hurok szerkezeti egységeinek aránya az inaktiválódás hatására kb. 8-10 %-al (β -redő) valamint kb. 5 %-al (β -hurok) csökkent, ezzel szemben a rendezetlen szerkezetek aránya kb. 15-17 %-al nőtt (5. táblázat).

Végül a kapott eredményeket összegezve megállapíthatjuk, hogy a *Thermobifida fusca* TM51-ből származó xilán 1,4- β -xilozidáz enzim az NBAXA-val történő kémiai módosítás hatására igen jelentős strukturális átalakuláson ment át. Ennek a konkrét szerkezeti következménye az lett, hogy az enzim rendezett β -struktúráinak egy része rendezetlenné alakult, amit mind a CD spektrumok, mind pedig a görbék dekonvolúciója alapján számított értékek is alátámasztottak.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során a *Thermobifida fusca* TM51-es törzséből származó *E. coli* BL21(DE3) expressziós törzsében kifejezett rekombináns xilán 1,4- β -xilozidáz (TfBXyl43) enzim tisztítását biokémiai jellemzését, valamint működési mechanizmusának és aktív centrum topológiájának vizsgálatát végeztem el. Ez azért is jelentős, mert maga a *Thermobifida fusca* egy viszonylag kiterjedten vizsgált modell szervezet, amely fontos ismeretekkel és tapasztalatokkal szolgálhat, más hasonló karakterű szervezetekből származó fehérjék megismerésében.

A pET28(a) vektor konstrukcióba klónozott TfBXyl43 génjét a már korábban említett *E. coli* törzs hordozta, egy 6 hisztidin (His-tag) egységet tartalmazó fúziós fehérje formájában, amelynek tenyésztése és IPTG (izopropil-1-tio- β -D-galaktopiranozid) révén történő indukciója következtében az enzimet nagyobb mennyiségben sikerült előállítani. Ezt követően az *E. coli* sejtek feltárása következett. Az enzim elsődleges tisztítása affinitás kromatográfia segítségével valósult meg. Ezt követően a további tisztítás anioncserés kromatográfiával történt.

Ezután meghatároztuk az enzim aktivitásának és stabilitásának legalapvetőbb paramétereit. Ezen vizsgálatok eredményei alapján megállapítottuk, hogy a TfBXyl43 enzim hőmérséklet és pH optimuma 50 °C és pH 6.0. A stabilitási vizsgálatok eredményei kimutatták, hogy az enzim pH 4.5 és 5.5 között részlegesen, míg 6.0-os és 7.0-es pH-n teljesen megőrzi stabilitását. Ezzel szemben az enzim pH 4.0-en nagyon instabilnak mutatkozott. A hőstabilitás vizsgálatok kimutatták, hogy az enzim 50 °C-on és pH 6.0-on különösen nagy stabilitást mutat hosszabb távon is, míg 60 °C-on részleges, 70 °C-on pedig teljes instabilitást tapasztaltunk.

Az elektroforetikus vizsgálatok arra az eredményre vezettek, hogy a TfBXyl43 enzim molekulatömege natív-PAGE körülmények között 240 kDa-nak, míg denaturáló körülmények között 61 kDa-nak adódott. Ez azt jelenti, hogy az enzim homotetramer negyedleges szerkezettel rendelkezik. Ezzel együtt a vizsgálatok azt is kiderítették, hogy az enzim natív szerkezetének fenntartásában sem fémionok, sem pedig diszulfid hidak nem játszanak szerepet, sem az alegységeken belüli, sem pedig az alegységek közötti kölcsönhatások kialakításában. Sokkal valószínűbbnek tűnik ezzel szemben az, hogy hidrogénhid, illetve elektrosztatikus, valamint hidrofób kölcsönhatások hálózata játszik meghatározó szerepet az enzim negyedleges szerkezetének kialakításában.

A kinetikai vizsgálatok eredményeit összegezve az állapítható meg, hogy a TfBXyl43 enzim csak és kizárólag a β -D-xilózt tartalmazó szubsztrátokat volt képes hidrolizálni, az α -L-arabinóz illetve β -D-glükóz tartalmú szubsztrátokat nem. Ez összességében igen nagyfokú specifitást mutat a szubsztrát glikon részét illetően. Mindezen eredmények arra engednek következtetni, hogy egyrészt a C-4 helyzetben lévő hidroxil csoport ekvatoriális térállása alapvetően fontos a megfelelő enzim-szubsztrát komplex kialakításához, másrészt a C-5 helyzetben lévő hidroximetil csoport pedig szterikus gátja lehet ugyanezen komplex a sikeres létrejöttéhez. Ezzel szemben az aglikon viszonylatában már sokkal mérsékeltbb specifitás volt megfigyelhető tekintettel arra, hogy mind a pNP-Xyl mind pedig a xilobióz szubsztrátja az enzimnek.

A kinetikai paraméterek pH függés vizsgálatának eredményeiből az a következtetés vonható le, hogy az enzim aktív centrumában, a katalitikus helyen egy deprotonált katalitikus nukleofil valamint egy protonált katalitikus sav/bázis együttes jelenlétére van szükség a hidrolízishez.

A TfBXyl43 segítségével különböző xilooligomereken végzett vizsgálatok egyértelműen azt mutatták, hogy az enzimnek a xilotrióznál nagyobb polimerizációfokú oligomer nem szubsztrátja. Viszont a xilobiózt és a triózt is képes teljesen lebontani xilózzá, ami bizonyítja azt, hogy az enzim valóban egy exo típusú glikozid hidroláz, amely D-xilóz egységeket hasít le az oligomer lánc nemredukáló végéről.

Miután a kinetikai vizsgálatok során megállapítást nyert az, hogy a TfBXyl43 a szubsztrátok glikon részére igen nagy specifitást mutat, célul tűztük ki az aglikon kötő hely kémiai karakterének vizsgálatát szubsztrát analóg kompetitív inhibitorok alkalmazásával. Az így kapott eredmények alapján azt állapítottuk meg, hogy a TfBXyl43 enzim aglikon kötőhelye alapvetően hidrofób karakterű, ahol döntően aromás aminosav oldalláncok vannak jelen, amelyek igen jelentős π - π kölcsönhatásokat képesek kialakítani az olyan szubsztrátokkal illetve inhibitorokkal, amelyek π elektronokkal rendelkeznek.

A TfBXyl43 által katalizált reakció sztereokémiájának $^1\text{H-NMR}$ segítségével történő nyomon követése során bizonyítást nyert, hogy az enzim a β anomer konfigurációjú szubsztrátból α anomer konfigurációjú terméket állít elő a hidrolízis során. Ez egyértelműen igazolja azt, hogy az enzim inverziós mechanizmus szerint hasítja a szubsztrátját.

A transzferáz aktivitás vizsgálataink azt a meglepő eredményt adták, hogy a TfBXyl43 enzim rendelkezik transz-xilozilező aktivitással is. Ez egyedülállónak mondható az inverziós glikozidázok körében.

Elvégeztük a katalitikus aminosav oldalláncok kémiai módosítását, egyrészt egy kifejezetten funkciós csoport (karboxil) specifikus karbodiimid típusú reagenssel (EDAC, glicin-metil-észter), illetve egy szubsztrát analóg úgynevezett affinitás jelölővel (NBAXA). A karbodiimiddal történő reakció során a karboxil-csoportokat aktiváljuk az EDAC segítségével, a glicin-metil-észter pedig az aktivált karboxil-csoportot karbonsav-amiddá alakítja, ez által blokkolva annak a katalízisben betöltött eredeti funkcióját. Azonban az EDAC nem aktív centrum specifikus, és az enzimben található más karboxil-csoportokkal is reakcióba léphet. Mi azonban kompetitív inhibitor jelenlétében elvégzett vizsgálatok eredményeképpen igazoltuk, hogy a kompetitív inhibitor megvédte az aktív centrumban található karboxil-csoportot a kémiai átalakulástól. Ez bizonyította, hogy a katalízisben résztvevő karboxil-csoport is módosult az inaktiválódás során. Az inaktiválás pH-függése pedig azt mutatta, hogy a reakció során a katalitikus sav/bázis oldallánc módosult. Az affinitás-jelölővel végzett kémiai módosítás során NBAXA-t használtunk. Ez egy speciális szubsztrátanalóg halogenid-típusú alkilező szer, amely lényegében képes észterezni az aktív centrumban található karboxil-csoportokat. Ezen kívül, mivel kovalensen kötődik az aktív centrumba, egyrészt kémiaailag módosítja a megfelelő katalitikusan aktív aminosav oldalláncot, másrészt szterikusan blokkolja a szubsztrát hozzáférését az aktív centrumhoz. Mivel szubsztrátanalóg vegyületről van szó, így csak az aktív centrumban található karboxil-csoportot módosítja. A kompetitív inhibitor megvédte az aktív centrumban található karboxilát oldalláncot a kémiai módosítástól, minthogy ugyanoda kötődik, mint ahová az affinitás-jelölő. Az inaktiválás pH-függése az EDAC, glicin-metil-észterhez hasonló eredményt mutatott, vagyis ebben az esetben is a katalitikus sav/bázis módosult. Összességében az EDAC, glicin-metil-észter és az NBAXA-val elvégzett mérések eredményei azt mutatják, hogy a katalitikus sav/bázis mennyire kitüntetett szerepet játszik az inverziós glikozidázok működési mechanizmusában, míg a retenciós enzimek esetében a katalitikus nukleofilnak van sokkal nagyobb jelentősége a katalízisben.

Az NBAXA-val inaktivált és nem inaktivált enzimek CD spektroszkópiai elemzései során kapott eredmények pedig azt mutatták, hogy amikor egy szubsztrátanalóg molekula a szubsztrát kötőhelyre irreverzibilisen kötődik, akkor az enzim egésze milyen konformációs változáson esik át. Ezt az átmeneti állapotra jellemző másodlagos szerkezeti változást sikerült konzerválni az affinitásjelölő segítségével. Ennek következtében kiderült, hogy az inaktivátor kötődése során az enzim másodlagos szerkezeti elemeinek rendezett β -redős és β -hurkos szakaszai rendezetlenné váltak.

6. SUMMARY

In this work we describe the heterologous expression of the recombinant β -D-xyosidase from *Thermobifida fusca* TM51 (TfBXyl43) in *E. coli* BL21(DE3) host. Furthermore we report the purification, biochemical characterization of the enzyme, as well as the investigation of hydrolytic mechanism and topological studies of the active center. The results of these investigations can be important in the research of the same type thermophilic proteins because the *Thermobifida fusca* is an extensively studied model organism.

The gene of the TfBXyl43 enzyme was cloned in pET28(a) expression vector and transformed in the proper *E. coli* strain as a His-fusion protein. The first step of the purification was carried out by affinity (IMAC) chromatography. The next purification step was performed by anion exchange chromatography.

Concluding the data from the pH/temperature dependence and stability studies, the enzyme was fully stable with the highest activity at 50 °C and at pH 6.0 not only for shorter but for longer time period as well. Moreover the detailed investigations on the effect of the pH on the enzyme activity and stability revealed that the enzyme is active over a relatively wide pH range. Under pH optimum in the pH range of 4.5–5.5, the enzyme partially lost its activity, nevertheless in the pH range of 6.0 and 7.0 fully preserved its activity. At pH 4.0 the enzyme lost completely its activity. Thermal stability investigations showed that the enzyme incubated at 60 °C partly also lost its activity, but at 70 °C total instability was observed.

Molecular weight and oligomerization studies revealed that TfBXyl43 has homo oligomeric quaternary structure. In line with this, our results suggest that metal ions and disulfide-bridge are not involved in maintaining the native structure of the enzyme neither in monomer nor in oligomeric state. More likely in the maintenance of the quaternary structure, hydrogen-bond network coupled with electrostatic and hydrophobic interactions take a significant role in forming the boundary between the polypeptide chains.

Based on the results obtained at the kinetic investigations it can be concluded that the TfBXyl43 has no dual activity and it shows very narrow substrate specificity in regard to the glycon group. The fact that the enzyme was unable to hydrolyze the substrate containing α -L-arabinose indicates that the equatorial C-4 hydroxyl group might play an essential role in the substrate binding. The enzyme was also not been able to hydrolyze the substrate containing β -D-glucose, which is caused most probably by the presence of the hydroximethyl group in the C-5 position that can be a steric barrier for the successful binding.

The theoretical curve in the case of the pH dependence of k_{cat} and k_{cat}/K_M correlated well with the experimental data indicating the presence of two ionizable amino acid side chains in the catalysis. These results suggest that the presence of a deprotonated (catalytic nucleophile) and a protonated (catalytic acid–base) group is essential in the hydrolysis.

Results of the substrate specificity investigations on the xylooligomers proved clearly that the enzyme is an exoglycosidase which cleaves single D-xylose units from the nonreducing end and its substrate acceptance capacity is only limited to xylobiose and xylotriose among the xylooligomers.

The inhibitors presented in current work were all common in containing a β -D-xylopyranosyl ring but the attached groups in the aglycon position were different. The received K_i values demonstrated well contribution both of hydrophobic interactions and relatively strong π - π interaction between the amino acid side chains of aglycon binding site and aryl or azide group in the aglycon of the inhibitor.

The $^1\text{H-NMR}$ studies proved the formation of α anomeric configuration product from a β anomeric configuration substrate which demonstrated clearly that the enzyme works with inverting mechanism.

Considering that TfBXyl43 belongs to GH43 family, which contains only inverting hydrolases, it was a reasonable surprise to observe that the enzyme could perform transxylosylation activity both with pNP-Xyl and xylobiose as donors. According to our approach, a substrate analogue competitive inhibitor was applied as acceptor, which was able to be detected at different wavelength compared to the donor. On the other hand the inhibitor could decrease the velocity of the hydrolysis which became closer to the rate of the transxylosylation.

The chemical modification of the catalytic amino acid side chains were performed by using carboxylate specific agents (EDAC, glycine methyl ester) and substrate analogue affinity label (NBAXA). In the first step the carboxylate group is activated via carbodiimide type EDAC, after that the intermediate is formed further to carboxamide by glycine methyl ester blocking the catalytically active amino acid side chain. EDAC and glycine methyl ester were modifying not only the carboxylate groups in the active center, but most likely the other carboxylate groups of the enzyme as well. However the fact, that the competitive inhibitor (XylN₃) protected the enzyme against inactivation proves that a catalytically essential carboxylate group in the active site was modified. These results demonstrate well that the modified group is a carboxylate group, which is involved in the catalytic center of the enzyme.

The chemical modification of the TfBXyl43 with NBAXA, which is a special halogen-containing alkylating affinity label, led to the complete inactivation with the same kinetics as in the case of EDAC, glycine methyl ester. This inactivator is involved in an esterification reaction with the carboxylate residues in the active site. Therefore it is not surprising that the presence of the XylN₃ has also protected the active site from the inactivation. Because of its substrate analogue nature the NBAXA binds with higher affinity to the enzyme. The pH dependence studies of the EDAC and NBAXA demonstrated well, that both inactivators blocking effect on the enzyme activity increased significant when the catalytic acid/base was deprotonated. This fact proves a more important role of the catalytic acid/base compared to the nucleophile involved in the hydrolytic process in the case of the inverting enzymes in contrary to the retaining enzymes.

Comparisons of the recorded CD spectra, about the active and inactivated enzyme, display a significant distortion in the secondary structural elements after the inactivation. Both the spectra and deconvolution calculations display a significant distortion in the β -strand and β -turn regions of the enzyme and an increase in the unordered structures as a result of the inactivation.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Bacon, J. S. D., Gordon, A. H., Morris, E. J. and Farmer, V. C. (1975) Acetyl groups in cell wall precipitations 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
- Battan, B., Dhiman, S. S., Ahlawat, S., Mahajan, R. and Sharma, J. (2012) Application of Thermostable Xylanase of *Bacillus pumilus* in Textile Processing. *Indian J. Microbiol.* 52, 222-229
- Béki, E., Nagy, I., Vanderleyden, J., Jäger, S., Kiss, L., Fülöp, L., Hornok, L. and Kukolya, J. (2003) Cloning and heterologous expression of a β -D-mannosidase (EC 3.2.1.25)-encoding gene from *Thermobifida fusca* TM51. *Appl. Env. Microbiol.* 69, 1944-1952
- Biely, P. (1985) Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3, 286-290
- Biely, P. (1993) Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In: Coughlan, M. P. and Hazlewood, G. P. (eds) *Hemicelluloses and hemicellulases* (pp 29–52). London, Portland Press
- 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., Mislovicova, D. and Toman, R. (1988) Remazol Brilliant Blue xylan: a soluble chromogenic substrate for xylanases. *Methods Enzymol.* 160, 536–542
- Blake, C. C. F., Johnson, L. N., Mair, G. A., North, A. C. T., Philips, 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
- Black, T. S., Kiss, L., Tull, D., Withers, S. G. (1993) *N*-bromoacetyl-glycopyranosylamines as affinity labels for a beta-glucosidase and a cellulase. *Carbohydr. Res.* 250, 195–202
- Blanchard, J. E., Withers, S. G. (2001) Rapid screening of the aglycone specificity of glycosidases: Applications to enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Chem Biol.* 8, 627–633
- Blum, D. L., Li, X-L., Chen, H. and Ljungdahl, L. G. (1999) Characterization of an acetyl xylan esterase from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. Strain PC-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3990-3995

- Bollag, D. M., Rozycki, M. D. and Edelstein S. J. (1996) Gel electrophoresis under nondenaturing conditions. In: Protein Methods 2nd ed., Willey-Liss Inc., 605 Third Avenue, New York, 155-167
- Bradford, M. M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem.* 72, 248–254
- 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: family 39 glycoside hydrolase. *FEBS Letters*, 495, 115-119
- Bravman, T., Zolotnisky, G., Shulami, S., Belakhov, V., Solomon, D., Baasov, T., Shoham, G., and Shoham, Y. (2001b) Stereochemistry of family 52 glycosyl hydrolases: a *Bacillus stearothermophilus* T-6 is a retaining enzyme. *FEBS Letters*, 495, 39-43
- Bray, M. R. and Clarke, A. J. (1990) Essential carboxyl groups in xylanase A. *Biochem. J.* 270, 91-96
- Brunzelle, J. S., Jordan, D. B., McCaslin, D. R. Olczak, A. and Wawrzak, Z., (2008) Structure of the two-subsite beta-d-xylosidase from *Selenomonas ruminantium* in complex with 1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane. *Arch. Biochem. Biophys.* 474, 157-166
- Brüx, C., Ben-David, A., Shallom-Shezifi, D., Leon, M., Niefind, K., Shoham, G., Shoham, Y. and Schomburg, D. (2006) The structure of an inverting GH43 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with its substrate reveals the role of the three catalytic residues. *J. Mol. Biol.* 359, 97-109
- Butt, M. S., Tahir-Nadeem, M., Ahmad, Z. Sultan, M. T. (2008) Xylanases and their applications in baking industry. *Food Technol. Biotechnol.* 46, 22–31
- Capon, B. (1963) Intramolecular catalysis in glycoside hydrolysis. *Tetrahedron Lett.* 4, 911-913
- Caufrier, F., Martinou, A., Dupont, C. and Bouriotis, V. (2003) Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. *Carbohydr. Res.* 338, 687-692
- Carraway, K.L. and Koshland, D.E., Jr. (1972) Carbodiimide modification of proteins, *Methods in Enzymol.* 25B, 616-623
- CAZy – Carbohydrate-Active enZYmes, www.cazy.org
- 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. II*, 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
- Chauvigné-Hines, L. M., Anderson, L. N., Weaver, H. M., Brown, J. N., Koech, P. K., Nicora, C. D., Hofstad, B. A., Smith, R. D., Wilkins, M. J., Callister, S. J. and Wright, A. T. (2012) Suite of activity-based probes for cellulose-degrading enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* 50, 20521-32
- Chen, Y. H., Yang, J. T., and Martinez, H. M. (1972) Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochemistry* 11, 4120–4131
- Chiao, Y.-B., Hoyson, G.M., Peters, S. P., Lee, R. E., Diven, W., Murphy, J. V., and Glew, R. H. (1978) Multiple glycosidase deficiencies in a case of juvenile (type 3) Gaucher disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2448-2452
- Chinen, I., Oouchi, K., Tamaki, H., Fukuda, N. (1982) Purification and properties of thermostable beta-xylosidase from immature stalks of *Saccharum officinarum* L. (sugar cane). *J. Biochem.* 92, 1873–1881
- Chir, J., Withers, S., Wan, C-F., and Li, Y-K. (2002) Identification of the two essential groups in the family 3 beta-glucosidase from flavobacterium meningosepticum by labelling and tandem mass spectrometric analysis. *Biochem J.* 365, 857–863.
- Christov, L. P. and Prior, B. A. (1993) Esterases of xylan-degrading microorganisms, production, properties and significance. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 460–475
- Cornish-Bowden, A. (1995) Effect of pH on enzyme kinetic constants. In: *Fundamentals of Enzyme Kinetics* (pp. 187-192), London, Portland Press
- 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., Tuohy, M. G., Filho, E. X. F., Puls, J., Claeysens, M., Vranska, M. and Hughes, M. M. (1993b) Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems. In: Coughlan, M. P. and Hazlewood, G. P. (eds.) *Hemicellulose and Hemicellulases* (pp. 53-85), London, Portland Press
- Crawford D. L. (1975) Cultural, morphological, and physiological characteristics of *Thermomonospora fusca* (strain 190Th). *Can. J. Microbiol.* 21, 1842-1848
- Crepin, V.F., Fauld, C.B. and Connerton, I. F. (2004) Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 647–652

- Czjzek, M., Bravman, T., Henrissat, B. and Shoham, Y. (2004) Crystallization and preliminary X-ray analysis of family 39 beta-D-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 583-585
- 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, 13-50
- Deleyn, F., Claeysens, M., and De Bruyne, C. K. (1980) xylan 1,4- β -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
- Dixon, M. (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* 55, 170–171
- Du, Y., Shi, P., Huang, H., Zhang, X., Luo, H., Wang, Y. and Yao, B. (2013) Characterization of three novel thermophilic xylanases from *Humicola insolens* Y1 with application potentials in the brewing industry. *Bioresur. Technol.* 130, 161-167
- Dunn, B. M., Anfinsen C. B. and Shrager, R. I. (1974) Kinetics of Woodward's Reagent K hydrolysis and reaction with staphylococcal nuclease. *J. Biol. Chem.* 249, 3717-3723
- Eda, S., Ohnishi, A., and Kato, K. (1976) Xylan isolated from the salk of *Nicotina 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
- Eneyskaya, E. V., Ivanen, D. R., Bobrov, K. S., Isaeva-Ivanova, L. S., Shabalin, K. A., Savel'ev, A. N., Golubev, A. M. and Kulminskaya A. A. (2007) Biochemical and kinetic analysis of the GH3 family β -xylosidase from *Aspergillus awamori* X-100. *Arch. Biochem. Biophys.* 457, 225-234
- Ericksson, K. E. L., Blanchette R. A. and Ander, P. (eds.) (1990) *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*, Springer-Verlag, Berlin
- ExpASY Proteomics Server – Compute pI/Mw tool, http://expasy.org/cgi-bin/pi_tool
- Filho, E. X. F., Puls, J. and Coughlan, M. P. (1993) Physicochemical and catalytic properties of a low-molecular-weight endo-1,4- β -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, B. L., Ball, A. S., Rodriguez, J., Pérez-Leblic, M. I., Arias, M. E. and Copa-Patino, J. L. (1998) Induction of ferulic acid esterase and xylanase activities in *Streptomyces avermitilis* UAH30. *FEMS Microbiol. Lett.* 158, 95-99
- Gómez, M., Isorna, P., Rojo, M. and Estrada, P. (2001) Chemical mechanism of beta-xylosidase from *Trichoderma reesei* QM 9414: pH-dependence of kinetic parameters. *Biochimie* 83, 961-967
- Gyémánt, Gy., Tóth, A., Bajza I., Kandra, L. and Lipták, A. (2001) Identification and structural analysis of synthetic oligosaccharides of *Shigella sonnei* using MALDI-TOF MS. *Carbohydr. Res.* 334, 315-322
- 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
- Hekomat, O., Kim, Y. W., Williams, S. J., He S., and Withers, S. G. (2005) Active-site peptide "fingerprinting" of glycosidases in complex mixtures by mass spectrometry. Discovery of a novel retaining beta-1,4-glycanase in *Cellulomonas fimi*. *J. Biol. Chem.* 280, 35126-35135
- 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
- Henssen, A. (1957) Beiträge zur morphologie und systematik der thermophilen actinomyceten. *Arch. Microbiol.* 26, 373-414.
- Herrmann, M. C., Vrsanska, M., Jurickova, M., Hirsch, J., Biely, P., and Kubicek, C. P. (1997) The xylan 1,4- β -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

- Hong, M-R., Park, C-S. and Oh D-K. (2009) Characterization of a thermostable endo-1,5-alpha-L-arabinanase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnol. Lett.* 31, 1439-1443
- Howard, S. and Withers, S. G. (1998a) Bromoketone C-glycosides, a new class of beta-glucanase inactivators. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 10326–10331
- Howard, S. and Withers, S. G. (1998b) Labeling and identification of the postulated acid/base catalyst in the alpha-glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* using a novel bromoketone C-glycoside. *Biochemistry* 37, 3858–3864
- Iriki, Y. Suzuki, T. Nisizawa, K. and Miwa. T. (1960). Xylan of siphonaceous green algae. *Nature* 187, 82–83
- Jäger, Sz. and Kiss, L. (2005) Investigation of the active site of the extracellular beta-D-glucosidase from *Aspergillus carbonarius*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 337–343
- Johansson, M. H. and Samuelson, O. (1977) Reducing end groups in birch xylan and their alkaline degradation. *Wood Sci. Technol.* 11, 251-263
- Johnson, K. 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
- Jordan, D. B., Li, X-L., Dunlap, C. A., Whitehead, T. R. and Cotta, M. A. (2007) xylan 1,4- β -xylosidase from *Selenomonas ruminantium* of glycoside hydrolase family 43 *Appl. Biochem. Biotechnol.* 137–140, 93–104
- Jordan, D. B. (2008) β -D-Xylosidase from *Selenomonas ruminantium*: Catalyzed reactions with natural and artificial substrates *Appl. Biochem. Biotechnol.* 146, 137–149
- 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 Tagawa, K. (1970) Purification, crystallization and amino acid composition of α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta* 207, 456-464
- Kaji, A. and Saheki, T. (1975) Endo-arabinase from *Bacillus subtilis* F-11. *Biochim. Biophys. Acta* 410, 354-360
- 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. 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., Loontjens, F. G., Claeysens, M. and de Bruyne, C. K. (1969) Partial purification and properties of an induced beta-D-xylosidase of *Bacillus pumilus* 12. *Eur. J. Biochem.* 7, 434-441
- Kerstens-Hilderson, H., Van Doorslaer, E., Lippens, M. and De Bruyne C. K. (1984) The pH dependence and group modification of xylan 1,4- β -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
- Kim, J. H., Irwin, D. and Wilson. D. B. (2004) Purification and characterization of *Thermobifida fusca* xylanase 10B. *Can. J. Microbiol.* 50, 835–843
- Kiss, L., Kóródi, I., and Nánási, P. (1981) Study on the role of tyrosine side-chains at the active centre of emulsin beta-D-glucosidase. *Biochim. Biophys. Acta* 662, 308-311
- Kiss, T. and Kiss, L. (2000) Purification and characterisation of an extracellular xylan 1,4- β -xylosidase from *Aspergillus carbonarius*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16(5) 465-470
- Kiss, T. (2002) *Aspergillus carbonarius*-ból izolált extracelluláris xilán 1,4- β -xilozidáz enzim működési mechanizmusának vizsgálata. Ph.D. értekezés. Debreceni Egyetem, TTK, Biokémiai Tanszék, Debrecen, Magyarország.
- Kiss, T., Erdei, A., and Kiss, L. (2002) Investigation of the active site of the extracellular xylan 1,4- β -xylosidase from *Aspergillus carbonarius*. *Arch. Biochem. Biophys.* 399, 188-194
- Kitz, R. and Wilson, I. B. (1962) Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* 237, 3245-3249
- Knapp, S., Vocadlo, D., Gao, Z. N., Kirk, B., Lou, J. P. and Withers, S. G. (1996) NAG-thiazoline, an *N*-acetyl-beta-hexosaminidase inhibitor that implicates acetamido participation. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 6804–6805
- Knob, A., Terrasan, C. R. F. and Carmona, E. C. (2010) β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 389–407
- 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

- 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 arabionxylans. *Carbohydr. Res.* 249, 355-367
- Koshland, D. E. Jr. (1953) Stereochemistry and mechanism of enzymatic reactions. *Biol. Rev.* 28, 416-436
- Kukolya, J., Nagy, I., Tóth, E., Oravecz, O., Márialigeti, K. and Hornok L. (2002) *Thermobifida cellulolytica* sp. nov., a new lignocellulose-decomposing actinomicete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1193-1199
- 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.
- Lairson, L. L. and Withers, S. G. (2004) Mechanistic analogies amongst carbohydrate modifying enzymes. *Chem. Commun.* 2243-2248
- Lairson, L. L., Wakarchuk, W. W. and Withers, S. G. (2007) Alternative donor substrates for inverting and retaining glycosyltransferases. *Chem. Commun.* 365-357
- Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J. and Withers, S. G. (2008) Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 521-555
- Leatherbarrow, R. J. (2001) Grafit Version 5.0, Erithacus Software Ltd., Staines, UK
- Lee, R. C., Hrmova, M., Burton, R. A., Lahnstein, J. and Fincher, G. B. (2003) Bifunctional family 3 glycoside hydrolases from barley with α -L-arabinofuranosidase and β -D-xylosidase activity. *J. Biol. Chem.* 278, 5377-5387
- 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 enzyme glycoside hydrolysis and of glycosyl transfer by glycosidases and glycosyltransferases. *Carbohydr. Res.* 250, vii-xx
- Liab, K., Azadi, P., Collins, R., Tolan, J., Kim, J. S. and Ericksson C. E. L. (2000) Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme Microbiol. Technol.* 27, 89-94

- Likhoshesterov, L. M., Novikova, O. S., Derevitskaja, V. A. and Kochetkov, N. K. (1986) A new simple synthesis of amino sugar β -D-glycosylamines. *Carbohydr. Res.* 146, C1-C5
- Lykidis, A., Mavromatis, K., Ivanova, N., Anderson, I., Land, M., DiBartolo, G., Martinez, M., Lapidus, A., Lucas, S., Copeland, A., Richardson, P., Wilson, D. B. and Kyrpides, N. (2007) Genome sequence and analysis of the soil cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca* YX. *J. Bacteriol.* 189, 2477-2486
- Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1985) The modification of carboxyl groups. In: Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (eds) *Chemical Reagents for Protein Modification* (Vol. II, pp. 105-122). New York, CRC Press
- Mackenzie, C. R. and Bilous, D. (1988) Ferulic acid esterase activity from *Schizophyllum commune*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1170-1173
- Macauley, M. S., Whitworth, G. E., Debowski, A. W., Chin, D. and Vocadlo, D. J. (2005) O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis—Kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. *J. Biol. Chem.* 280, 25313–25322
- Mark, B. L., Vocadlo, D. J., Knapp, S., Triggs-Raine, B. L., Withers, S. G. and James, M. N. G. (2001) Crystallographic evidence for substrate-assisted catalysis in a bacterial beta-hexosaminidase. *J. Biol. Chem.* 276, 10330–10337
- Matte, A. and Fosberg, 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 -glycosidase using 5-fluoro glycosyl fluorides. *J. Biol. Chem.* 271, 6889-6894
- McDowell, R. H. 1967. In: *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*, pp. 88–96, 134–137. London, Academic Press
- 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
- Mosi, R. M. and Withers, S. G. (2002) Trapping of alpha-glycosidase intermediates. In: *Enzyme Kinetics and Mechanism, Pt F: Detection and Characterization of Enzyme Reaction Intermediates* (pp. 64–84). San Diego, USA, Academic Press Inc.
- 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., Yariv, J., and Bohak, Z. (1972) Reversible alkylation of a methionyl residue near the active-site of beta-galactosidase. *Biochemistry* 11, 3202-3208
- Nanmori, T., Watanabe, T., Shinke, R., and Kawanamura, 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 the 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
- Numao, S., Kuntz, D. A., Withers, S.G., and Rose, D. R. (2003) Insights into the mechanism of *Drosophila melanogaster* Golgi alpha-mannosidase II through the structural analysis of covalent reaction intermediates. *J. Biol. Chem.* 278, 48074-48083
- Offen, W. A., Zechel, D. L., Withers, S. G., Gilbert, H. J. and Davies, G. J. (2009) Structure of the Michaelis complex of beta-mannosidase, Man2A, provides insight into the conformational itinerary of mannoside hydrolysis. *Chem. Commun.* 2484-2486
- 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 systemic lupus erythematosus. *Med. Interne.* 22, 221-225
- Özcan, S., Kötter, P., and Ciciary, M. (1991) Xylan-hydrolysing enzymes of the yeast *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 190-195
- Paleg, L. G. (1959) Citric acid interference in the estimation of reducing sugars with alkaline copper reagents. *Anal. Chem.* 31 (11), 1902-1904
- Paoli, P., Fiaschi T., Cirri, P., Camici, G., Manao, G., Cappugi, G., Raugei, G., Moneti, G., and Ramponi, G. (1997) Mechanism of acylphosphatase inactivation by Woodward's reagent K. *Biochem. J.* 328, 855-861
- Patel, V. and Tappel, A. L. (1969) β -Glucosidase and β -xylosidase of rat kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 191, 653-662
- Petterson, R.C., 1984. The chemical composition of wood. In: Rowell, R. (Ed.), *Chemistry of Solid Wood*, Adv. Chem. Series 207, *American Chemical Society*, Washington, DC, pp. 57-126
- Pétra, P. H. (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

- Philips, 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
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H., F. and Amorim, D. S. (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 577-591
- Posta, K., Béki, E., Wilson, D. B., Kukolya, J., and Hornok, L. (2004) Cloning, characterization and phylogenetic relationships of cel5B, a new endoglucanase encoding gene from *Thermobifida fusca*. *J. Basic Microbiol.* 44, 383-399
- Poon, D. K. Y., Ludwiczek, M. L., Schubert, M., Kwan, E. M., Withers, S. G., and McIntosh L. P. (2007) NMR spectroscopic characterization of a beta-(1,4)-glycosidase along its reaction pathway: Stabilization upon formation of the glycosyl-enzyme intermediate. *Biochemistry* 46, 1759–1770
- 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., Puotanen, 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 -Glucuronidase in two microbial xylanolytic systems. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 83-88
- Puls, J. and Puotanen, K. (1989) Mechanisms of enzymatic hydrolysis of hemicelluloses xylans and procedures for determination of the enzyme activities involved. In: Ericksson, K. E. E., Ander, P. (eds) *Proceedings of the 3rd International Conference on biotechnology in the Pulp and Paper Industry*. STFI, Stockholm, pp 93-95
- Puls, J. and Schuseil, J. (1993) Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. In: Coughlan M. P. and Hazlewood G. P. (eds) *Hemicellulose and Hemicellulases* (pp. 1-27). Portland Press, London
- Quintero, D., Velasco, Z., Hurtado-Gómez, E., Neira, J. L. and Contreras L. M. (2007) Isolation and characterization of a thermostable β -xylosidase in the thermophilic bacterium *Geobacillus pallidus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1774, 510-518

- Reilly, P. J. (1981) Xylanases, structure and function. In: Hollaender A (ed) Trends in the biology of fermentation for fuels and chemicals. Plenum, New York, pp 111-129
- Rempel, B. P. and Withers, S. G. (2008) Covalent inhibitors of glycosidases and their applications in biochemistry and biology. *Glycobiology*. 18, 570-586
- Rizzatti, A. C. S., Jorge J. A., Terenzi, H. F., Rechia, C. G. V. and Polizeli, M. L. T. M. (2001) Purification and properties of a thermostable extracellular β -xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 26, 156-160
- Robinson, D. and Abrahams, H. E. (1967) xylan 1,4- β -xylosidase in pig kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 132, 212-214
- Rodnova, N. A., Tavobilov, I. M. and Bezborodov, A. M. (1983) beta-Xylosidase from *Aspergillus niger* 15: purification and properties. *J. Appl. Biochem.* 5, 300-312
- Rumbold, K., Biely, P., Mastihubova, M., Gudelj, M., Gubitz, G., Robra, K. H. and Prior, B. A. (2003) Purification and properties of a feruloyl esterase involved in lignocellulose degradation by *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microb.* 69, 5622-5626
- Rye, C. S. and Withers, S. G. (2000) Glycosidase mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 573-580
- Rye, C. S. and Withers, S. G. (2002) Elucidation of the mechanism of polysaccharide cleavage by chondroitin AC lyase from *Flavobacterium heparinum*. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 9756-9767
- Rye, C. S., Matte, A., Cygler, M. and Withers S. G. (2006) An atypical approach identifies TYR234 as the key base catalyst in chondroitin AC lyase. *ChemBioChem.* 7, 631-637
- 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
- Sergejewa, A. S., (1959). *Chemie des Holzes und der Cellulose*. Theodor Steinkopff Verlag, Dresden, 143
- Shallom, D., Leon, M., Bravman, T., Ben-David, A., Zaide, G., Belakhov, V., Shoham, G., Schomburg, D., Baasov, T. and Shoham, Y. (2005) Biochemical characterization and identification of the catalytic residues of a family 43 xylan 1,4- β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6. *Biochemistry* 44, 387-397

- 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., Tzotzos, G. T. and Marshall, S. E. (1982) Effect of aryl substituents on the kinetics of inactivation of glycosidases by glycosylmethyltriazenes: examination of the „suicide” nature of these inactivations. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 1665-1670
- 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
- Sivapriya, K., Hariharaputran, S., Suhas, V. L., Chandra, N. and Chandrasekaran, S. (2007) Conformationally locked thiosugars as potent alpha-mannosidase inhibitors: synthesis, biochemical and docking studies. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 5659-65
- Smaali, I., Rémond, C. and O'Donohue, M. J. (2006) Expression in *Escherichia coli* and characterization of β -xylosidases GH39 and GH-43 from *Bacillus halodurans* C-125 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 582–590
- St John, F. J., Godwin, D. K. Preston, J. F. Pozharski, E. and Hurlbert, J. C. (2009) Crystallization and crystallographic analysis of *Bacillus subtilis* xylanase C. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 65, 499-503
- Stephen, A. M. (1983) D-xylans In: Aspinall G. O. (ed) Polysaccharides (Vol. 2, pp. 166-178). 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
- Sokolovsky, M., Riordan, J.F., and Vallee, B.L. (1966) Tetranitromethane. A reagent for the nitration of tyrosyl residues in proteins. *Biochemistry*, 5, 3582–3589
- Spande, T. F. and Witkop, B. (1967) Reactivity toward N-bromosuccinimide as a criterion for buried and exposed tryptophan residues in proteins. *Methods Enzymol.* 11, 528–532
- Spiridonov, N. A. and Wilson, D. B. (2001) Cloning and biochemical characterization of BglC, a β -glucosidase from the cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca*. *Curr. Microbiol.* 42, 295-301.
- Stubbs, K. A., Scaffidi, A., Debowski, A. W., Mark, B. L., Stick, R. V., and Vocadlo, D. J. (2008) Synthesis and use of mechanism-based protein-profiling probes for retaining β -D-glucosaminidases facilitate identification of *Pseudomonas aeruginosa* NagZ. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 327–335

- Sun, J-Y., Liu, M-Q., Weng, X-Y., Qian, L-C. and Gu, S-H. (2007) Expression of recombinant *Thermomonospora fusca* xylanase A in *Pichia pastoris* and xylooligosaccharides released from xylans by it. *Food Chem.* 104, 1055-1064
- Sunna, A. and Antratikian, G. (1997) Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17, 39-67
- Takao, M., Akiyama, K., and Takuo S. (2002) Purification and characterization of thermostable endo-1,5- α -L-arabinase from a strain of *Bacillus thermodenitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1639-1646
- Takenishi, S. and Tsujisaka, Y. (1975) On the modes of action of three xylanases produced by strain of *Aspergillus niger* van Tieghem. *Agric. Biol. Chem.* 39, 2315-2323
- Tenkanen, M., Luonteri, E., and 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
- Tenkanen, M. and Siika-aho, M. (2000) An alpha-glucuronidase of *Schizophyllum commune* acting on polymeric xylan. *J. Biotechnol.* 78, 149-161
- 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, 362-368
- Topakas, E., Vafiadi, C., Stamatis, H., and Christakopoulos, P. (2006) *Sporotrichum thermophile* type C feruloyl esterase (StFaeC): Purification, characterization, and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis. *Enzyme Microb. Technol.* 36, 729-736
- Törönen, 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., Vrsanská, 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

- Vafiadi, C., Topakas, E., Wong, K. K. Y., Suckling, I. D. and Christakopoulos, P. (2005) Mapping the hydrolytic and synthetic selectivity of a type C feruloyl esterase (StFaeC) from *Sporotrichum thermophile* using alkyl ferulates. *Tetrahedron: Asymmetry* 16, 373–379
- Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J., and Linko, M. (1994) Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 335-350
- Viegas, A., Brás, N. F., Cerqueira, N. M., Fernandes, P. A., Prates, J. A., Fontes, C. M., Bruix, M., Carvalho, A. L., Ramos, M. J., Macedo, A. L. and Cabrita, E. J. (2008) Molecular determinants of ligand specificity in family 11 carbohydrate binding modules: an NMR, X-ray crystallography and computational chemistry approach. *FEBS J.* 275, 2524-2535
- Visser, J., Beldman, G., Kusters-van Someren, M. A. and Voragen, A. G. J. (eds.) (1992) *Xylans and Xylanases*, Elsevier, Amsterdam
- 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
- Vocadlo, D. J. and Withers, S. G. (2000) Identification of active site residues in glycosidases by use of tandem mass spectrometry. In: *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides. Methods in Molecular Biology* 146, 203-222
- Vocadlo, D. J., Davies, G. J., Laine, R. and Withers, S. G. (2001) Catalysis by hen egg-white lysosime proceeds via a covalent intermediate. *Nature* 412, 835-838
- Vocadlo, D. J., Wicki, J., Rupitz, K., and Withers, S. G. (2002) A case for reverse protonation: Identification of Glu160 as an acid/base catalyst in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* β -xylosidase and detailed kinetic analysis of a site-directed mutant. *Biochemistry* 41, 9736–9746.
- Wagschal, K., Heng, C., Lee, C. C., Robertson, G. H., Orts, W. J. and Wong, D. W. (2009) Purification and characterization of a glycoside hydrolase family 43 β -xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 155, 304–313
- 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
- Walvoort, M. T., Kallemeijn, W. W., Willems, L. I., Witte, M. D., Aerts, J. M., van der Marel, G. A., Codée, J. D. and Overkleeft, H. S. (2012) Tuning the leaving group in 2-

- deoxy-2-fluoroglucoside results in improved activity-based retaining β -glucosidase probes. *Chem. Commun.* 48, 10386-10388
- Watanabe, N. Akiba, T. Kanai, R. and Harata, K. (2006) Structure of an orthorhombic form of xylanase II from *Trichoderma reesei* and analysis of thermal displacement. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62, 784-792
- Weimar, T., Petersen, B. O., Svensson, B. and Pinto, B. M. (2000) Determination of the solution conformation of D-gluco-dihydrocarbose, a high-affinity inhibitor bound to glucoamylase by transferred NOE NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 326, 50-55
- Wen, L., Miao, Z. W., and Quing, 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: Pigman W. and Horton D. (eds) *The Carbohydrates* (Vol. 2a, pp. 447-469). Academic Press, New York
- Whitmore, L. and Wallace, B. A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* 32, W668-673.
- Whitmore, L. and Wallace, B. A. (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* 89, 392-400.
- Wicki, J., Rose, D. R., and Withers, S. G. (2002) Trapping covalent intermediates on β -glucosidases. *Methods Enzymol.* 354, 84-105
- Williams, S. J., Hekmat, O. and Withers, S. G. (2006) Synthesis and testing of mechanism-based protein-profiling probes for retaining endo-glycosidases. *ChemBioChem.* 7, 116-124
- Williamson, G., Faulds, C. B. and Kroon, P. A. (1998) Specificity of ferulic acid (feruloyl) esterases. *Biochem. Soc. Trans.* 26(2), 205-209
- Withers, S. G. and Aebersold, R. (1995) Approaches to labeling and identification of active-site residues in glycosidases. *Protein Sci.* 4, 361-372
- 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

- Wood, T. M. and McCrae, S. I. (1986) Studies of two low-molecular-weight endo-(1→4)- β -D-xylanases constitutively synthesised 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
- 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
- Yamamoto, K., Li, S., and Li, Y. (2000) β -Xylosidase. In: *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Part II., Vol. 3, 505, Ernst, B., Hart, G. W., Sinay, P., eds., Wiley Verlag Weinheim
- Yang, J. K., Yoon, H. J., Ahn, H. J., Lee, B. I., Kim, H. W., Laivenieks, M., Vieille, C., Zeikus, J. G. and Suh S. W. (2002) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of beta-xylosidase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, a thermophilic anaerobe. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58, 531-532
- Yang, L.-L., Tang, S.-K., Zhang, Y.-Q., Zhi, X.-Y., Wang, D., Xu, L.-H. and Li, W.-J. (2008) *Thermobifida halotolerans* sp. nov., isolated from a salt mine sample, and emended description of the genus *Thermobifida*. *IJSEM* 58, 1821-1825
- Yip, V. L. and Withers, S. G. (2006) Breakdown of oligosaccharides by the process of elimination. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 147–155.
- 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 glycosydases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 643-649
- 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., 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
- 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

8. PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

1. **Csaba Attila Fekete** and László Kiss
Purification and Characterization of a Recombinant β -D-xylosidase from *Thermobifida fusca* TM51
The Protein Journal (2012) 31(8), 641-650, DOI 10.1007/s10930-012-9440-7
IF: 1,038
2. **Csaba Attila Fekete** and László Kiss
A New Approach in the Active Site Investigation of an Inverting β -D-xylosidase from *Thermobifida fusca* TM51
The Protein Journal (2013) DOI 10.1007/s10930-013-9463-8
IF: 1,038
3. Kukolya József, **Fekete Csaba Attila**, Dóri-Tóth Zoltán, Vanderleyden Jos, Spaepen Stijn, Wilson David B., Kiss László
Cloning and biochemical characterization of a B-xylosidase (XynA). A new member of the hemicellulase enzyme system of *Thermobifida fusca*.
Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica (2005) 52 (Suppl.): 87.
IF: 0,787

Egyéb közlemények:

4. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Hemicelluláz enzimek stabilizálása nano-réteggel
Műszaki Szemle (2010) 52, 15-20. ISSN 1454-0746
5. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Stabilization of hemicellulase enzymes with nano-layer
Studia Universitatis Babes-Bolyai Seria Chemia (2010) LIV, 53-62. ISSN 1224-7154
(printed edition) ISSN 2065-9520 (online edition)
IF: 0.231
6. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Cellulase and hemicellulase enzymes as single molecular nanobiocomposites
Hungarian Journal of Industrial Chemistry (2011) 39 (3) 341-348. ISSN: 0133-0276
IF: 0.120
7. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**

Thermostable enzymes as single molecular nanobiocomposites

Internet Journal of Engineering and Technology for Young Scientists (2011) in press

Előadások és Poszterek:

8. **Fekete Csaba Attila**, Kiss László

A *Thermobifida fusca*-ból származó intracelluláris β -D-xilozidáz enzim működési mechanizmusának vizsgálata

MTA Szénhidrátkémiai Munkabizottság Ülése, Mátrafüred, 2007. május 23-25.

9. **Fekete Csaba Attila**, Kiss László

A *Thermobifida fusca*-ból származó intracelluláris β -D-xilozidáz enzim működési mechanizmusának vizsgálata

A Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi Vándorgyűlése, Debrecen, 2007. augusztus 26 – 29.

10. **Csaba Attila Fekete**, Teréz Barna, Rita Elek, Gyula Batta, József Kukolya and László Kiss

Investigation of the Active Site of the intracellular β -D-xylosidase from *Thermobifida fusca*

11th Bratislava Symposium on Saccharides, Smolenice, Slovak Republic, 21-26 September 2008

11. **Fekete Csaba Attila**, Elek Rita, Batta Gyula, Kukolya József, Kiss László és Barna Teréz

A *Thermobifida fusca*-ból származó intracelluláris β -D-xilozidáz enzim aktív centrumának topológiai vizsgálata

Biokémia, A Magyar Biokémiai Egyesület folyóirata, (2010) XXXIV. ÉVFOLYAM 3. SZÁM, P2-05

12. Rita Elek, Teréz Barna, Ágnes Hubert, **Csaba Attila Fekete**, Gyula Batta, László Kiss and József Kukolya

Transformation of *Thermobifida fusca* β -D-mannosidase to mannosynthase by site-directed mutagenesis

11th Bratislava Symposium on Saccharides, Smolenice, Slovak Republic, 21-26 September 2008

13. Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**, Elek Rita, Batta Gyula, Csendes Gergely, Tóth Ákos Kukolya József

Characterization of the hemicellulolytic system of the plant wall degrader model

- organism *Thermobifida fusca*
Annual Meeting of the Hungarian Society of Microbiology (2010) Book of abstracts,
p.8.
14. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Hemicellulóz bontó egyedi enzim nanorészecskék előállítása (*Single enzyme nanoparticles with hemicellulolytic activity*)
Műszaki Kémiai Napok '10 kiadványa (2010) Veszprém, pp. 208-215
 15. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Akrilamid réteggel stabilizált egyedi enzim nanorészecskék aktivitásának vizsgálata
(*Activity measurement of single enzyme nanoparticles using acrylamide layer*)
Műszaki Kémiai Napok '11 kiadványa (2011) Veszprém, pp. 149-156.
 16. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Single enzyme nanoparticles using thermostable hemicellulase enzymes, „*Challenges in Physical Chemistry and Nanoscience*” (ISACS2), Budapest, Hungary, 13-16 July 2010
 17. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Stabilization of cellulase and hemicellulase enzymes as enzyme nanoparticles,
EuroNanoForum 2011, Budapest, Hungary (*electronic version*)