



***Aspergillus carbonarius*-ból izolált extracelluláris
–D-glükózidáz működési mechanizmusának vizsgálata**

doktori (PhD) értekezés

Jäger Szilvia

**Debreceni Egyetem, TTK
Biokémiai Tanszék
Debrecen, 2003**

Ezen értékezést a Debreceni Egyetem TTK Kémia doktori program K/5 alprogramja keretében készítettem 1998-2003 között és ezúton benyújtom a Debreceni Egyetem doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2003. április 14.

Jäger Szilvia
doktorjelölt

Tanúsítom, hogy Jäger Szilvia doktorjelölt 1998-2003 között a fent megnevezett doktori alprogram keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglaltak a jelölt önálló munkáján alapulnak, az eredményekhez önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2003. április 14.

Dr. Kiss László
témavezető

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

Debrecen, 2003. április 14.

témavezető

doktorjelölt

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Kiss László tanszékvezető Úrnak, hogy vezetése alatt bekapcsolódhattam a Biokémiai Tanszéken folyó kutatómunkába, megismertette és megszerettette velem az enzimológiai kutatásokat, munkámat mindvégig figyelemmel kísérte és hasznos tanácsokkal segítette.

Köszönömet mondok Dr. Lipták András professzor Úrnak, az MTA Szénhidrátkémiai Kutatócsoport vezetőjének, hogy figyelemmel kísérte és támogatta értekezésem elkészítését a Biokémiai Tanszéken.

Hálával tartozom közvetlen munkatársaimnak és barátaimnak, Kiss Tündének és Somosi Ritának a munkámban nyújtott segítségükért és a kiváló munkahelyi légkör megteremtéséért.

Külön köszönet illeti munkatársaimat, Dr. Szurmai Zoltánt, Dr. Kerékgyártó Jánost és Dr. Bajza Istvánt a szintetikus munkában nyújtott segítségükért, Dr. Kandra Lilit és Dr. Gyémánt Gyöngyit értékes tanácsaikért.

Köszönetem fejezem ki Dr. Pócsi Istvánnak, Dr. Pusztahelyi Tündének és Dr. Forgács Katalinnak, akik a mikrobiológiai munkában nyújtottak segítséget és hasznos tanácsokkal láttak el.

Köszönöm Dr. Lenkey Bélának, hogy biztosította számomra az *Aspergillus carbonarius* törzset és lehetővé tette, hogy a DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszékén a fermentációs kísérleteket elvégezzem.

Köszönöm Dr. Brumbauer Anikónak, hogy rendelkezésemre bocsátotta az *Aspergillus niger* és *phoenicis* törzseket, valamint a fermentálásában nyújtott segítségét és jó ötleteit.

Köszönetet mondok a DE TTK Biokémiai Tanszék minden dolgozójának és mindazoknak akik bármilyen módon segítették ezen értekezés elkészülését.

Hálásan köszönöm szüleimnek és férjemnek a kitartó biztatást és támogatást, akik nélkül ez az értekezés nem készülhetett volna el.

RÖVIDÍTÉSEK

Ala	alanin
Arg	arginin
Asn	aszparagin
Asp	aszparaginsav
Avicel	kristályos cellulóz 100 % cellulóz tartalommal
Bcx	<i>Bacillus circulans</i> xilanáz
BSA	marha szérum albumin
CBM	carbohydrate binding module
CCD	counter-current distribution, ellenáramú elválasztás
CCl ₄	széntetraklorid
Cex	<i>Cellulomonas fimi</i> exoglikanáz
CMC	karboximetil-cellulóz
Cys	cisztein
	kémiai eltolódás
D	aszparaginsav
DCC	<i>N,N</i> -diciklohexil-karbodiimid
DEP	dietil-pirokarbonát
DMF	<i>N,N</i> -dimetil-formamid
DNS	dinitro-szalicilsav
E	glutaminsav
EDAC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid
EDAM	etilén-diamin-dihidroklorid
EI MS	elektrospray tömegspektrométer
G	glicin
GAM	glicinamid
Gln	glutamin
Glu	glutaminsav
Gly	glicin
HEC	hidroxietil-cellulóz
His	hisztidin
I	izoleucin
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
L	leucin
LC/MS/MS	foliadékkromatográffal kapcsolt tömegspektrométer
MW	molecular weight
N	aszparagin
NBAGA	<i>N</i> -brómacetil- -D-glükopiranozil-amin
P	prolin
pI	izoelektromos pont
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
<i>p</i> ATP-Glc	<i>p</i> -aminofenil 1-tio- -D-glükopiranozid
<i>p</i> NP-Ara	<i>p</i> -nitrofenil- -L-arabinopiranozid
<i>p</i> NP-Gal	<i>p</i> -nitrofenil- -D-galaktopiranozid
<i>p</i> NP-Glc	<i>p</i> -nitrofenil- -D-glükopiranozid
<i>p</i> NP-Xil	<i>p</i> -nitrofenil- -D-xilopiranozid
<i>p</i> NTP-Glc	<i>p</i> -nitrofenil 1-tio- -D-glükopiranozid
S	szerin

SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
Solca Flocc	ligninmentesített fenyőfa pép cellulóz és hemicellulóz tartalommal
SSF	solid-state fermentation, szilárd fázisú fermentáció
T	treonin
VRK	vékonyréteg kromatográfia
W	triptofán
WRK	Woodward reagens K (<i>N</i> -etil-5-fenilizoxazólium-3'-szulfonát)

1. BEVEZETÉS

A szénhidrátok, mono-, di-, oligo- vagy poliszacharidok formájában, egyedülálló szerepet játszanak a természetben. A kisebb oligoszacharidok esetén is csillagászati nagyságrendű a lehetséges monoszacharid kombinációk száma (Laine 1994), s ez eredményezi ezen vegyületek szerkezeti és funkcionális változatosságát, ami sokkal nagyobb, mint a hasonló méretű peptidek illetve nukleinsavak esetén lehetséges. Ezért játszhatnak az oligo- és poliszacharidok központi szerepet megannyi biológiai folyamatban. Ennélfogva az enzimek, melyek ezeket a molekulákat hidrolizálják –a glikozid hidrolázok– az élő szervezetben rengeteg biológiai folyamatban vesznek részt. Mozgósítják a tartalék energiaforrásként raktározott poliszacharidokat, jelentős szerepük van a glikolipidek és glikoproteinek oligoszacharid oldalláncainak metabolizmusában, ami igen fontos sejtek közötti jelátviteli folyamatokban illetve az extracelluláris fehérjék transzportjában. A humán gyógyászatban a glikozid hidrolázokat kódoló gének hibája felelős sok genetikusan öröklődő betegségért ill. a glikozid hidrolízis specifikus inhibitorai potenciális gyógyszerként szolgálhatnak, pl. diabétesz vagy vírusfertőzések esetén (Itzstein és Colman 1996, Taylor 1996).

A glikozidos kötés a legerősebb kötés a természetben előforduló biopolimerekben; a cellulóz és a keményítő spontán hidrolízisének felezési ideje nagyjából 5 millió év (Wolfenden 1998). Az enzimek, melyek ezen vegyületek hidrolíziséért felelősek igen nagy kihívással néznek szembe, mégis nagyon hatékonyan, 1000 s^{-1} sebességi állandóval valósítják meg ezt a feladatot. Ezáltal a biokatalizátorok között megérdemelten kapták az elismerést, mint a leghatékonyabban működő enzimek.

A cellulóz a legnagyobb mennyiségben előforduló, növényi biomasszából származó szénhidrát forrás, évente kb. 4×10^{10} tonna mennyiségben képződik (Coughlan 1985). Az elmúlt évtizedekben megnőtt az érdeklődés a cellulóz iránt, melynek oka, hogy az évről évre megújuló cellulózban hatalmas potenciális lehetőségek rejlenek; alapanyaga lehet az élelmiszer, üzemanyag- ill. vegyiparnak. Az alkalmazási területek közül a legfontosabb a bioetanol, mint környezetbarát üzemanyag vagy adalék alkalmazása, melynek használatával a modern kort fenyegető környezetvédelmi problémákat csökkenteni lehetne. Egy környezetbarát és gazdaságos etanol gyártási technológia kidolgozása nagy kihívást jelentett a

kutatók számára. A cellulóz biokonverziójának egyik ígéretes ága a cellulóz enzimatisz hidrolízise glükózzá. Az eljárás kiinduló anyaga a hatalmas mennyiségben rendelkezésre álló biomassza. Az enzimatisz hidrolízis során celluláz enzimrendszert alkalmaznak, mellyel elkerülik a melléktermék képződést és magasabb glükóz hozamot érnek el, mint a hagyományos savas hidrolízises eljárással. A cellulózból történő etanol előállítás sikere nagyrészt a lignocellulóz előkezelésén, nagyon hatékony celluláz enzimkomplex alkalmazásán és olyan mikroorganizmusokon múlik, amik hatékonyan fermentálják a glükózt etanollá. A celluláz enzimrendszerben a α -glükozidázok szerepe a köztitermék cellobióz lebontása, ami gátló hatású az enzimrendszer többi tagjára nézve. Ilyen módon a α -glükozidázok szerepe nem elhanyagolható a cellulóz enzimatisz lebontásában. Számos példa mutatja, hogy *Aspergillus* eredetű α -glükozidázokat sikeresen alkalmaztak cellulóz hidrolízis során, növelve ezzel az enzimatisz lebontás hatékonyságát. Az általam vizsgált, *Aspergillus carbonarius*-ból izolált α -glükozidázban szintén benne rejlik az ipari felhasználás lehetősége, s a téma érdekességét adta, hogy erről az enzimről és működési mechanizmusáról még nincs információ az irodalomban.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A –glikozidázok működési mechanizmusa

2.1.1. A glikozidázokról általában

A glikozid hidrolázok és glikozil transzferázok által katalizált reakciók a cukorgyűrű C-1 telített szénatomján végbemenő nukleofil szubsztitúciós reakciók. Ezek a reakciók végbemehetnek a cukorgyűrű anomer centruma konfigurációjának megőrzésével (retenció) vagy megváltozásával (inverzió). A retenciós enzimek esetén a glikozil csoport átvitele egyik hidroxil csoportról a másikra, azaz a glikozid hidrolázok és a glikozil transzferázok közötti különbség néha csak az átvitel fokának és a biológiai funkciónak a kérdése. Sok retenciós glikozidáz képes glikozil csoportot átvinni alkoholokra illetve léteznek glikozil transzferázok melyek hidroláz aktivitással bírnak. A mikroszkópikus reverzibilitás elvét figyelembe véve belátható, hogy ha egy glikozidáz *O*-glikozid szubsztrátját hasítva a glikozil csoportot alkoholra viszi át, a teljes reakció a konfiguráció megtartásával kell hogy végbemenjen, ellenkező esetben az enzim a szubsztrát mindkét anomerjével aktív lenne. A mikroszkópikus reverzibilitás nem alkalmazható olyan esetekben, ahol a távozó csoport és az akceptor molekula szerkezete alapvetően különbözik, ilyenkor a transzferáz a konfiguráció inverziójával működik. A gyakorlatban sokkal könnyebb megállapítani egy transzferáz aktivitás sztereokémiáját, mint egy hidrolázét, mivel a hidrolízis kezdeti termékei mutarotálhatnak (Sinnott 1987).

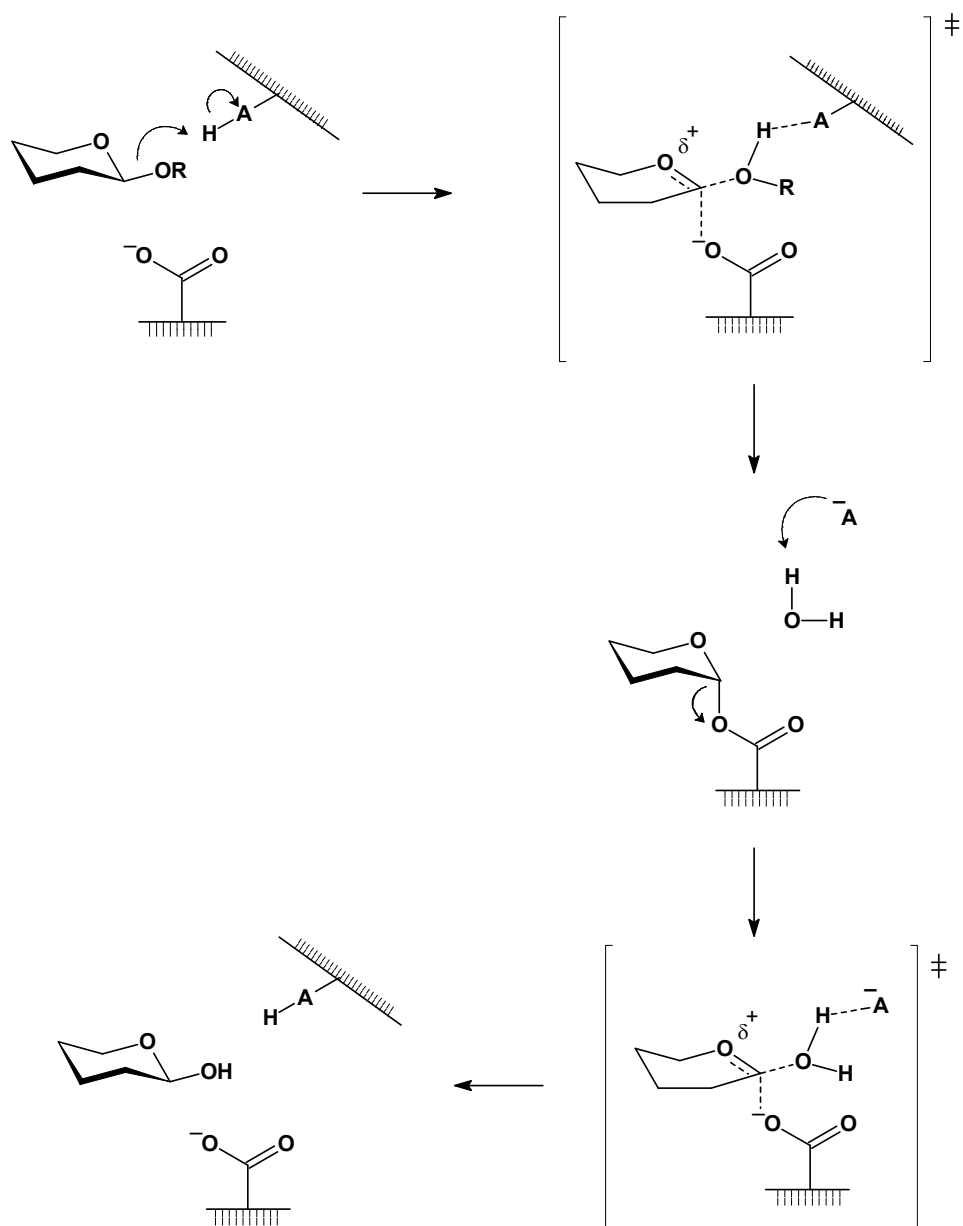
2.1.2. A retenciós glikozidázok

A glikozidázok működésére vonatkozó elméletek közül sok Phillips és mts-i munkáján alapult, akik úttörőnek számítanak abból a szempontból, hogy elsőként határozták meg egy enzim, a tyúktojás fehérjéből izolált lizozim (endo -1,4-*N*-acetyl-hexózáminidáz) szerkezetét röntgen krisztallográfia segítségével (Blake és mts-i 1967). A röntgen krisztallográfiával meghatározott szerkezet szerint az enzim hat szénhidrát kötőhellyel rendelkezik. Phillips és mts-i javaslata szerint a Glu35 savkatalitikus csoport protonálja a glikozidos oxigén atomot és az Asp52 negatív töltésű ion az aglikon távozása után stabilizálja a glikozil kation köztterméket. A kötés változások és a mechanizmus leírása kétségtelenül korrekt, azonban a kötések kialakulásának pontos időbeli sorrendje és energetikája nem határozható meg röntgen

krisztallográfia segítségével (Sinnott 1987). A hexózaminidázok esetén, így pl. a lizozimnál is sokáig úgy gondolták, hogy a pozitív töltést hordozó oxazolin gyűrű stabilizálja a közti terméket. Későbbi vizsgálatok során azonban mind a hexózaminidázoknál, mind a glikozidázoknál kiderült, hogy a köztitermék nem glikozil kation (ami stabilitási okokból nem is létezhet anionos nukleofil közelében), hanem oxokarbónium átmeneti állapoton keresztül kovalens glikozil–enzim köztitermék képződik (Vocadlo és mts-i 2001, Zechel és Withers 2001).

A jelenleg rendelkezésre álló működési mechanizmust leíró adatok a Koshland (1953) által mintegy 50 éve kidolgozott, retenciós glikozidázok működési mechanizmusára vonatkozó elmélettel írhatók le. Az elmélet szerint a mechanizmus fontos jellemzői: 1) egy savkatalitikus csoport ami a szubsztrát glikozidos oxigénjét protonálja; 2) az aglikonnal ellentétes oldalon található karboxilát csoport; 3) ez a karboxilát csoport a C-1 szénatommal axiális pozícióban kovalens glikozil–enzim köztiterméket hoz létre; 4) ez a kovalens intermedier oxokarbónium–ion átmeneti állapoton keresztül jön létre; 5) a sebesség növekedéséért különböző nem kovalens kölcsönhatások felelősek (1. ábra).

Az inverziós és a retenciós enzimek működésének különbözősége ellenére érdemes megjegyezni, hogy mindkét típusú enzim az aktív centrumban egy karboxil és egy karboxilát oldallánccal „működik” és a hidrolízis mindkét esetben oxokarbónium–ion átmeneti állapoton keresztül megy végbe. Az inverziós enzimek a glikozidos kötést egyetlen lépésben hasítják, ahol az egyik csoport bázisként (nukleofil), a másik savként (protonáló oldallánc) funkcionál. Az enzim működés sztereokémiáját a katalitikus csoportok térbeli elhelyezkedése határozza meg. A retenciós enzimek esetén a két katalitikus oldallánc egymástól kb. 5 Å távolságra helyezkedik el, az inverziós enzimek esetén ez a távolság kb. 10 Å, mivel a nukleofil víz molekulának be kell illeszkednie a bázis és az anomer C atom közé (Davies and Henrissat 1995).



1. ábra. A retenciós –glikozidázok Koshland féle működési mechanizmusa

2.1.3. Szekvencia homológia, feltételezett katalitikus csoportok

A szekvencia homológia vizsgálatok és a glikozid hidrolázok csoportosítása során felfigyeltek egy konzervált régióra néhány enzim szekvenciájában; 16, az A családba (Béguin féle család) tartozó celluláz tartalmazott egy N-E-P szakaszt (Clarke és mts-i 1993). Ezek közül két, egyébként kevés homológiát mutató celluláz esetén irányított mutagenézis vizsgálatokkal megerősítették, hogy a szakasz közepén levő Glu aminosavnak esszenciális

szerpe van a katalízisben (Baird és mts-i 1990). Ezt követően kimutatták, hogy ez a motívum jelen van az 1. család α -glükózidázaiban és a homológiát kiterjesztették egy-egy közeli Arg és His aminosavra is (Gräbnitz és mts-i 1991). Ez utóbbi aminosavak szerepének vizsgálatakor azonban kiderült, hogy nincs katalitikus szerepük. Az His esetében irányított mutagenézis és kémiai módosítási reakciók segítségével kimutatták, hogy nem töltheti be a proton donor szerepét, az Arg pedig valószínűleg az enzim kedvező struktúrájának kialakításában játszik szerepet (Belaich és mts-i 1992, Tomme és mts-i 1991). Míg a N-E-P szakasz Glu aminosaváról feltételezhető, hogy a katalízis során proton donorként működik (erre vonatkozóan az első bizonyítékot egy endoglükánáz esetén irányított pontmutációs vizsgálatokkal Wang és mts-i szolgáltatták, 1994), affinitás jelölés és csapdázási kísérletekkel más Glu/Asp aminosavak „személyében” azonosították a katalitikus nukleofil partnert. Withers és mts-i *Agrobacterium* α -glükózidáz esetén így azonosították a Glu-358 aminosavat katalitikus nukleofilként, ami egy másik konzervált blokkban helyezkedik el (I/V-T-E-N-G), ez a Béguin féle A családban a N-E-P szakaszhoz hasonlóan elterjedt (Withers és mts-i 1990). Glikozidázoknál ez volt a katalitikus nukleofil első egyértelmű azonosítása. Az A családba tartozó glikozidázok retenciós mechanizmussal működnek (Gebler és mts-i 1992b). Mind a N-E-P, mind az I/V-T-E-N-G motívum erősen konzervált az A család enzimei között, ami alapján feltételezhető, hogy az *Agrobacterium* α -glükózidáz Glu-358-nak megfelelő Glu aminosavak töltik be a katalitikus nukleofil szerepét a család glikozidázaiban (Trimbur és mts-i 1993). Hasonlóan, affinitás jelölés módszerrel azonosították a nukleofil *Cellulomonas fimi* α -exoglükánázban, ahol a nukleofilként meghatározott Glu274 egy, a α -glükánázokban konzervált I-T-E-L-D motívum glutaminsava (Tull és mts-i 1991). *Escherichia coli* lacZ β -galaktozidázban is egy Glu (Glu573) tölti be a nukleofil szerepét (Gebler és mts-i 1992a). Ezzel szemben a B család enzimjeiben Asp a nukleofil, ami egy másik, erre a családra jellemző szekvencia szakaszban helyezkedik el (G-X-X-X-S-D-W) (Clarke és mts-i 1993, Tull és mts-i 1991). Az inverziós enzim családok tagjaira nem jellemző, hogy hordoznak a fent említett konzervált szakaszokhoz hasonló blokkokat (Hazlewood és mts-i 1993, Damude és mts-i 1993, Teeri és mts-i 1987), habár B családbeli cellulázoknál kimutattak egy I-L-E-P motívumot (Gilkes és mts-i 1991).

2.1.4. A α -glükózidázok működése: egy remekül összehangba hozott katalízis

A retenciós α -glükózidázok aktív centrumáról kialakult kép szerint az aktív centrum szerkezetileg nagyrészt statikus ám elektronikusan dinamikus rés, a funkciós csoportok magas szintű rendezettségével. Az enzimes reakció során a szubsztrát az, ami egy sor konformációs

változáson megy át ebben a nagyrészt állandó keretül szolgáló részben és így a fehérje konformáció változásának problémája (ami sokkal bonyolultabb és lassítaná az enzim működését) elkerülhető. Nagy jelentőséggel bírnak az oxokarbónium ion átmeneti állapotot stabilizáló hatások, mint pl. a cukorgyűrű konformáció torzulása, amit a cukor 2-s helyzetű hidroxil csoportja és a nukleofil közötti hidrogén kötés stabilizál, illetve elektrosztatikus kölcsönhatások a gyűrű oxigénnel. Ma már az is egyértelmű, hogy a α -glikozidázok többségénél az átmeneti állapotok kovalens köztiterméket fognak közre (Zechel és Withers 2000). Az alábbiakban a α -glikozidázok működésének alapvető és legjellemzőbb vonásait tekintem át.

Nem kovalens kölcsönhatások: A legtöbb enzimnél a működés fontos részét képezik a nem kovalens enzim-szubsztrát kölcsönhatások, melyek legkedvezőbb módon az átmeneti állapotban vannak jelen/alakulnak ki. Közülük legfontosabbak a hidrogén kötések. A cukorgyűrű minden egyes hidroxil csoportjánál a hidrogén kötések jelentőségének igazolására jó módszer a 2,4-dinitrofenil α -glükózid szubsztráthoz hasonló, de az egyes pozíciókban hidroxil csoport helyett fluort tartalmazó származékok előállítása és részletes kinetikai vizsgálata. A módszert Namchuk és mts-i alkalmazták *Agrobacterium* α -glükózidáz esetén. A 2,4-dinitrofenil csoport, mint nagyon jó távozó csoport használata biztosította, hogy a deglikozilezés legyen a sebesség meghatározó lépés. Minden egyes szubsztrátra pre-steady-state és steady-state kinetikai paraméterek segítségével értékelték ki, hogyan járulnak hozzá az egyes hidroxil csoportok az átmeneti állapot stabilizálásához mind a glikozilezési és a deglikozilezési lépésnél. Az eredmények szerint a kötési kölcsönhatások a 3-s, 4-s és 6-s helyzetben egyenként 3-10 kJ mol⁻¹ energiával járulnak hozzá az átmeneti állapotok energiájához, míg alapállapotban a kötési energia sokkal kisebb (≤ 3 kJ mol⁻¹). A legfigyelemreméltóbb kölcsönhatás azonban a 2-s helyzetben jön létre, ami 18-22 kJ mol⁻¹ energiával segíti az átmeneti állapotok stabilizálását. A α -glikozidázoknál a 2-s helyzetű hidroxil csoport által kialakított hidrogén kötés általános jelenség, energiája egyes esetekben elérheti a 45 kJ mol⁻¹-t is (Namchuk és Withers 1995).

Az átmeneti állapot szerkezete: Ma már bizonyított, hogy a glikozidázok által katalizált reakciókban az átmeneti állapotban az anomer centrumnak oxokarbónium-ion jellege van (Namchuk és Withers 1995, McCarter és mts-i 1992), csakúgy, mint a spontán hidrolízis esetén. A glikozil kation két tulajdonságban különbözik a megfelelő glikozidtól; az O-5 és C-1 atomok között delokalizált pozitív töltés van és a C-5, O-5, C-1 és C-2 atomok egy síkban vannak. Ennélfogva a fenti tulajdonságokkal rendelkező monoszacharid származékoknak átmeneti állapot analóggént sokkal erősebben kell kötődniük az aktív

centrumhoz, mint az egyszerű glikozidoknak. Ugyanakkor a szoros kötődés szükséges, de nem elégséges feltétele annak, hogy egy molekula átmeneti állapot analóg legyen (Sinnott 1987). A valódi átmeneti állapot analóg inhibitorok inhibíciós hatékonysága összefüggésben kell, hogy legyen a megfelelő szubsztrát glikon specifitásával. Ilyen kapcsolat hiányában lehetséges, hogy egy vegyület csak azért bír jó gátló hatással, mert esetlegesen kölcsönhatás alakul ki az aktív centrum és az inhibitor között és nem szükségképpen az átmeneti állapottal való hasonlóság miatt (McCarter and Withers 1994).

Az aldonsav(1-5)laktonok 2-3 nagyságrenddel erősebben kötődnek az aktív centrumhoz, mint a szubsztrátok (Lalégérie és mts-i 1982). A C-5, O-5, C-1 és C-2 atomok egy síkban vannak, azaz képesek a félszék konformáció felvételére és az észter kötés miatt részleges pozitív töltés alakulhat ki a gyűrű oxigénen (Leaback 1968). Ezek a vegyületek valódi átmeneti állapot analógoknak tekinthetők (Pócsi és Kiss 1988), azonban nem stabilak. Ez utóbbi szempontból kedvezőbbek az 5-amino-5-dezoxi aldózok, pl. nojirimicin, mannonojirimicin, amik hatékonyan gátolják a α -glikozidázokat és α -mannozidázokat (Niwa és mts-i 1970, Legler és Jülich 1984). Ugyancsak jó inhibitorok a nojirimicinek redukált származékai, az 1,5-didezoxi-1,5-iminoalditok. Habár ezek szerkezete nem egyezik meg az átmeneti állapottal, protonált formájukban azonban nagyobb hasonlóságot mutatnak vele, mint akár az aldonsav(1-5)laktonok (Sinnott 1987). A fenti vegyületek erős inhibíciós hatása bizonyíték arra nézve, hogy az átmeneti állapot a retenciós glikozidázok esetén oxokarbónium ion jellegű.

A szubsztrát konformáció torzulása: először a tyúk tojásfehérje lizozim enziménél vizsgálták Phillips és mts-i, akik szerint a szubsztrátnak úgy kell torzulnia, hogy a gyűrű oxigén magányos elektronpárja antiperiplanáris legyen a hasadó kötéssel (Imoto és mts-i 1972, Deslongchamps 1983). Egy ilyen torzulás szerkezeti bizonyítékai azonban nem voltak egyértelműek. Újabb irodalmakban több példa is van a α -glikozidázok szerkezet vizsgálatára hasítatlan szubsztrátokkal melyek átérlik az aktív centrumot, s ahol a piranóz gyűrű nagy mértékű torzulását figyelték meg, 1S_3 csavart kád konformációba (Davies és mts-i 1998, Sulzenbacher és mts-i 1996, Tews és mts-i 1996). Egy ilyen torzulás, amit valószínűleg az enzim és a szubsztrát közötti kölcsönhatások alakítanak ki, több módon is elősegítheti a szubsztrát hasítását. Először is megengedi, hogy az enzim nukleofilje megtámadja az anomer centrumot, tehermentesítve az 1,3 diaxiális kölcsönhatástól, ami egyébként jelen van amikor elmozdítunk egy ekvatoriális távozó csoportot. A szubsztrátot közelebb mozdtítja az átmeneti állapot oxokarbénium ion konformációjához és egyúttal megfelelő pozícióba helyezi a glikozidos oxigént a savkatalitikus csoport általi protonáláshoz.

Sav/bázis katalízis: két glükóz molekula közötti glikozidos kötés hasításához alapvetően szükséges a savkatalízis, ugyanúgy, mint a bázis katalízis a nukleofil vízmolekula támadásának segítéséhez. A glikozidáz enzimek ezt a problémát nagyon jól „megoldották”. A sav/bázis katalitikus csoportok azonosításához a 3D szerkezet vizsgálatok nagyon jó segítséget nyújtanak. Egy másik lehetőség a szekvenciabeli hasonlóság alapján azonosított katalitikus csoportok vizsgálata mutánsok kinetikai analízisével.

A sav/bázis katalitikus csoportok helyettesítése metil csoporttal (Ala) vagy amid funkcióval (Asn, Gln) olyan mutánst eredményez, aminek a kinetikája nagyban függ a szubsztrát aglikon részének távozó tulajdonságától. Olyan szubsztrátoknál, ahol az aglikon nem jó távozó csoport és szükség lenne egy protonra a távozáshoz, pl. diszacharidok esetén, sav katalízis hiányában a glikozilezési lépés nagyon lelassul. Ugyanakkor nem változik jelentősen dinitrofenil illetve glikozil fluorid szubsztrátok esetén, melyeknél nincs szükség ilyen segítségre. A bázis katalitikus csoport eltávolítása miatt a deglikozilezési lépés viszont bármilyen, azonos glikon résszel rendelkező szubsztrát esetén egyformán lassul (200-2000-ed részére). Reaktív szubsztrátok alkalmazásakor ez a kovalens köztitermék felhalmozódásához vezet, ezt a szokatlanul alacsony K_m értékek is jelzik. Néhány esetben a köztitermék csapdába ejthető és izolálható (Lawson és mts-i 1997, Wang és mts-i 1995b).

A kinetikai paraméterek változása szükséges, de nem elegendő feltétel a sav/bázis katalitikus csoportok mutációjának jelzésére. Mutáció esetén változik a pH/sebesség profil is. Még döntőbb bizonyíték a sav/bázis katalitikus csoportok mutációjára, ha nukleofil anionok, pl. azid, formiát, acetát hozzáadása esetén jelentősen nő a szubsztrát hasítás sebessége olyan szubsztrátoknál ahol a deglikozilezés a sebesség meghatározó lépés. Ez egy konfigurációjú új termék képződésével jár együtt. Ennek oka, hogy az anion sokkal gyorsabban reagál a glikozil-enzim köztitermékkel, mint a víz a bázis katalitikus csoport hiányában. Vad típusú enzimeknél ez nem figyelhető meg, valószínűleg a töltés taszítás miatt a bázis nem engedi az aniont a szubsztrát közelébe. Ez a módszer a sav/bázis katalitikus csoport relatíve könnyű és biztos azonosítását teszi lehetővé.

Egy jó pozícióban levő karboxil csoportot tartalmazó szubsztrát alkalmazásával a sav/bázis mutánsok katalitikus aktivitása visszaállítható, mint azt Wang és Withers kimutatták. *Agrobacterium* -glükozidáz Glu170Gly sav/bázis mutánsánál a 2-karboxifenil -glükozid hasítása esetén a k_{cat}/K_m érték 10^7 -szer nagyobb volt, mint a 4-s helyzetben szubsztituált izomernél az intramolekuláris proton átadás miatt, azaz a katalitikus aminosav oldallánc helyett a szubsztrát funkciós csoportja biztosította a protont (Wang és Withers 1995a).

A következő eredmények azt sugallják, hogy a sav/bázis katalitikus csoport szigorú rendezettsége nem annyira kritikus az enzim működés szempontjából, mint a nukleofilé, s ez megegyezik a két folyamat eltérő sztereoelektronikus igényével. Ha a sav/bázis katalitikus oldallánc hosszát növelték vagy csökkentették *Bacillus circulans* xilanáznál (Glu172Ala és Glu172CysCH₂COOH), a glikozilezési lépés sebessége 2-23-ad részére csökkent aril xilobiozid és 400-ad részére xilán esetén (Lawson és mts-i 1997). Ennek ellentétéként a nukleofil oldallánc hosszát csökkentve, a glikozilezési lépés sebessége aril xilobiozid szubsztrátnál 1600-5000-od részére csökkent (Lawson és mts-i 1996).

A proton donor specifikus átmeneti állapot analóg inhibitorok kifejlesztése segített felfedni a sav/bázis katalitikus csoportok rendezettségének bonyolultságát és finomságát (Heightman és Vasella 1999). A GH-A klán glikozidázainál az 1,2,3-triazolok lényegesen rosszabb inhibitoroknak bizonyultak ($K_i=8000$ M), mint az 1,2,4-triazolok ($K_i=19$ M) és az imidazolok ($K_i=0.1$ M, mindhárom érték az édes mandula -glükozidázra vonatkozik) ami arra utal, hogy a glikozidos oxigén protonálása inkább a cukorgyűrű síkjában történik, mint felette. Ezt a feltevést megerősítette a *Bacillus agaradhaerens* celluláz cellobióz imidazollal képzett komplexének szerkezet vizsgálata (Varrot és mts-i 1999).

A sav/bázis katalitikus csoport pK_A értékének változását a katalízis különböző lépéseinél követték nyomon McIntosh és mts-i ¹³C NMR segítségével, *Bacillus circulans* xilanáz enzimével. A nukleofil (Glu78) és a sav/bázis katalitikus csoport (Glu172) karboxil csoportját ¹³C jelzéssel látták el. A pK_A értékek 4.6 és 6.7 voltak a Glu78 és a Glu172-re, azonosak azzal, amiket a k_{cat}/K_m pH függéséből határoztak meg. A 2-fluoro-xilobiozil-enzim köztitermék vizsgálatánál azonban a Glu172 pK_A értéke 2.5 egységgel alacsonyabb volt, mivel a deglikozilezési lépés ionizációs állapota ezt kívánja meg. A pK_A ilyen ciklikus változását az aktív centrum környezete változásának tulajdonítják. Ez abból ered, hogy a Glu78 hordoz-e töltést vagy sem és valószínűleg általános jellemzője a retenciós glikozidázok működésének (McIntosh és mts-i 1996).

Kovalens közti termék, csapdázás: a kovalens közti termék közvetlen csapdázását több módon is megvalósították. Az egyik módszer a szubsztrát 2-s vagy 5-s helyzetében egy fluor szubsztituens bevezetése, ami lelassítja a reakciót, mivel destabilizálja a pozitív töltést ami a közti termék kialakulásánál jön létre. Másrészt nem tud kialakulni a 2-s pozícióban levő hidroxil csoporttal a közti terméket stabilizáló hidrogén kötés (McCarter és mts-i 1997, Withers és mts-i 1988b). Mivel ilyen helyettesítések mind a glikozilezési és a deglikozilezési lépést lelassítják, egy jó távozó, pl. fluor vagy dinitrofenolát aglikon csoporttal rendelkező

szubsztrát biztosítja, hogy a glikozilezési lépés gyorsabb legyen a deglikozilezésnél, így a közti termék felhalmozódik.

A kovalens közti termék kialakulása egyértelműen kimutatható elektropray tömeg spektrométer (EI MS) analízissel, a ^{19}F NMR vizsgálatok pedig bizonyítják a kialakult kötés sztereokémiáját. Ezen köztitermékek (melyek tipikusan akár napokig is megmaradnak) katalitikus kompetenciáját bizonyítja, hogy akceptor cukrok jelenlétében transzglykozilezési folyamatban az átalakulásuk felgyorsul (Withers és Street 1988a). A köztitermék kialakulásában részt vevő nukleofil aminosav oldalláncot már számos esetben azonosították a jelölt fehérje proteolitikus emésztésével, amit a glikozilezett peptidlánc izolálása és szekvenálása követett (Withers és Aebersold 1995). Ezt a folyamatot jelentősen gyorsítja a folyadékkromatográffal kapcsolt MS (LC/MS/MS) illetve hasonló technikák alkalmazása, melyek segítségével a 26, retenciós glikozidált tartalmazó családból 13 család tagjainál azonosították a katalitikus nukleofilt (Zechel és Withers 1999).

A glikozil-enzim köztitermék tulajdonságaiba a legjobb bepillantást a csapdázott komplexek röntgen krisztallográfiás vizsgálatával lehet nyerni. Pl. a *Cellulomonas fimi* exoglikanáz (Cex) 2-dezoxi-2-fluoro-cellobiozil-enzim komplex szerkezetének röntgen krisztallográfiás vizsgálatakor a fehérje szerkezetében nem figyeltek meg lényeges változást, s a fehérjéhez kovalensen kötődő cukorgyűrű standard, $^4\text{C}_1$ szék konformációt vett fel (White és mts-i 1996). Különösen érdekes eredmény volt a cukorgyűrű 2-s helyzetű hidroxil csoportjával hidrogén kötést kialakító oldalláncok azonosítása, az a két csoport ami a fluor szubsztituenssel alakított ki kölcsönhatást. Ezek közül az egyik az Asn126, ami 2.8 Å távolságra helyezkedik el a fluortól. Irányított mutagenézis vizsgálatokkal azonban igazolták, hogy ez a konzervált oldallánc csak kb. 2.5 kcal mol $^{-1}$ energiájú kölcsönhatást hoz létre. A másik közeli atom a Glu233 katalitikus nukleofil karboxil csoport karboniljának oxigénje, ami annak ellenére, hogy a C $_2$ fluorral való kölcsönhatása destabilizáló, csak 3.1 Å távolságra van, jelezve, hogy egy fontos hidrogén kötés alakulhat ki, amikor a 2-s pozícióban hidroxil csoport van. Ezt a lehetőséget vizsgálták Notenboom és mts-i, akik a Cex cellobiózzal alkotott kovalens közti termékének szerkezetét vizsgálták. Ehhez egy kétszeres mutáns enzimet használtak, ahol a protondonor katalitikus csoportot, a Glu127-t Ala-ra, a His205-t, ami a nukleofil orientációját és ionizációs állapotát szabályozza, pedig Asn-ra cserélték ki. A cukor 2-s helyzetű hidroxilja és az Asn126 között nem figyeltek meg kölcsönhatást (4.4 Å), míg a Glu233 nukleofil karboxil csoport karboniljának oxigénje és a C $_2$ hidroxil közötti szokatlanul rövid távolság (2.4 Å) valóban erős hidrogén kölcsönhatást jelzett. Ez a kölcsönhatás az átmeneti állapot idején valószínűleg még erősebb és rövidebb, mivel a cukorgyűrű torzul,

jobban megközelítve a karboxilátot. Ehhez járul még az anomer centrumon kialakuló pozitív töltés, ami a C₂-OH savasságát átmenetileg növeli, ezáltal még jobb hidrogén donorrá téve azt. Valószínű, hogy ez általános jelenség a retenciós glikozidázoknál megfelelő helyzetű C₂-OH-t tartalmazó szubsztrátokkal (Notenboom és mts-i 1998a). *Bacillus circulans* xilanáz (Bcx) 2-dezoxi-2-fluoro-xilobiózzal alkotott közti terméke három dimenziós szerkezet vizsgálatánál érdekes eredményre lettek figyelmesek. Míg a nem redukáló végen levő xilóz rész normál, ⁴C₁ szék konformációban van, a redukáló vég felőli xilóz rész, amin keresztül a cukor észter kötéssel kapcsolódik az enzimhez, ^{2,5}B kád konformációba van eltorzulva (Sidhu és mts-i 1999). A Cex esetén (ami xilán és cellulóz specifitással is rendelkezik) a hasonló 2-dezoxi-2-fluoro-xilobiozil-enzim közti termékénél mindkét xilán gyűrű ⁴C₁ szék konformációban van (Notenboom és mts-i 1998b). A cukorgyűrű ilyen torzulását korábban még nem figyelték meg. A működési mechanizmus szempontjából ennek az a jelentősége, hogy ebben a konformációban a C-5, O-5, C-1 és C-2 atomok ideális helyzetben (egy síkban) vannak ahhoz, hogy az oxokarbénium ion stabilizálódjon az átmeneti állapotban. A Bcx tehát valószínűleg inkább kád, mint szék konformáción keresztül reagál.

A mechanizmus megváltoztatása mutagenézissel: az inverziós és retenciós enzimek átmeneti állapotának hasonlósága lehetővé tette, hogy az aktív centrumban levő nukleofil megváltoztatásával a mechanizmus is változzon. A normálisan inverziós mechanizmussal működő bakteriofág T4 lizozim mechanizmusát retenciósra alakították azáltal, hogy egy nukleofil oldalláncot (Glu vagy His) építettek be az aktív centrumba arra a helyre, amit egyébként a nukleofil vízmolekula foglal el (Kuroki és mts-i 1995, Kuroki és mts-i 1999). Ellentétes változtatást hajtottak végre az *Agrobacterium* -glükozidázán a nukleofilt alaninra változtatva (Glu358Ala), de az így kapott mutáns nem mutatott hidrolitikus aktivitást. Azonban, ha egy alternatív nukleofilt, pl. azidot vagy formiátot adtak a reakcióelegyhez, amiknek nincs szükségük bázis katalízisre, a reakció egészen hatékonyan ment a szubsztráttal ellentétes anomer konfigurációjú terméket eredményezve (Wang és mts-i 1994). Egyezően a kísérlet alapjául szolgáló inverziós mechanizmussal (Kasumi és mts-i 1987), ez a mutáns képes volt -glükozil-fluoridot hasítani, -cellobiozil-fluorid terméket képezve (Wang és mts-i 1994). Ez a felismerés vezetett a glikoszintázok „megalkotásához”, melyek olyan mutáns glikozidázok amik oligoszacharidokat szintetizálnak anélkül, hogy elbontanák őket (Mackenzie és mts-i 1998). Megfelelő akceptor cukor jelenlétében hatékonyan lehet oligoszacharidokat szintetizálni (pl. ebben az esetben -glükozil-fluorid donorral és glükóz akceptorral 92%-s hozamot értek el) (Wang és mts-i 1994). Ezt a módszert más enzimeknél is

alkalmazták már (Malet and Planas 1998), s a nagy léptékű enzimatisz szintézis megvalósításának lehetősége rejlik benne.

2.2. A glikozid hidrolázok csoportosítása

Az IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) a katalizált reakció típusa és szubsztrát specifikációja alapján sorolja különböző csoportokba az enzimeket. A glikozid hidrolázok (EC 3.2.1.x) esetén az első három szám jelzi, hogy az enzim *O*-glikozidos kötést hidrolizál, míg az utolsó számjegy utal a szubsztrát minőségére és néha a molekuláris mechanizmusra. Egy ilyen osztályozás előnye az egyszerűségében rejlik, azonban nem írja le megfelelően a többféle szubsztráton ható enzimeket és nem utal az enzimek szerkezetére.

Egy másik lehetséges mód az enzimek osztályozására a működési mechanizmus szerinti csoportosítás, azaz, hogy egy enzim retencióval vagy inverzióval működik-e. A működés sztereokémiája nem sajátja az IUBMB osztályozásnak és mivel összesen két csoportba sorolja az enzimeket, nem is lehet egyedüli alapja sem egy osztályozásnak (Henrissat and Davies 1997). Sinnott (1987) vezetett be egy, az enzim működés sztereokémiáján alapuló csoportosítást, ahol négy csoportot különböztetett meg a piranozidázokra, és ugyanígy a furanozidázokra ($e \rightarrow e$, $a \rightarrow a$, $e \rightarrow a$, $a \rightarrow e$).

Gyakran használt a glikozid hidrolázokra az „endo”, „exo” kifejezés, ami arra utal, hogy az enzim mely részén támadja meg a poliszacharid láncot. A glikozidázok katalitikus csoportjai általában az enzim három kiemelt részén lehetnek, melyeket Henrissat és mts-i zsebek, ároknak és alagútnak neveztek el (pocket, cleft, tunnel) (Davies és Henrissat 1995). Az exo-enzimek esetén az aktív hely a zsebben található, az endo-enzymeknél a katalitikus csoportok egy nyitott árokban helyezkednek el, ami véletlenszerű kötődést és hasítást tesz lehetővé a polimer láncon. A szálas, rostos poliszacharidok esetén, pl. cellulóz, követelmény az enzimmel szemben, hogy képes legyen folytonos vagy többszörös támadásra, azaz több helyen hasítsa a poliszacharid láncot anélkül, hogy elengedné. A cellobiohidrolázok jó példák erre. Ilyen esetekben, amikor ugyanaz az enzim képes a lánc végén és belsejében is hasítani, az endo, exo csoportosítás szintén nem állja meg a helyét (Henrissat és Davies 1997).

1991-ben Henrissat és mts-i olyan munkát kezdtek el, melynek során a glikozid hidrolázokat aminosav szekvenciájuk hasonlósága alapján rendezték osztályokba. A szekvenciák összevetése és a hidrofób blokkok vizsgálata jelentős homológiát tárt fel az összes ismert szekvenciájú glikozid hidroláz között (Henrissat 1991, Henrissat 1993,

Henrissat 1996). Henrissat és mts-i munkájának nagyságát és jelentőségét bizonyítja, hogy míg 1991-ben 301 szekvencia összehasonlításával 35 család létezett (Henrissat 1991), 2001-re már több mint ezer glikozid hidroláz aminosav szekvenciáját hasonlították össze és 85 családot hoztak létre (Bourne and Henrissat 2001). A α -glükozidázokat az 1. és 3. család foglalja magába (Henrissat 1991). Sok család tartalmaz olyan enzimeket, melyek szubsztrát specifikása különböző, míg hasonló szubsztrát specifikású enzimek tartozhatnak külön családokba. Az egyes családokat, melyeknél valószínűsíthető a közös eredet, azaz jelentős hasonlóságot tártak fel a negyedleges szerkezetben és a katalitikus csoportokban illetve a katalitikus mechanizmusban, ún. klánokba vagy szupercsaládokba sorolták. Ehhez járul még az enzimek egyre növekvő számban felderített háromdimenziós szerkezete, mely szintén segítette a glikozid hidroláz családok rokonságának felfedését és klánokba sorolását.

Béguin egy évvel korábban a cellulázok osztályozását írta le, Henrissat munkáját (Henrissat és mts-i 1989) véve alapul. 50 fungális és bakteriális cellulázt szintén hidrofób blokk analízis alapján 6 családba sorolt. Az endoglükánázok és cellobiohidrolázok 6 családja (A-F) mellett a BG család tartalmazta a β -glükozidázokat, amiket a BG családon belül A és B alcsaládokba sorolt. Az A alcsaládba főként bakteriális eredetű, a B alcsaládba fungális eredetű β -glükozidázok tartoznak. A Béguin féle A és B családok gyakorlatilag megfelelnek a Henrissat féle 1. és 3. családoknak (Béguin 1990).

Mivel a katalitikus mechanizmust az aktív centrum struktúrája határozza meg, a molekuláris mechanizmus azonos, konzervált egy családon belül. Ugyanígy, a jelentős szekvenciabeli azonosság hasonló fehérje „folding”-ot jelez, az egy családba tartozó enzimek nagy valószínűséggel ugyanolyan „folding” tulajdonságokkal rendelkeznek. Ezért lehetséges a homológia modellezés egy családon belül, amennyiben legalább egy tagjának a háromdimenziós szerkezete ismert. A háromdimenziós szerkezet vizsgálatok terén az utóbbi években jelentős eredményeket értek el, egyre több glikozid hidroláz térszerkezete vált ismertté. Mivel a 3D szerkezet még a szekvenciánál is jobban konzervált, néhány enzim család hasonló szerkezettel rendelkezik. Ez szolgál alapul a családok klánokba sorolásának (Henrissat 1996, Henrissat és Davies 1997). 2001-re 38 klán létezett (Bourne és Henrissat 2001), melyek közül a legnagyobb a GH-A klán, amit sokszor 4/7 szupercsaládként is emlegetnek, hiszen a proton donor és a nukleofil a (/)₈ hordó 4. és 7. szálán található (Jenkins és mts-i 1995). Ez a klán többek között a β -glükozidázokat tartalmazó 1. családot is magában foglalja, s a család enzimei közül többnek a 3D szerkezete ismert (Henrissat és Davies 1997). A 3. család szerkezetét eddig még nem derítették fel. Figyelemre méltó az 1. családba tartozó növényi (kukoricából származó) β -glükozidáz szerkezete, ahol a szűk

szubsztrát specifitásért (aromás aglikonok felé) egy rés-szerű aglikon kötőhely felel (Czjzek és mts-i 2000). Egy másik érdekes eredményről számoltak be Fort és mts-i (2001). *Bacillus agaradhaerens* celluláz Cel5A (5. család) szubsztrát analóggal (ahol az egyébként $-1,4$ kötésű oligoszacharid egyetlen $-1,4$ kötést tartalmazott) alkotott komplexének 3D szerkezet vizsgálata vezetett egy teljesen újfajta celluláz inhibitor felfedezéséhez. Ezeknek az inhibitoroknak 150-szer nagyobb affinitásuk van (150-szer jobb inhibitorok), mint a csak β kötést tartalmazó vegyületeknek. A röntgen krisztallográfiás szerkezet vizsgálat jelentőségét mi sem bizonyítja jobban, mint az, hogy segítségével egy évtizedeken át húzódó vita végére tettek pontot. A már említett, Phillips és mts-i által vizsgált tyúktojás lizozim működési mechanizmusát vizsgálták újra Vocadlo és mts-i (2001) mutagenézis, szerves kémia, tömeg spektrometria és röntgen krisztallográfia segítségével. A végeredmény, miszerint az Asp52 oldalláncon keresztül jön létre a kovalens glikozil-enzim köztermék, megdöntötte a sokáig köztudatban levő ion pár intermedier elméletet.

A glikozid hidrolázok gyakran mutatnak ún. moduláris szerkezetet, ahol a katalitikus egység tartalmaz egy vagy több mellék modult, ami általában (de nem mindig) a szénhidrát kötésért felelős (carbohydrate-binding module, CBM). Henrissat és mts-i a moduláris szerkezet szerint is csoportokba sorolták a glikozid hidrolázokat, jelenleg 22 ilyen csoport van (Bourne és Henrissat 2001). Pl. a *Pseudomonas fluorescens cellulosa* xilánáz A xilán kötő modulja (CBM-10 csoport) két „antiparallel” α -redőből áll, az egyik két szálból, a másik háromból áll, s ennek az egyik oldalát egy α -hélix keresztezi (Raghothama és mts-i 2000). A CBM-12 csoportba tartozó *Bacillus circulans* WL-12 kitináz A1 moduljának 3D szerkezetét NMR segítségével határozták meg (Ikegami és mts-i 2000). Ennek a modulnak, ami egyébként a kitint köti meg, a CBM-5 csoportra emlékeztető kompakt csavart β -szendvics (β -sandwich) struktúrája van (Brun és mts-i 1997).

Egy másik nagyon fontos eredménye az elsődleges szerkezet vizsgálatnak az, hogy a megfelelő konzervált aminosav oldalláncok azonosítása alapján megállapítható, hol helyezkednek el a potenciális katalitikus aminosav oldalláncok. Az 5. családba tartozó cellulázok esetén pl. az állandó (konzervált), potenciálisan katalitikus aminosav oldalláncok száma olyan kicsi, hogy közvetlenül lehetővé teszi az aktív centrum oldalláncainak előrejelzését (Henrissat és mts-i 1989). Továbbá, ha az adott enzim családban egy enzimnél egy katalitikus csoport pontosan ismert, meg lehet jósolni ugyanennek a csoportnak a jelenlétét a többi tag esetén is. Pl. *Agrobacterium* α -glükozidáz esetén (1. család) Withers és mts-i (1990) kimutatták, hogy a Glu-358 aminosav nukleofilként közvetlenül részt vesz a

glikozidos kötés hasításában. Ez a katalitikus csoport teljesen konzerváltnak tekinthető az 1. családban, kivéve egy enzim, a humán LPH I. és II. doménjának esetén.

Számos esetben bizonyították az Asp és Glu csoportok katalitikus szerepét a glikozid hidrolázoknál. Szerepelhetnek protonált formájukban proton donorként, nukleofilként vagy töltött állapotukban oxokarbónium ion stabilizáló ágensként (Sinnott 1990). A glikozid hidrolázok katalitikus csoportjainak előrejelzésére jó módszer az Asp és Glu csoportok konzerváltságának vizsgálata (Henrissat és mts-i 1989, Baird és mts-i 1990). Jó példa erre Gebler és mts-i (1992a) munkája, akik bebizonyították, hogy a 2. családba tartozó *Escherichia coli* -galaktozidáz (lacZ) aktív centrumában nem a Glu461, hanem a Glu537 a nukleofil. Mivel a β -glükuronidázok ugyanabba a családba tartoznak, ennek alapján meg lehet jósolni, melyik Glu oldallánc játssza a nukleofil szerepét a -glükuronidázoknál.

Kísérleti módszerekkel is alátámasztották a katalitikus csoportok helyzetének előrejelzését az Asp és Glu csoportok konzerváltsága alapján, ezzel is demonstrálva a módszer használhatóságát. A módszer egyszerű, viszont nagyon érzékeny a szekvenálás pontosságára illetve pontatlanságára. Henrissat és mts-i (1989) a 6. családban csak négy konzervált Asp és Glu katalitikus csoportot mutattak ki, azt javasolva, hogy ezeknél a cellulázoknál a katalitikus csoport a négy oldallánc közül kerül ki. Később, amikor a 6. család három dimenziós szerkezetét felderítették, kimutatták, hogy a katalitikus Asp nem egyezik meg a fenti négy oldallánccal és nem is konzervált egyik enzimben sem (Rouvinen és mts-i 1990). Mivel ez a megfigyelés ellentmondott annak az elképzelésnek, hogy az aktív centrumban található aminosavak jobban konzerváltak az enzim többi részén levőknél, újra szekvenálták a kritikus területet kódoló génszakaszt. Az eredeti rossz szekvencia helytelen lokális eltolódást eredményezett, s a korrigált gén szekvencia helyreállította a hiányzó katalitikus Asp-t a fehérjében (Gilkes és mts-i 1991).

2.3. Lignocellulóz, celluláz enzimrendszer

2.3.1. Lignocellulóz

A cellulóz enzimatisz konverziója glükózzá a szubsztrát fizikai tulajdonságai miatt egyáltalán nem egyszerű folyamat. A természetben előforduló cellulóz nagyrészt kristályos szálakból áll, s ezek a szálak egy szintén oldhatatlan polimerbe vannak beágyazva. Emiatt még kevésbé hozzáférhető a cellulóz a hidrolitikus enzimek számára.

A lignocellulóz három fő alkotója a cellulóz, a hemicellulóz és a lignin, melyek egy komplex struktúrát alkotnak; a cellulóz rostokat hidrogén és Van der Waals kötések kialakításával hemicellulóz és lignin burok veszi körül. A xilán fontos szerepet játszhat a sejtfaalak struktúrájának kialakításában kovalens és nem kovalens kötések segítségével.

A cellulóz -1,4 kötésű D-glükóz egységekből (8000-12000 glükóz egység) felépülő homopolimer. Az egyes cellulóz szálak között létrejövő hidrogén és Van der Waals kötések segítségével különböző kristályos formák jönnek létre. Kevésbé rendezett szerkezetű szálak esetén a cellulóz amorf állapotú, ilyenkor a celluláz enzimek számára könnyebben hozzáférhető.

A hemicellulóz elágazó láncú poliszacharid, mely pentózokból –D-xilóz, L-arabinóz–, hexózokból –D-glükóz, D-mannóz, D-galaktóz– illetve ezek acetilezett származékaiból épül fel. A xilán, ami sok növényben a hemicellulóz nagy részét alkotja, heteropoliszacharid. Váza 1,4 kötésű -D-xilopiranozid egységekből álló homopolimer, teljes hidrolíziséhez szükség van β -1,4-xilanázra és -xilozidázra. A hemicellulóz nem alkot kristályokat ezért relatíve könnyű cukorrá hidrolizálni, viszont a pentózok már nem fermentálhatók könnyen etanollá.

A lignin fenil-propán polimer, melyben a fenil-propán egységeket éter és C-C kötések kötik össze. A növényeket hatékonyan védi mikrobiális támadások ellen. A lignint nehéz hidrolizálni, ráadásul megakadályozza az enzimek hozzáférését a cellulózhoz. Abszorbeálja az enzimeket, főként a -glükozidázt, ezáltal részlegesen inaktívvá teszi őket és a folyamat során a reaktorban jelentős teret foglal el (Taherzadeh és mts-i 1997). Ezért fontos a lignin rész eltávolítása a lignocellulózból, erre (is) szolgálnak a különböző előkezelések (Chang és mts-i 1981).

2.3.2. Celluláz enzim rendszer

A cellulóz enzimatis leontása és a bioetanol előállítás jelentősége egyre nőtt az elmúlt években. A cellulózból kiinduló etanol gyártásban a celluláz enzimek előállításának költsége a teljes költség jelentős hányadát alkotja. Mivel az általam vizsgált *Aspergillus* eredetű -glükozidáz a cellulóz hidrolízisében játszik szerepet, fontos ismerni a celluláz enzimrendszer működését.

Celluláz enzimeket nagyon sok gomba (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Sclerotium*, *Schizophyllum*, *Monilia*, stb) és baktérium (*Clostridium*, *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Actinomyces*, stb.) termel (Coughlan 1985, Enari 1987). Celluláz termelés szempontjából a gombák állnak az érdeklődés középpontjában, hiszen azok extracellulárisan termelik ezeket az enzimeket, ezen belül is legrészletesebben a *Trichoderma*

és az *Aspergillus* fajokat vizsgálták. A baktériumok között csak néhány olyan faj van, ami elegendő mennyiségű enzimet termel ahhoz, hogy ipari jelentőséggel bírjon pl. *Clostridium* (Zeikus 1980), *Cellulomonas* (Hagget és mts-i 1978).

A celluláz enzim rendszer három típusú enzimből áll, melyek: endo-1,4- -glükánáz (endoglükánáz, EC 3.2.1.4), exo-1,4- -glükánáz (cellobiohidroláz, EC 3.2.1.91) és -1,4-glükozidáz (-glükozidáz, EC 3.2.1.21). A cellulázok előállításáról, tisztításáról, tulajdonságairól jelentős mennyiségű irodalom áll rendelkezésre (Reese 1977, Mandels 1982, Coughlan 1985).

Endoglükánázok: Az endoglükánázok a cellulóz alaplánc belsejében levő -1,4-glükozidos kötéseket hidrolizálják random módon. A cellobiózt nem bontják, hidrolizálják viszont az amorf cellulózt, cellodextrint, foszforsavval duzzasztott cellulózt és a szubsztituált cellulózt pl. kabroximetilcellulózt (CMC), hidroxietilcellulózt (HEC). Az enzim specificitása ezért kicsi. *Trichoderma reesei* fermentálása során az extracelluláris fehérjék 15-20 %-a endoglükánáz (Brown és Gritzali 1984). Az endoglükánázok támadásuk véletlenszerűsége alapján csoportosíthatók, azaz aszerint, milyen sűrűn támadják meg a szubsztrátot. Az endoglükánázok és a cellobiohidrolázok együttműködnek a kristályos cellulóz hidrolízisében. Wood (1981) szerint legalább két típusú endoglükánáz és cellobiohidroláz szükséges a hidrolízishez. Kyriacou és mts-i (1987) *Trichoderma reesei*-ből két típusú endoglükánázt izoláltak. Az endoglükánáz preparátumok általában 3-5 féle izomert tartalmaznak, melyek moltömegben, izoelektromos pontban, támadásuk rendszertelenségében és a végső termék arányban különböznek (Mandels 1982, Beldman és mts-i 1985). A különböző izoformákra a szubsztrátok nagy változatossága miatt van szükség. Az izoenzimek sokféleségét a fehérjéhez kapcsolódó szénhidrátláncok különbözősége biztosítja (Nakayama és mts-i 1976, Gong és mts-i 1979).

Cellobiohidrolázok: A cellobiohidrolázok a cellulóz lánc nem redukáló végéről cellobióz egységeket hasítanak le, magát a cellobiózt nem bontják. Nagyobb szubsztrát specificitással rendelkeznek, mint az endoglükánázok, ui. a szubsztituált cellulózt nem hidrolizálják. A cellobiohidrolázok a *Trichoderma reesei* fermentlevében a legnagyobb mennyiségben előforduló fehérjék. *T. reesei* cellulóz szubsztráton való tenyésztésekor az extracelluláris fehérjék 35-85 %-a cellobiohidroláz volt (Gritzali és Brown 1979, Gong és mts-i 1979). Az enzim működését a cellobióz gátolja, ezért van szükség -glükozidázra a cellulóz hidrolízise során. A cellulóz elcukrosításánál a legfontosabb a cellobiohidroláz és az endoglükánáz együttműködése, önmagában egyik sem képes hatékonyan hidrolizálni a kristályos cellulózt. *T. reesei*-nél két cellobiohidrolázt izolált Petterson, melyekről

megállapította, hogy a két formát különböző gének kódolják (Pettersen és mts-i 1981). Később mindkét enzim aminosav sorrendjét meghatározták (Fagerstam és mts-i 1984, Teeri és mts-i 1987). Fagerstam és Wood kimutatták, hogy *Trichoderma*-ból és *Penicillium*-ból származó cellobiohidrolázok együttműködve bontottak Avicelt (az Avicel egy kristályos cellulóz, 100% cellulóz tartalommal) és pamutszálat (Fagerstam és Pettersen 1980, Wood és McCrae 1986). Marsden és Gray (1986) a következőket állapították meg a *Trichoderma* cellobiohidrolázáról: legalább két izoenzim van jelen, melyek egymást segítve működnek. Ha más celluláz nincs jelen csak kis aktivitást mutatnak a kristályos cellulóz és a CMC felé. Hatékonyan hidrolizálják a kevésbé rendezett szerkezetű szubsztrátokat, fő terméként cellobiózt állítva elő. A cellobióz már 0.01 % koncentrációban erősen gátolja őket.

-*Glükózidázok*: A β -glükózidázok cellobiózt és oligoszacharidokat bontanak glükózzá. Nem képesek hidrolizálni a cellulózt vagy a magasabb tagszámú celloextrineket. A fungális és bakteriális eredetű β -glükózidázok természetes szubsztrátja a cellobióz, emellett alkil- és aril- β -D-glükózidok hidrolízisét is katalizálják. A cellulóz elcukrosításában nagyon fontos szerepük van: az endoglükánáz és cellobiohidroláz aktivitás termékeként keletkező cellobiózt hidrolizálják, ezáltal megakadályozzák a cellobióz felhalmozódását, ami a celluláz enzim rendszer többi tagjára nézve gátló hatású. Ezen kívül glükóz egységeket hasítanak le az oligoszacharid lánc nem redukáló végéről. Ilyen minőségükben sebességmeghatározó szerepük van a cellulóz hidrolízisében (Coughlan 1985). A cellobiózon kívül más β kötésű diglükózidokat is bontanak, pl. trehalóz, szoforóz, laminaribióz, gentiobióz, illetve némely esetben cellooligoszacharidokat is. Általában elmondható, hogy az oligoszacharid lánc hosszának növekedésével csökken a hidrolízis sebessége és az enzim affinitása a szubsztráthoz (K_m nő). Emert úgy karakterizálta a β -glükózidázokat, hogy megtartják a szubsztrát β konfigurációját, a dimer és trimer szubsztrátokkal nagyobb az aktivitásuk, mint a nagyobb tagszámú oligoszacharidokkal és transzferáz aktivitással rendelkeznek (Emert és mts-i 1974).

A *T. reesei* β -glükózidázának ipari alkalmazásakor gondot jelentett, hogy a cellulóz hidrolízis által felhalmozódott glükóz gátolta az enzim működését, ezért a cellobióz is felhalmozódott, ami viszont a többi enzimre volt gátló hatással (Woodward és Wiseman 1982). A gomba által extracellulárisan kiválasztott enzim mennyisége nem volt elegendő az ipari alkalmazáshoz, illetve a magas hőmérséklet miatt az enzim nagy része inaktiválódott. Ezekre a problémákra több megoldást ajánlottak: az enzim mennyiségét meg lehet növelni „külső” β -glükózidáz hozzáadásával; olyan mutánsokat kell izolálni, melyek nagyobb mennyiségű β -glükózidázt termelnek; a glükóz inhibíció elkerülésére a glükózt fruktózzá kell

alakítani, aminek már csak nagyon gyenge gátló hatása van egy mutáns *T. reesei* által termelt -glükózidázra (Woodward és Arnold 1981). Immobilizált „külső” -glükózidáz hozzáadásával többen próbálkoztak sikerrel, akár sejthez kötött enzimmel, poliakrilamid hordozóra rögzített enzimmel (Wheatly és Philips 1984) vagy kalcium algináttal immobilizált enzimmel (Jain és Ghose 1984). Coughlan (1985) különböző szerzők által vizsgált, különböző gombák által termelt -glükózidáz enzimek tulajdonságait hasonlította össze. Az enzimek nagy eltérést mutattak moltömeg, szénhidrát tartalom, pH és hőmérséklet optimum, K_m és K_i értékek (*p*NP-Glc és cellobióz szubsztátokkal) tekintetében. A moltömeg 35000 és 440000 Da között változott. Az enzimek általában savas karakterűek voltak, legnagyobb aktivitással savas pH-n, habár a pH optimum és stabilitás pH értékei nem feltétlenül estek egybe.

A *T. reesei*-t sokan tekintik a legjobb celluláz termelő gombának, annak ellenére, hogy viszonylag alacsony az extracelluláris -glükózidáz termelése (kb. 0.2 %-a az extracelluláris fehérje mennyiségnek.) (Allen és Sternberg 1980). Ezért az enzimes folyamat hatékonyságának növelése céljából a cellulóz elcukrosítása folyamán -glükózidáz kiegészítést alkalmaznak (Sternberg és mts-i 1977, Dekker és Wallis 1983). Az *Apergillus* fajok a legjobb β -glükózidáz források közé tartoznak (Sternberg és mts-i 1977, Srivastava és mts-i 1987). Emellett jó -glükózidáz termelő a *Thielavia terrestris* termofil gomba (Breuil és mts-i 1986), a *Dekkera intermedia* és a *Candida wickerhamii* „hipertermelő” mutánsai (Leclerc és mts-i 1985), a *Penicillium pinophilum* (Brown és mts-i 1987) vagy a *Trichoderma viride* (Fukuda és mts-i 1987). A fungális eredetű -glükózidázokról sokkal több információ áll rendelkezésünkre, mint a bakteriális eredetűekről. A különböző bakteriális -glükózidázok tulajdonságai szintén nagy eltérést mutatnak (Woodward és Wiseman 1982). A bakteriális -glükózidázok között sok a termofil, melyek 60 °C-n vagy még magasabb hőmérsékleten aktívak. Az enzimek általában a sejtfal és a sejtmembrán közötti periplazmatikus térben találhatóak (Ait és mts-i 1979).

2.3.3. Cellulázok működése

A cellulóz hidrolízis főtermékei, a cellobióz és a glükóz inhibitorai a celluláz komplex tagjainak. A végtermék gátlást széles körűen vizsgálták már, hiszen a cellulóz ipari méretű hidrolizálásánál az enzim ára jelentős költséget képvisel (Ladisich és mts-i 1981, Woodward és Arnold 1981). Mandels és Reese kimutatták, hogy a cellobióz 1 % koncentrációban gátolta a *T. reesei* endo- és exoglukanázát (Mandels és Reese 1964). *T. koningii*-ből származó endo- és exoglukanázra 0.05 % cellobióz már gátló hatással volt, 0.01 % glükóz jelenlétében a -glükózidáz aktivitás 20 %-l csökkent, míg a glükóz egyáltalán nem volt inhibitora az

exoglukanáz komponensnek (Wood és McCrae 1975). A cellobióz gátlás csökkentésének egyik lehetséges módja a celluláz komplex kiegészítése -glükozidázzal. Mandels és mts-i Avicel és Solca Floc (a Solca Floc egy ligninmentesített fenyőfa pép, cellulóz és hemicellulóz tartalommal) hidrolízis során *T. reesei* által termelt cellulázt egészítették ki *Aspergillus phoenicis* -glükozidázzal, melynek hatására a hidrolízis sebessége és foka is jelentősen nőtt (Mandels és mts-i 1981). Sternberg szerint, amikor *T. viride* cellulázhoz adtak *Aspergillus niger* -glükozidázt, a glükóz mennyisége megnőtt a hidrolizátumban (Sternberg és mts-i 1977).

A cellulóz hidrolízise összetett folyamat, ami magában foglalja legalább a három enzim együttműködését (endoglukanáz, cellobiohidroláz, -glükozidáz). Az együttműködés tényét elsőként Gilligan és Reese bizonyította már 1954-ben, *T. viride* és *Myrothecium cerrucaria* cellulázával (Gilligan és Reese 1954). A cellulóz hidrolízis foka mindhárom enzim együttes alkalmazása esetén nagyobb volt, mint a termékek mennyiségének összege amikor az egyes enzimek önállóan működtek. A működési mechanizmusra több modellt is javasoltak, melyek a sorozat mechanizmus (Reese 1977, Humphrey 1979), párhuzamos mechanizmus (Fan és mts-i 1980), endo-exo mechanizmus (Wood 1981).

3. CÉLKITŰZÉSEK

Az alábbiakban ismertetendő kutatási munkát két tényező is inspirálta. Mint az irodalmi áttekintésben is látható, az utóbbi évtizedekben egyre nagyobb érdeklődés mutatkozik a β -glükózidázok iránt biotechnológiai szempontból. Munkámmal a Biokémiai Tanszéken már több, mint egy évtizede folyó glikozid hidroláz enzimek működési mechanizmus vizsgálatát célzó kutatásokba kapcsolódtam be. A Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészmérnöki Kar, Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszékével (ahol a α -glükózidázok szerepét a cellulóz hidrolízisében és a bioetanol gyártásban vizsgálják) kialakított jó munkakapcsolat hozzájárult az elhatározáshoz, miszerint a Biokémiai Tanszéken a glikozidázok kutatását kiterjesztjük olyan enzimekre is, melyeknek potenciális biotechnológiai szerepük illetve jelentőségük van. Az *Aspergillus carbonarius* fajra azért esett a választásunk, mert a Biokémiai Tanszéken korábbi kutatások szerint ez a gomba faj nagyon jó α -xilozidáz termelőnek bizonyult. Kiterjesztve az új enzimforrások kutatását, munkám során *A. carbonarius* által termelt α -glükózidáz enzimet vizsgáltam. Erről az enzimről az irodalomban még nincs információ, viszont potenciálisan használható biotechnológiai eljárásokban.

Céljaink a következők voltak:

- 1) - az *A. carbonarius* gomba által termelt α -glükózidáz fermentálása és az enzimtermelés összehasonlítása más, ismert *Aspergillus* fajok β -glükózidáz termelésével
- a β -glükózidáz biokémiai jellemzése, kinetikai vizsgálata és tulajdonságainak összehasonlítása más, ismert *Aspergillus* fajok β -glükózidázainak tulajdonságaival
- 2) - az enzim tiszta formában történő kinyerése, működési mechanizmusának vizsgálata
- a szubsztrát kötőhely vizsgálata különböző inhibitorok alkalmazásával
- az aktív centrum felépítésében részt vevő és katalitikus szerepet játszó aminosav oldalláncok vizsgálata kinetikai módszerekkel és specifikus kémiai módosító reagenssekkel
- az *N*-brómacetil- α -D-glükopiranozil-amin, mint aktív centrum specifikus inaktivátor molekula szintézise és alkalmazása az enzim katalitikus csoportjának módosítására.

4. ANYAGOK, MÓDSZEREK

4.1. Mikroorganizmusok

Kísérleteimhez a következő mikroorganizmusokat használtam: *Aspergillus carbonarius* KLU-93, amit a Debreceni Egyetem TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszékétől kaptam. A törzs fenntartása Sabouraud-agaron történt –ferde agar– (1 % (w/v) mikológiai pepton, 1.6 % (w/v) bacto agar, 4 % (w/v) glükóz). Átoltás után a gombát egy hétig 26 °C-n termosztáltam amíg a spórák megjelentek, majd 4 °C–n tároltam tovább. Az *Aspergillus niger* BKM F-1305 és *Aspergillus phoenicis* QM 329 törzseket a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki Kar Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszéke bocsátotta rendelkezésemre. Ezeket is ferde agaron tároltam, ami 5 % (w/v) maláta kivonatot és 1.8 % (w/v) bacto agart tartalmazott, egy hétig 30 °C–n inkubáltam, majd 4 °C–n tartottam fenn a törzseket. A törzseket 2-3 havonta átoltottam.

4.2. Táptalajok

A három különböző *Aspergillus* faj fermentációjának összehasonlításakor az alábbi két táptalajt használtam. Egyébként, az *A. carbonarius* -glükózidázának működési mechanizmus vizsgálatához az enzimet a szilárd táptalajon állítottam elő.

A folyékony, ún. Mandels táptalaj receptjét a BMGE Mezőgazdasági Kémiai Technológia tanszékéről vettem. Az egyes anyagok mennyiségei g/l egységben a következők voltak: karbamid, 0.3; (NH₄)₂SO₄, 1.4; KH₂PO₄, 2; CaCl₂, 0.3; MgSO₄·7H₂O, 0.3; pepton, 0.75; élesztő kivonat, 0.25; glükóz, 10. A táptalaj ezen kívül tartalmazott nyomelemeket, amikből 1 %-s törzsoldatot készítettem és a táptalajhoz ezekből adtam a következő mennyiségeket: 0.5 ml/l FeSO₄·7H₂O; 0.16 ml/l MnSO₄; 0.14 ml/l ZnSO₄; 0.2 ml/l CoCl₂ (Mandels and Weber 1969). A táptalaj kezdeti pH-ja 5.8-6.0 volt.

A másik, szilárd táptalaj a Takeneshi által leírt táptalaj volt (Takeneshi és mts-i 1973), használatának a Biokémiai Tanszéken voltak hagyományai (Kiss és Kiss 2000). A táptalaj 20 g búzakorpát és 100 ml vizet tartalmazott.

4.3. β-Glükózidáz termelés

A rázatott lombikos, folyékony táptalajú fermentációnál a 750 ml-s Erlenmeyer lombikok 150 ml táptalajt tartalmaztak. A táptalajok beoltását 14 napos ferde agaros

tenyészetekről származó, 2 ml spóraszuszpenzióval végeztem ($5 \cdot 10^6$ spóra/ml). A tenyészeteket rázógépen rázattam (fordulatszám: 350/min) és 30 °C-n inkubáltam. A különböző *Aspergillus* fajok összehasonlító vizsgálatakor a tenyészetekből naponta vettem mintát, melyből enzimaktivitást és redukáló cukor tartalmat határoztam meg. A fermentáció 9 napig folyt, ezután a fermentlevet szűréssel választottam el a gomba micéliumtól.

A szilárd fázisú fermentációnál a táptalajt 500 ml-s Erlenmeyer lombik tartalmazta, ezt is 2 ml sróraszuszpenzióval oltottam be ($5 \cdot 10^6$ spóra/ml). A tenyészeteket 27 °C-n termosztáltam. A fermentációt 10 napig végeztem, az összehasonlító kísérletek esetén naponta vettem mintát (1 lombik/nap) az enzimaktivitás meghatározásához. 10 nap után az enzimet 100 ml desztillált víz hozzáadásával 3 órán át, 30 °C-n, 170/min fordulatszámon extraháltam majd szűrtem. Az *A. carbonarius* -glükózidázának vizsgálatához az enzimet 10 napos tenyésztéssel állítottam elő.

Minden kísérletet három párhuzamossal végeztem, a szórás értékek 15 % alatt voltak. A szűrleteket 3 mM PMSF proteázgátlóval kezeltem. Az így kapott nyers extraktumokat használtam a további enzimtisztításhoz.

4.4. Redukáló cukor tartalom meghatározás

A folyékony táptalajú fermentációknál a glükóz felhasználást dinitroszalicil sav (DNS) reagens segítségével határoztam meg (Miller 1959). 0.1-0.5 ml mintát desztillált vízzel 1.5 ml-re egészítettem ki, melyhez 3 ml DNS reagenst adtam. Az elegyet 5 percig forraltam, 16 ml deszt. víz hozzáadásával hígítottam, majd a kapott narancssárgás szín fényelnyelését 550 nm-n mértem. A kalibrációhoz glükóz oldatsorozatot használtam. A módszer szórása 2 % alatt volt.

4.5. Enzim aktivitás mérés

4.5.1. β -D-glükózidáz aktivitás mérés

A β -D-glükózidáz aktivitás meghatározásához az enzim mesterséges szubsztrátját, a *p*-nitrofenil β -D-glükopiranozidot (*p*NP-Glc) használtam, a reakció sebességét az enzimes reakció során felszabadult *p*-nitrofenolát ionok mennyiségének fotometriás mérésével határoztam meg.

A reakcióelegy tartalmazott 100 μ l 5 mM *p*NP-Glc törzsoldatot (0.02 M, pH 4.0 Na-acetát pufferben oldva), megfelelő mennyiségű enzim oldatot, végtérfogatót 1 ml-re egészítettem ki 0.02 M, pH 4.0 Na-acetát pufferrel. A reakcióelegyet 50 °C-n 10 percig inkubáltam, majd 2 ml 0.2 M, pH 10.0 Na-borát puffer hozzáadásával állítottam le. A

felszabadult *p*-nitrofenolát ionok mennyiségét 400 nm-n mértem Beckman-DU-65 spektrofotométerrel, kalibrációs egyenes felhasználásával. Az összehasonlító oldat az enzimen kívül minden komponenst tartalmazott. A méréseket három párhuzamossal végeztem, a módszer szórása $\pm 1\%$.

-D-glükózidáz aktivitást az enzim természetes szubsztrátjával, a cellobiózzal is mértem. A reakcióelegy (0.5 ml) cellobiózt és megfelelő mennyiségű enzimet tartalmazott 0.2 M Na-acetát pufferben (pH 4.0). Az inkubálást 50 °C-n 10 percig folytattam, majd a felszabadult D-glükóz mennyiségét enzimatis, D-glükóz oxidáz-peroxidáz kolorimetriás módszerrel határoztam meg (Hugget and Nixon 1957), melyhez a Reanaltól szereztem be a Glükóz diagnosztikai reagens készletet. A szórás $\pm 7\%$.

Az enzim aktivitást katal-ban adtam meg. Egy katal az az enzim mennyiség, amely 1 sec alatt 1 mol *p*-nitrofenolát iont szabadít fel a fenti reakció körülmények között.

4.5.2. β -D-galaktozidáz, -D-xilozidáz és -L-arabinozidáz aktivitás mérés

Ezeket az aktivitásokat a -D-glükózidázéval azonos körülmények között határoztam meg, természetesen a megfelelő szubsztrátokat használva, azaz *p*-nitrofenil β -D-galaktopiranozidot (*p*NP-Gal), *p*-nitrofenil β -D-xilopiranozidot (*p*NP-Xil) és *p*-nitrofenil α -L-arabinopiranozidot (*p*NP-Ara). A xilozidáz és arabinozidáz aktivitás mérésnél 10 mM szubsztrát oldatból használtam 100 μ l-t.

4.6. Fehérje tartalom meghatározás

A fehérje tartalmat a Hartree által módosított Lowry módszerrel határoztam meg (Hartree 1972), a kalibrációhoz marha szérum albumint (BSA) használtam (szórás: $\pm 2\%$). Ahol erre nem volt lehetőség (pl. a kromatofókuszálás frakcióinál) ott a fehérje tartalmat UV elnyelés alapján, 280 nm-nél határoztam meg (szórás: $\pm 1\%$).

4.7. Enzimmtisztítás

1. lépés: Hidrofób kölcsönhatás kromatográfia (HIC)

A nyers fermentléhez kevertetés közben 4 °C-n, 20 % (w/v) szilárd (NH₄)₂SO₄-t adtam, majd a képződött csapadékot centrifugáltam (10,000 x g, 10 perc). A felülúszót vittem fel a hidrofób oszlopra. A hidrofób oszlop Phenyl-Sepharose CL-4B töltetű volt (1x8 cm), amely 20 % (w/v) (NH₄)₂SO₄-t tartalmazó 0.02 M, pH 5.0 Na-acetát pufferrel volt ekvilibrálva. Első lépésként az oszlopot ugyanezzel a pufferrel mostam (200 ml), majd puffercsere után (sómentes 0.02 M, pH 5.0 Na-acetát puffer) eluáltam a megkötődött hidrofób enzimeket. 120 ml/h áramlási sebesség mellett 4 ml-s frakciókat szedtem. A nagy -

glükózidáz aktivitással rendelkező frakciókat egyesítettem, s ezt az oldatot használtam a további tisztításhoz.

2. lépés: Méretkizárásos kromatográfia

Az összegyűjtött aktív frakciókat Sephacryl S-300 töltetű oszlopra vittem fel (1.5x74 cm), amit előzőleg 0.2 M NaCl-t tartalmazó 0.02 M, pH 5.0 Na-acetát pufferrel ekvilibráltam. Az áramlási sebesség 60 ml/h volt. Az oszlopot az üres térfogatnak megfelelő 60 ml pufferrel mostam, majd 2 ml-s frakciókat szedtem. A magas β -glükózidáz aktivitással bíró frakciókat összegyűjtöttem és egy éjszakán át dializáltam 4 °C-n 0.025 M imidazol-HCl pufferrel (pH 6.2) szemben. A kromatográfiát az Amersham Biosciences GradiFrac FPLC rendszerével végeztem.

3. lépés: Kromatofókusztálás

A dializált enzim oldatot PBE 94 töltetű (1x18 cm) kromatofókusztáló oszlopra vittem, ami 0.025 M imidazol-HCl pufferrel (pH 6.2) volt ekvilibrálni. A pH gradienst a 8-szorosára hígított Polybuffer 74 oldattal alakítottam ki, melynek pH-ját 3.5-re állítottam. Az áramlási sebesség 30 ml/h volt. Azokban az esetekben, ahol 3.5-nél alacsonyabb végső pH-t kellett elérni (pH 3.1) -az *A. niger* és *A. phoenicis* enzimoldatának kromatofókusztálásakor- 8 ml Ampholine-t (pH 2.5-4) adtam 17 ml Polybuffer 74-hez és ezt az elegyet hígítottam 8-szorosára. 2 ml-s frakciókat szedtem, majd a tiszta, nagy β -glükózidáz aktivitású frakciókat egyesítettem.

4.8. Hőmérséklet optimum és stabilitás vizsgálatok

A hőmérséklet optimum meghatározásánál enzim aktivitást mértem 20-80 °C hőmérséklet tartományban mind *p*NP-Glc, mind cellobióz szubsztrátokkal. Az aktivitás mérések a 4.5. pontban leírtak szerint zajlottak (0.5 M *p*NP-Glc vagy cellobióz, 0.02 M pH 4.0 Na-acetát puffer, 10 perc), csak a hőmérséklet változott. A stabilitás méréseknél 2 órán át inkubáltam az enzimet különböző hőmérsékleteken (20-80 °C között) Na-acetát pufferben (pH 4.0), majd mértem a maradék aktivitást (mindkét szubsztráttal, 50 °C, 10 perc, pH 4.0).

4.9. pH optimum és stabilitás vizsgálatok

A pH optimum meghatározása során 2.5-8.0 pH tartományban, 0.02 M citrát-foszfát pufferben mértem a β -glükózidáz aktivitást, *p*NP-Glc és cellobióz szubsztráttal, 50 °C-n, 10 percig. A pH stabilitás vizsgálatoknál az enzimeket 2.5-8.0 pH tartományban 24 órán át inkubáltam 4 °C-n, majd maradék aktivitást mértem mindkét szubsztráttal, pH 4.0-n, 50 °C-n, 10 percig.

4.10. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

Az enzimoldat tisztaságának ellenőrzése és az enzim molekulatömegének meghatározása SDS-PAGE módszerrel történt. A gélelektroforézist Bio-Rad (Amersham Biosciences) készüléssel végeztem gradiens (5-20 %) poliakrilamid gélt használva (Laemmli 1970). Zsebenként kb. 40-60 μg fehérje mintát vittem fel, majd a futtatást gélenként 20 mA és 200 V egyenfeszültség alkalmazásával végeztem. A mintákat Coomassie Brilliant Blue R-250 festékkel festettem 50 °C-n 90 percig, majd a festék felesleg eltávolítása érdekében mosóoldat I-ben (25 % 2-propanol, 10 % ecetsav, 65 % deszt. víz) 2 órán át és mosóoldat II-ben (10 % 2-propanol, 10 % ecetsav, 80 % deszt. víz) egy éjszakán át rázattam a géleket. A molekulatömeg meghatározáshoz az Amersham Pharmacia moltömeg standard sorozatait használtam; HMW-SDS kalibrációs kit: miozin (212 kDa), α_2 -makroglobulin (170 kDa), β -galaktozidáz (116 kDa), transzferrin (76 kDa), glutaminsav dehidrogenáz (53 kDa) és LMW elektroforézis kalibrációs kit: foszforiláz b (94 kDa), BSA (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), szénsav anhidráz (30 kDa), szójabab tripszin inhibitor (20.1 kDa), α -laktalbumin (14.4 kDa). A β -glükózidáz molekula tömegének meghatározásához a retenciós faktorokat ábrázoltam a lg MW függvényében.

4.11. Kinetikai paraméterek meghatározása

A kinetikai vizsgálatok során tisztított enzim oldatot használtam. A reakciósebességet hat különböző szubsztrát koncentrációnál határoztam meg, melyek a 0.5-5 K_m koncentráció tartományba estek. Szubsztrátként *p*NP-Glc-t és cellobiózt használtam. Az aktivitásméréseket a 4.5. pontban leírtak szerint hajtottam végre. Kísérleteimet 3 párhuzamos, független méréssel végeztem. A K_m és V_{max} értékeket a GraFit program (Leatherbarrow 1990) segítségével határoztam meg, nem lineáris regresszióval.

4.12. A kinetikai paraméterek pH függésének vizsgálata

A kinetikai paraméterek pH függés vizsgálatakor a K_m és V_{max} értékeket az előző pontban leírtak szerint határoztam meg, azzal a különbséggel, hogy a reakciókat 0.02 M citrát-foszfát pufferben végeztem, s a pH-t 2.5 és 6.5 között változtattam. Egy adott pH-n tehát hat különböző, 0.5-5 K_m tartományba eső szubsztrát koncentrációnál enzim aktivitást mértem a 4.5. pontban leírtak szerint. A K_m és V_{max} értékeket a klasszikus Michaelis-Menten kinetika szerint, nem-lineáris illesztéssel határoztam meg a GraFit program segítségével. A szabad enzimre, valamint az enzim-szubsztrát komplexre jellemző savi disszociációs

állandókat (K_{E1} , K_{E2} , K_{ES1} , K_{ES2}) a diprotikus enzim modell alapján, szintén nem lineáris illesztéssel adtam meg.

4.13. Inhibíciós vizsgálatok

Az inhibíciós kinetikai vizsgálatoknál a különböző inhibitorok jelenlétében (glükóz, glükonsav(1-5)lakton, *p*-nitrofenil-1-tio β -D-glükózid –*p*NTP-Glc–, *p*-aminofenil-1-tio β -D-glükózid –*p*ATP-Glc–) határoztam meg a reakció sebességét. Az inhibitorok mennyiségét 0.5-3 K_i tartományban, 6 különböző koncentrációban változtattam. Szubsztrátként *p*NP-Glc-t használtam, melyet 4 különböző koncentrációban –0.5-3 K_m között– alkalmaztam. Az aktivitás mérést a 4.5. pontban leírtak szerint végeztem. A K_i értékét a Dixon módszerrel határoztam meg.

4.14. Karboxil oldalláncok kémiai módosítása

A katalízisben feltehetően részt vevő karboxil csoportok szelektív kémiai módosítását nukleofil glicin-metil-észter jelenlétében vízzeloldható karbodiimid reagenssel (EDAC) és Woodward K reagenssel (WRK) végeztem (Lundblad és Noyes 1985, Keresztessy és mts-i 1994a).

Az EDAC-l végzett kinetikai vizsgálatoknál a reakciót desztillált vízben végeztem; a 2 ml reakcióelegy 40 μ g enzimet, 7-40 mM EDAC-t (60 mM törzsoldatból) és 0.5 mM glicin-metil-észtert tartalmazott. A reakciókat az EDAC oldat hozzáadásával indítottam, s minden mérést 3 párhuzamos átlagaként adtam meg. A reakcióelegy pH-ját manuálisan HCl oldat segítségével állítottam pH 4.75-re, a reakció szobahőmérsékleten folyt (25 °C). A maradék hidrolitikus aktivitás meghatározásához a reakcióelegyből meghatározott időnként mintát vettem (50 μ l) melyből aktivitást mértem: 4.2 mM *p*NP-Glc (6 K_m) jelenlétében 50 °C-n 10 percig inkubáltam a módosított enzimet, a reakciósebességet a 4.5. pontban leírtak szerint határoztam meg. Az összehasonlító oldatok azonos összetételűek voltak, csak EDAC-t nem tartalmaztak. Az inhibíció kinetikáját Ray és Koshland (1961) módszere alapján határoztam meg, az elméleti görbéket a kísérleti pontsorra GraFit program segítségével illesztettem. A maradék aktivitást ábrázolva az idő függvényében kétfázisú görbét kaptam, melyből Ray és Koshland módszere szerint (3. egyenlet) meghatároztam a két szakaszra jellemző látszólagos sebességi konstansokat (k_{app1} , k_{app2}). A különböző reagens koncentrációkhoz tartozó k_{app1} és k_{app2} látszólagos sebességi konstansok reciprokát ábrázolva az 1/EDAC koncentráció függvényében, a kapott egyenesek meredeksége jelenti a valódi sebességi konstansokat (k_1 és

k_2). A $\lg k_{app1} - \lg$ EDAC koncentráció ábráról pedig a reakció rendűségére lehet következtetni.

Annak a bizonyítására, hogy a reagens valóban az aktív centrumban levő oldalláncot módosította, kompetitív inhibitor (p NTP-Glc, $K_i=2$ mM) alkalmaztam. A reakcióelegy ebben az esetben az enzim mellett 30 mM EDAC-t és 0.5 mM glicin-metil-észtert tartalmazott. Ezt inkubáltam 10 mM ($5 K_i$) p NTP-Glc jelenlétében illetve hiányában. A meghatározott időnként vett mintákból aktivitást mértem a fent leírtak szerint. A maradék aktivitást ábrázoltam az idő függvényében, az elméleti görbét a (3) egyenlet alapján illesztettem (Ray és Koshland 1961) GraFit programmal.

Az EDAC-s inaktiválás pH függésének vizsgálatakor 6 különböző pH értéken, pH 3.5 és 6.5 között végeztem el a módosítást, 30 mM EDAC-l és 0.5 mM glicin-metil-észterrel. Az oldatok pH-ját manuálisan állítottam be HCl vagy NaOH oldattal. Az egyes pH értékeknél a maradék aktivitást ábrázoltam az idő függvényében, innen meghatároztam a látszólagos sebességi állandókat (k_{app1}), majd pedig ezeket ábrázoltam a pH függvényében. Az elméleti görbét az (5) egyenlet alapján, GraFit program segítségével illesztettem.

A WRK-val végzett inhibíciós vizsgálatoknál a reakciót pH 5.0 0.02 M Na-acetát pufferben végeztem, 50 °C-n. A 2.5 ml reakcióelegy 43 µg enzimet tartalmazott, s az inaktiválást 20-50 mM WRK jelenlétében végeztem, minden esetben 3 párhuzamos méréssel. A maradék hidrolitikus aktivitás meghatározásához a reakcióelegyből meghatározott időnként mintát vettem (75 µl), melynek a következő módon határoztam meg az aktivitását; 4.2 mM p NP-Glc jelenlétében 50 °C-n 10 percig inkubáltam az enzimet, majd meghatároztam a reakciósebességet a 4.5. pont szerint. A kontroll oldatok a WRK kivételével ugyanazokat a komponenseket tartalmazták, mint a reakcióelegyek. A folyamat kinetikáját Kitz és Wilson (1962) módszere szerint határoztam meg. A kinetikai paraméterek meghatározásához ábrázoltam a relatív sebesség (A_0/A) logaritmusát az idő függvényében, ahol az egyenes meredeksége megadja a látszólagos sebességi állandók (k_{app}) értékeit a különböző inaktivátor koncentrációknál. A látszólagos sebességi állandók reciprokát ábrázolva a WRK koncentrációk reciprokának a függvényében, megkaptam a folyamat inhibíciós konstansát (K_i) és sebességi konstansát (k_i). A $\lg k_{app} - \lg$ WRK ábrázolásból a reakció rendűségére lehet következtetni.

Az inaktivátor aktív centrum módosító jellegének bizonyítására vizsgáltam az inaktivációt kompetitív inhibitor, p NTP-Glc jelenlétében is. A reakcióelegyben a WRK koncentrációja 25 mM volt és 20 mM ($10 K_i$) p NTP-Glc-t tartalmazott. A két kontroll oldat

ugyanilyen összetételű volt, csak inhibitor, illetve inhibitor és WRK nélkül. A meghatározott időnként vett minták aktivitását a fent leírtak szerint mértem meg. A maradék aktivitást ábrázoltam az idő függvényében, majd az ismertetett módon meghatároztam a sebességi állandókat.

A kinetikai paraméterek változásának vizsgálatához a következő reakcióelegyet állítottam össze: 3 ml 0.02 M, pH 5.0 Na-acetát pufferben, 50 °C-n folyt a reakció, ami 50 mM WRK-t és 256 µg enzimet tartalmazott. Megfelelő időnként mintát vettem a reakcióelegyből (320 µl-t) melyekből eltávolítottam a WRK felesleget; Sephadex G-25 (1x5cm) oszlopokon engedtem át a mintákat. Az oszlopokat előzőleg 0.02 M, pH 5.0 Na-acetát pufferrel ekvibráltam és az enzimet is ilyen pufferrel eluáltam az oszlopról, 2 ml-s frakciókat szedve. A kinetikai paramétereket a 4.11. pontban leírtaknak megfelelően határoztam meg, azaz 0.5-5 K_m között, 6 különböző szubsztrát koncentrációt használva mértem a reakció sebességét a módosított enzimmel.

4.15. Inaktiválás affinitás jelölővel

Az enzim aktív centrumában található katalitikus karboxil oldalláncok azonosítására speciális affinitás jelölő molekulát, *N*-brómacetil- *D*-glükopiranozil-amint (NBAGA) alkalmaztam.

Az inaktiváció kinetikai paramétereinek meghatározásához inkubáltam az enzimet az NBAGA jelenlétében. A reakciót pH 4.0, 0.02 M Na-acetát pufferben végeztem, 50 °C-n. A 2.5 ml reakcióelegy 85 µg enzimet és 1.0-3.0 mM NBAGA-t tartalmazott, a kontroll oldatok az inaktivátor kivételével azonos összetételűek voltak. A mérési eredményeket 3 párhuzamos átlagként adtam meg. Meghatározott időnként mintát vettem (70 µl), melyből maradék aktivitást határoztam meg; 0.5 mM *p*NP-Glc jelenlétében 50 °C-n 10 percig inkubáltam a módosított enzimet, majd a 4.5. pont szerint meghatároztam a reakciósebességet. Az inaktiváció kinetikai paramétereinek meghatározása azonos módon történt, mint a WRK-s módosítás esetén, Kitz és Wilson módszere szerint.

Vizsgáltam a *p*NTP-Glc kompetitív inhibitor hatását az inaktiválási reakcióra, mely kísérlettel az NBAGA aktív centrum módosító jellegét kívántam bizonyítani. A fenti körülményekkel egyező reakcióelegy 3.0 mM NBAGA-t és 8.0 mM (4 K_i) *p*NTP-Glc-t tartalmazott (a kontroll nem tartalmazott inhibitor) pH 4.0 Na-acetát pufferben, s 50 °C-n inkubáltam. A meghatározott időnként vett mintákból (70 µl) maradék aktivitást mértem 3.5 mM (5.0 K_m) szubsztrátot használva, a 4.5. pont szerint.

Végeztem kísérleteket az inaktiválás pH függésének meghatározása céljából. Ennek során állandó inaktivátor koncentrációnál (3 mM) különböző pH-n mértem az inaktiválás sebességét. A reakcióközeg 0.02 M citrát-foszfát puffer volt (pH 3.0-7.5), a reakcióelegy összetétele egyébként megegyezett a fent leírtakkal. A kontroll oldat az enzimet tartalmazta a megfelelő pH-jú pufferben. A meghatározott időnként vett mintákból maradék aktivitást mértem 0.5 mM *p*NP-Glc jelenlétében, majd ábrázoltam a látszólagos sebességi állandót a pH függvényében.

4.16. Szintetikus módszerek

N-Brómacetil- -D-glükopiranozil-amin szintézise

Az NBGA-t két lépésben állítottam elő laboratóriumunkban. Az első lépésben brómcetsav-anhidridet szintetizáltam, majd ezt -D-glükopiranozil-aminnal reagáltatva kaptam az NBAGA terméket. A szintézist Thomas (1977) leírása alapján végeztem.

Brómcetsav-anhidrid előállításához 2.86 g brómcetsavat vízmentes körülmények között, argon atmoszféra alatt 14.3 ml absz. széntetrakloridban oldottam. Az oldatot jeges vízzel 0 °C-ra hűtöttem, és kevertetés mellett hozzáadtam 2.42 g (1 ekvivalens) *N,N'*-diciklohexil-karbodiimid (DCC) széntetrakloridos oldatát (8.4 ml). A DCC-ből azonnal *N,N'*-diciklohexil-karbamid vált ki finom, fehér csapadék formájában. 5 perc 0 °C-n történő reagáltatás után 15 percen keresztül hagytam felmelegedni az oldatot szobahőmérsékletre. A csapadékos oldatot G5-s üvegszűrőn leszűrtem és 2x6 ml hideg absz. széntetrakloriddal mostam.

Az NBAGA előállításához 150 mg (1 ekvivalens) -D-glükopiranozil-amint oldottam 3 ml dimetil-formamidban, majd argon atmoszféra alatt hozzáadtam 5 ml brómcetsav oldatot amely (100 %-s kitermelést feltételezve) 450 mg (2 ekvivalens) brómcetsav anhidridet tartalmazott. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakció előrehaladását félóránként vékonyréteg kromatográfiával követtem nyomon, futtatószerként metanol:acetone = 1:1 arányú elegyét alkalmazva. A dimetil-formamid jelenléte miatt a lemezre felcseppentett foltokat 15 percig olajszivattyúval szárítottam. A VRK során Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) típusú lemezt használtam. Az előhívás 50 %-s vizes kénsav oldatos permetezéssel, majd melegítéssel történt. 1.5 óra reakcióidő után az elegyet levegőn, lassan kevertetve 135 ml jéggel hűtött dietil-éterre csepegtettem. További 60 perc kevertetés után kivált az éterben nem oldódó termék, amelyet G5-s üvegszűrőn leszűrünk és éterrel szuszpendálva mostam. Fehér, porszerű terméket kaptam. A terméket először átkristályosítással tisztítottam; feloldottam 8 ml metanolban, majd hozzáadtam 25 ml dietil-étert míg az oldat a termék kiválása miatt

opálos lett. 3 napon át, -5 °C-n történő kristályosodás után fehér, apró kristályos terméket kaptam. További tisztítás oszlopkromatográfiával történt, Silicagel 60 oszlopon, diklórmetán:metanol = 3:1 elegyével. A termék szerkezet bizonyítását NMR spektroszkópiával végeztem (Brucker AM-360 spekrométer); ¹³C NMR (90 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm) 27.52 (Br-CH₂), 61.21 (C-6), 69.62 (C-5), 73.62 (C-4), 75.52 (C-3), 75.36 (C-2), 77.24 (C-1), 164.93 (-CO-).

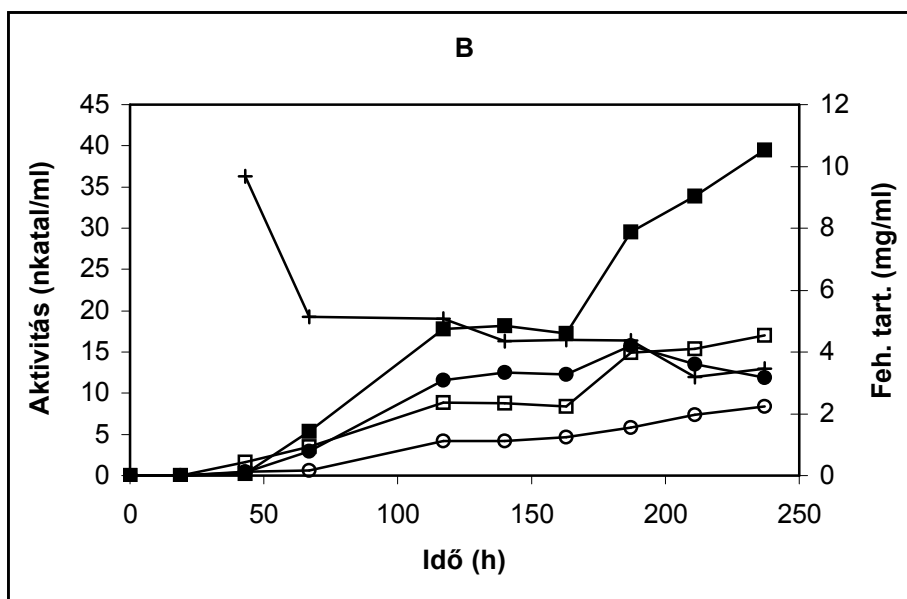
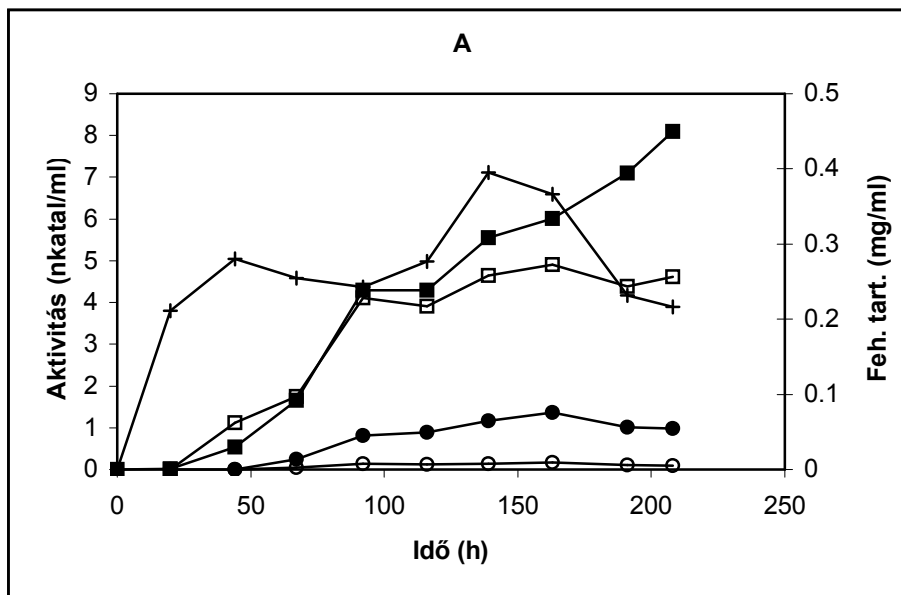
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. Különböző *Aspergillus* fajok β -glükózidáz termelése, az enzimek jellemzése

Az *A. carbonarius* gombáról kevés információ található az irodalomban (Ghareib és Nour el Dein 1994, Kevei és mts-i 1996, Kavitha és Umesh-Kumar 2000, Kiss és Kiss 2000, Joosten és mts-i 2001, Kiss és mts-i 2002), az általa termelt β -glükózidázról pedig egy, heterogenitás vizsgálattal foglalkozó közlemény van (Brumbauer és mts-i 2000). Ezért fontosnak tartottam, hogy a gomba β -glükózidáz termelését összehasonlítsam ismertebb *Aspergillus* fajokéval. Ehhez nagy segítségül szolgált a már említett jó munkakapcsolat a BMGE Vegyészmérnöki Kar, Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszékével, ahol az *Aspergillus niger* és *Aspergillus phoenicis* törzseket vizsgálták (Réczey és mts-i 1998, Brumbauer és mts-i, közlés alatt).

5.1.1. A különböző *Aspergillus* törzsek β -glükózidáz termelésének összehasonlítása

A vizsgálatok során kétféle táptalajon, kétféle C-forrást használva tenyésztettem a gombákat. A folyékony táptalaj glükóz C-forrást, a szilárd táptalaj búzakorpa C-forrást tartalmazott. Míg a folyékony táptalajban volt nitrogén forrás, élesztő kivonat, nyomelemek, a szilárd táptalajban a búzakorpa biztosította az összes szükséges tápanyagot. Ez bevált módszer különböző hidrolitikus enzimek termelésére (Sternberg és mts-i 1977). Egyes szerzők szerint a szilárd fázisú fermentációnak (SSF—solid-state fermentation) ipari szempontból több gyakorlati és gazdasági előnye is van a szélesebb körben elterjedt folyékony fázisú fermentációval szemben. SSF-l az enzimeket koncentráltabb formában lehet termelni, a feldolgozási folyamatok költsége alacsonyabb és a termelt fehérje extrakciójához kevesebb mennyiségű oldószerre van szükség (Lonsane és mts-i 1985, Kumar és Lonsane 1989, Battalino és mts-i 1991).



2. ábra. *Aspergillus carbonarius* –glükózidáz termelése

(A) Folyékony fázisú fermentáció glükóz C-forráson

(B) Szilárd fázisú fermentáció búzakorpa C-forráson

-D-glükózidáz aktivitás (■), -D-galaktozidáz aktivitás (□), -D-xilózidáz aktivitás (●),
-L-arabinozidáz aktivitás (○), fehérje tartalom (+)

Mindegyik *Aspergillus* törzs extracelluláris α -glükózidázt termelt. Az enzim termelés a maximumot a folyékony táptalaj esetén a 9. napon (216 h), a szilárd táptalaj esetén a 10. napon (240 h) érte el. A 2. ábra példaként az *A. carbonarius* extracelluláris α -glükózidáz termelését mutatja az idő függvényében mind folyékony, mind szilárd táptalajon. Mindkét esetben folyamatosan nőtt a α -glükózidáz mennyisége a fermentáció utolsó napig. A folyékony fázisú fermentáció esetén a α -D-glükózidáz mellett "szennyező" glükózidáz enzimeként α -D-galaktozidáz termelés volt megfigyelhető. Ezzel szemben a szilárd fázisú fermentációnál nem csak α -D-galaktozidáz, hanem α -D-xilozidáz és α -L-arabinozidáz is termelődött. A folyékony fázisú fermentáció esetén a α -glükózidáz termelés csak a glükóz teljes felhasználása után indult meg, ez a katabolit represszió jelensége. A fentiek igazak az *A. phoenicis* és *A. niger* fermentációjára és α -glükózidáz termelésére is, azonban itt a glükóz C-forrás esetén a hidroláz aktivitások közül csak a α -glükózidázt lehetett kimutatni.

A három különböző *Aspergillus* törzs extracelluláris α -glükózidáz termelését és a fermentlevek fehérje tartalmát glükóz C-forráson az 1. táblázatban hasonlítottam össze. Az eredmények szerint az *A. phoenicis* bizonyult a legjobb α -glükózidáz termelőnek, a legmagasabb enzim aktivitás (nkatal/ml), hozam (nkatal/g C-forrás) és produktivitás (nkatal/l h) értékekkel, míg a legjobb specifikus aktivitás (nkatal/mg fehérje) értéket az *A. niger* mutatta.

1. táblázat. Különböző *Aspergillus* törzsek extracelluláris α -glükózidáz termelése glükóz C-forráson¹

Törzs	Aktivitás (nkatal/ml)	Fehérje tart. (mg/ml)	Specifikus akt. (nkatal/ mg feh.)	Hozam ² (μ katal/ g C-forrás)	Produktivitás (nkatal/l h)
A. phoenicis	21.5 $\pm$ 2	0.27 $\pm$ 0.057	79 $\pm$ 0.23	2.15	99
<i>A. niger</i>	13 $\pm$ 1.16	0.14 $\pm$ 0.017	93 $\pm$ 0.15	1.3	60
<i>A. carbonarius</i>	8.1 $\pm$ 0.5	0.21 $\pm$ 0.051	38 $\pm$ 0.24	0.8	37

¹Az eredmények a 216 h tenyészetre vonatkoznak.

²A hozam értékének meghatározásánál 1 g glükóz/100 ml fermentlé C-forrással számoltam.

A különböző *Aspergillus* törzsek α -glükózidáz termelését szilárd, búzakorpa C-forrást tartalmazó táptalajon is összehasonlítottam, melynek eredménye a 2. táblázatban látható. Ebben az esetben az aktivitásban, specifikus aktivitásban, hozamban és produktivitásban kifejezett enzim termelés függ az extrakció módjától (az extrakció idejétől, a használt víz

menyiségétől stb.). A szilárd fázisú táptalaj extrahálása után 100 ml nyers fermentlevet kaptam, esetemben ezek az értékek természetesen erre az extrakció utáni állapotra vonatkoznak. Búzakorpa C-forráson az *A. niger* volt a legjobb β -glükózidáz termelő. Az *A. carbonarius* aktivitás, hozam és produktivitás értékei 65 %-a az *A. niger* hasonló értékeinek. A fermentlevek fehérje tartalma 14-20-szor nagyobb, mint a folyékony táptalajnál, ennek oka a magasabb enzimtermelés (α -glükózidáz, α -galakozidáz, α -xilozidáz és α -arabinozidáz) illetve a búzakorpából származó szennyező fehérjék nagy aránya.

2. táblázat. Különböző *Aspergillus* törzsek extracelluláris α -glükózidáz termelése búzakorpa C-forráson¹

Törzs	Aktivitás (nkatal/ml)	Fehérje tart. (mg/ml)	Specifikus akt. (nkatal/ mg feh.)	Hozam ² (μ katal/ g C-forrás)	Produktivitás (nkatal/l h)
<i>A. phoenicis</i>	67 $\pm$ 6.3	3.84 $\pm$ 0.12	17.4 $\pm$ 0.09	0.335	279
<i>A. niger</i>	81.2 $\pm$ 16.2	2.9 $\pm$ 0.009	28 $\pm$ 0.19	0.41	338
<i>A. carbonarius</i>	52.8 $\pm$ 11	3.53 $\pm$ 0.086	14.9 $\pm$ 0.2	0.26	220

¹Az eredmények a 240 h tenyésztetre vonatkoznak.

²A hozam értékének meghatározásánál 20 g búzakorpa/100 ml fermentlé C-forrással számoltam.

Sternberg és mts-i (1977) úgy találták, hogy a különböző *Aspergillus* törzsek enzim termelése hatékonyabb volt rázatott lombikos tenyésztéssel, mint szilárd, korpa táptalajon. Eredményük szerint a α -glükózidáz specifikus aktivitása és hozama nagyobb volt folyékony táptalajon, pl. 1.2 U/mg keményítő C-forráson ellentétben 0.2 U/mg korpa C-forráson. A továbbiakban a kinetikai és a különböző módosításos vizsgálatokhoz a búzakorpás táptalajt használtam a α -glükózidáz termelésére, a magasabb enzimtermelés miatt.

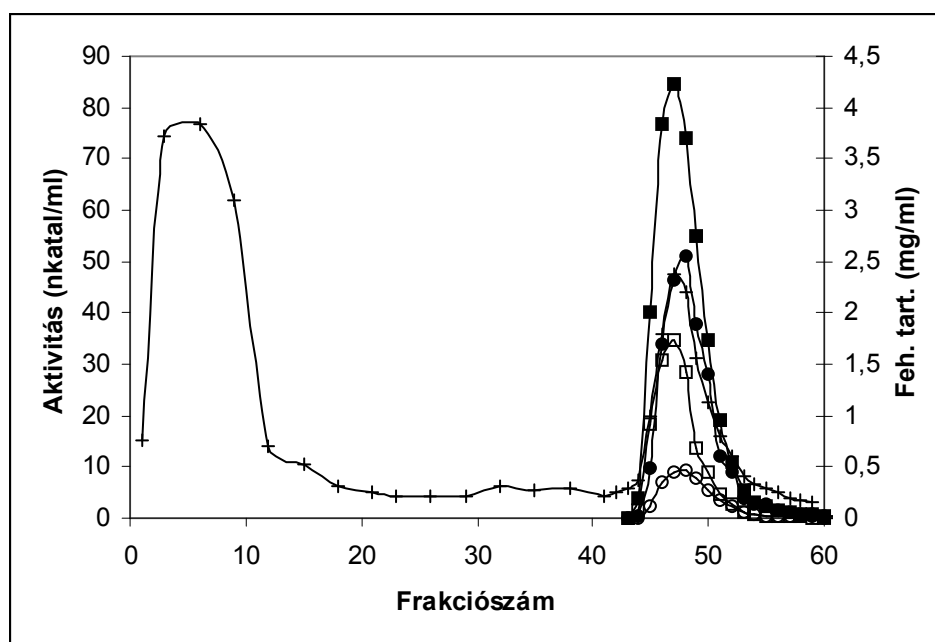
Összességében elmondható, hogy habár az *A. carbonarius* jó α -glükózidáz termelő, az általam vizsgált másik két *Aspergillus* törzs jobb enzimtermelőnek bizonyult. Ennek oka lehet, hogy az *A. phoenicis* és *A. niger* törzsek eleve magas α -glükózidáz termelésű törzsek voltak, míg az *A. carbonarius* α -glükózidáz termelését nem ismertem. Törzsnemesítéssel, fejlesztéssel valószínűleg magasabb hozamot lehetne elérni ezzel a fajjal is. A BMGE Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszékén a glükóz C-forrást tartalmazó táptalajt pedig az *A. phoenicis* és *A. niger* törzsek α -glükózidáz termelésére optimálták.

5.1.2. A különböző *Aspergillus* törzsek által termelt α -glükózidázok tisztítása

A különböző forrásból származó enzimek biokémiai jellemzéséhez és kinetikai vizsgálatához szükség volt arra, hogy az enzimek tiszta formában álljanak rendelkezésemre. Az alábbiakban leírt tisztítási módszert alkalmaztam a későbbiekben is, amikor az *A. carbonarius* α -glükózidázának működési mechanizmus vizsgálatához tiszta enzim oldatra volt szükségem.

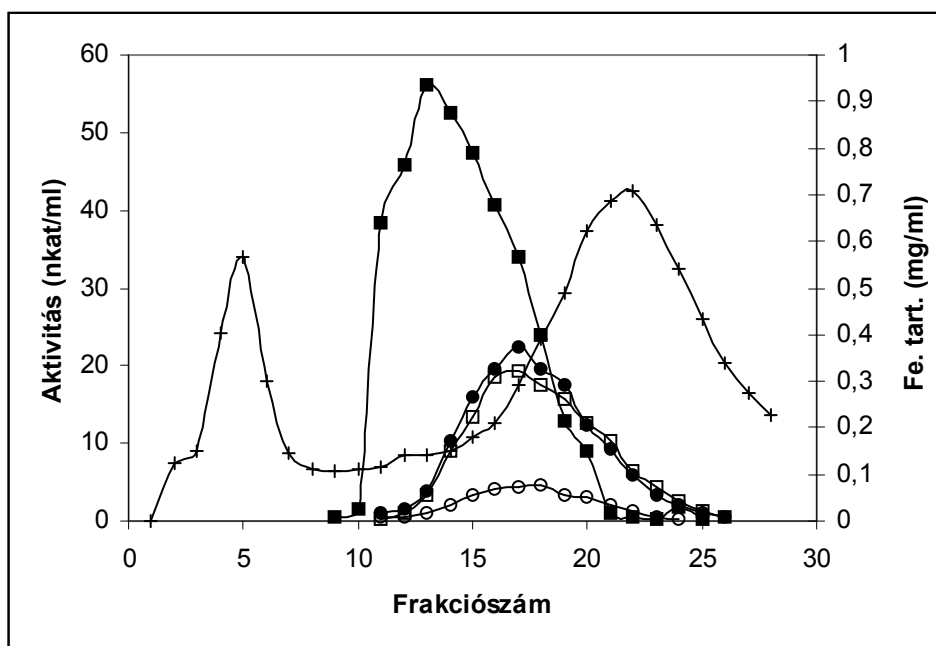
A tisztítási folyamatnál a kiindulási nyers enzim oldat a fermentlevek szűrése után kapott szűrlet volt. A búzakorpás táptalajról kapott szűrlet nagyon sok szennyező fehérjét tartalmazott, elsősorban a korpáról származó fehérjéket, másodsorban egyéb, nagy mennyiségben jelenlévő hidrolitikus enzimeket, melyeknek termelését a táptalaj indukálta. Ezzel szemben a glükóz C-forrásról kapott nyers fermentlé tisztítása sokkal könnyebb volt, mivel kevesebb szennyező hidroláz enzimet tartalmazott. Ettől függetlenül ez a fermentlé is ugyanazon a tisztítási procedúrán esett át. Mindkét fermentlében a fehérjéken kívül más szennyezők is jelen voltak, pl. szénhidrátok, színanyagok stb. Amint az 5.1.1. fejezetben említettem, a hidrolitikus enzimek közül jelentős volt a α -D-galaktozidáz, α -D-xilozidáz és α -L-arabinozidáz aktivitás, melyektől el kellett különíteni a α -D-glükózidáz aktivitást. Az általam alkalmazott tisztítási módszerekkel gyorsan és hatékonyan kaptam meg a folyamat végén a csak α -glükózidázot tartalmazó enzim oldatot. A tisztítás három lépésből állt, hidrofób kölcsönhatás kromatográfiából, méretkizárásos kromatográfiából és kromatofókuszlásból.

A hidrofób kölcsönhatás kromatográfia során az első elúciónál mind a négy hidroláz enzim megkötődött az oszlopon, viszont nagy mennyiségű nem hidrofób tulajdonságú szennyező fehérjétől és a színanyagtól is elválasztottam az enzimeket. A második elúciónál a hidrolitikus enzimek együtt váltak le a gélről (a 3., 4. és 5. ábrákon példaként az *A. carbonarius* α -glükózidázánk tisztítását mutatom be). A puffer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tartalma meghatározó ebben az esetben, ui. a só hozzáadása elősegíti a hidrofób kölcsönhatások kialakulását a fehérje molekulák és a gél ligandumai között. Az $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hatására nő az oldat ionerőssége. Az ionok elvonják a hidratburkot a fehérjék felszínéről, így hozzáférhetővé válnak olyan hidrofób oldalláncok, foltok, amelyek addig rejtve voltak. Ilyenek a fenilcsoportot tartalmazó oldalláncok pl. triptofil, tirozil, fenilalanil. Az enzim felszínén a hidrofób tulajdonságokkal rendelkező oldalláncok nagyobb aránya elősegíti a Phenyl-Sepharose CL-4B gélhez való kötődést.



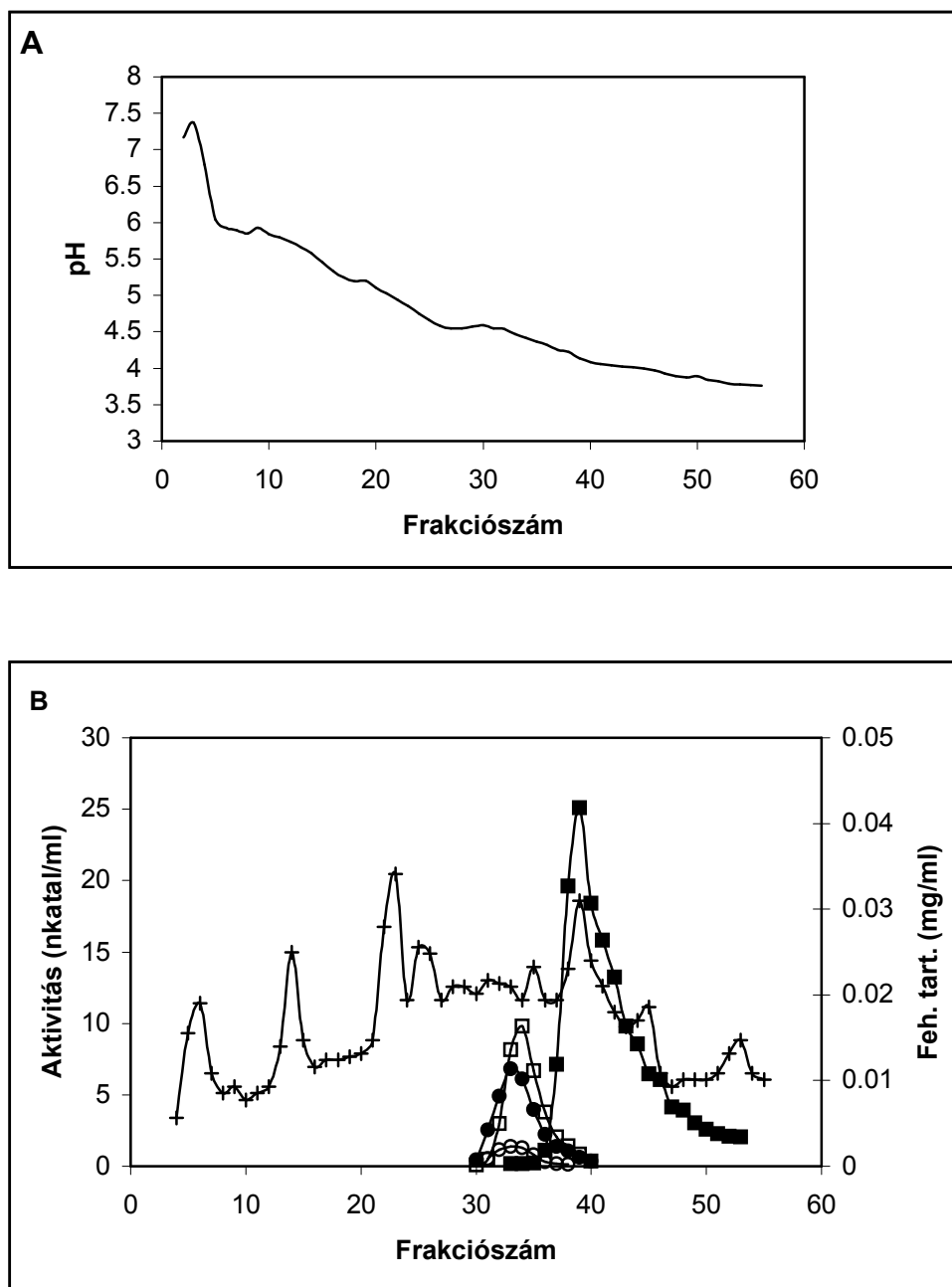
3. ábra. *A. carbonarius* -glükózidázának tisztítása hidrofób kölcsönhatás kromatográfiával
 -D-glükózidáz aktivitás (■), -D-galaktozidáz aktivitás (□), -D-xilozidáz aktivitás (●), -L-arabinozidáz aktivitás (○), fehérje tartalom (+)

A tisztítás következő lépése a méretkizárásos kromatográfia volt. Ennek során még mindig választottam el szennyező fehérjéket is a fenti négy enzimtől, illetve a molekulatömeg különbséget kihasználva a -glükózidázt részlegesen megtisztítottam a másik három aktivitástól (4. ábra).



4. ábra. *A. carbonarius* –glükoszidázának tisztítása méretkizárásos kromatográfiával
 –D-glükoszidáz aktivitás (■), –D-galaktoszidáz aktivitás (□), –D-xiloszidáz aktivitás (●), –L-arabinszidáz aktivitás (○), fehérje tartalom (+)

Végző lépés a kromatofókuszálás volt, melynek segítségével megkaptam a tiszta, csak –glükoszidáz aktivitással rendelkező enzimoldatot. A módszer azért ennyire hatékony, mert a fehérjék izoelektromos pontja alapján választja el a komponenseket, ami jellemző és egyedi érték minden fehérjére. Ebben az elegyben a –glükoszidáz izoelektromos pontja jól elkülönült a többi enzimétől (5. ábra). Ezzel a módszerrel egyúttal meghatároztam a különböző *Aspergillus* törzsek által termelt –glükoszidázok izoelektromos pontját is. Az enzim tisztaságát SDS PAGE-val ellenőriztem.



5. ábra. *A. carbonarius* -glükoszidázának tisztítása kromatofókuszálással

A) pH gradiens(—)

B) β -D-glükoszidáz aktivitás (■), -D-galaktozidáz aktivitás (□), -D-xilozidáz aktivitás (●),
-L-arabinozidáz aktivitás (○), fehérje tartalom (+),

A 3. tisztítási táblázat foglalja össze az *A. carbonarius* által termelt α -glükózidáz teljes tisztítási folyamatát. A tisztítás végére kevés lépésben, nagy hatékonysággal kaptam a tiszta α -glükózidázt.

3. táblázat. *A. carbonarius* α -glükózidázának tisztítási folyamata

Tisztítási lépés	Teljes fehérje tartalom (mg)	Teljes β -glükózidáz aktivitás (μ katal)	Specifikus aktivitás (nkat/mg)	Tisztulás	Hozam (%)
Nyers extraktum	219.2	1.53	7	1	100
Hidrofób krom.	38.57	1.48	38.4	5.5	96
Méretkizárásos kr.	4.2	1.4	333.3	47.6	91.3
Kromatofókuszálás	1.29	0.92	715.4	102.2	60.1

Az egyes tisztítási lépésekben a α -glükózidáz egy csúcsként jelent meg, ami arra utalt, hogy az enzim preparátum nem tartalmaz izoenzimeket. Ezzel szemben érdekes eredmény Brumbauer és mts-i munkája, akik egy speciális technika, a CCD (counter-current distribution, azaz ellenáramú elválasztás) segítségével kimutatták, hogy az *A. carbonarius* legalább három izoenzimet termel. A CCD során a fehérjék elválasztásának alapja, hogy vizes kétfázisú rendszerekben különböző fehérjéknek különböző a megoszlási hányadosuk. A módszer finomságát mutatja, hogy egy 56 lépéses elválasztással két α -glükózidáz izoenzim, míg egy 145 lépéses elválasztással három izoenzim jelenlétét mutatták ki az *A. carbonarius* fermentlevében (Brumbauer és mts-i 2000).

5.1.3. A különböző *Aspergillus* törzsek által termelt α -glükózidázok biokémiai jellemzése és összehasonlítása

A különböző forrásból származó α -glükózidázok biokémiai jellemzése során összehasonlítottam az enzimek izoelektromos pontját, kinetikai tulajdonságait és a hőmérséklet és a pH hatását az enzimműködésre.

Mindegyik törzs extracelluláris α -glükózidázt termelt, amik csak α -D-glükózidáz aktivitással rendelkeztek. Ezt SDS-PAGE vizsgálatok, illetve az bizonyítja, hogy a tisztítás végén olyan enzim oldatot kaptam, aminek csak β -D-glükózidáz aktivitása volt.

Az enzimek izoelektromos pontját kromatofókuszálással határoztam meg. Mindegyik *Aspergillus* törzs által előállított α -glükoszidáz savas karakterű volt, izoelektromos pontjuk pH 3.53-4.2 tartományba esett. Közülük a legkevésbé savas az *A. carbonarius* α -glükoszidáza volt, ezzel együtt is az enzimek nem mutattak jelentős eltérést. Irodalmi adatokkal összhangban vannak ezek az értékek. (4. táblázat).

4. táblázat. A különböző *Aspergillus* törzsek által termelt α -glükoszidázok izoelektromos pontja

Forrás	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. phoenicis</i>
Saját eredmény	4.2	3.72	3.53
Sternberg 1977			4.0
Zeng 1989			3.95
McCleary 1988		4.0	
Watanabe 1992		4.0	
Unno 1993		3.8	

Vizsgáltam a hőmérséklet hatását az enzim aktivitásra és stabilitásra cellobióz és *pNP*-Glc szubsztrátokkal. A hőmérsékletet 20-80 °C között változtattam. Hasonló viselkedést mutattak a különböző törzsek által termelt ill. a különböző táptalajon előállított enzimek. Mindegyik enzim hőmérséklet optimuma 60 °C volt mindkét szubsztráttal mérve. A stabilitás vizsgálatoknál 2 óra inkubálás után az enzimek 50 °C-ig őrizték meg stabilitásukat, 70 °C-n pedig már teljesen inaktiválódtak. Az enzimek aktivitását inkubálás előtt, 50 °C-n, pH 4.0-n határoztam meg, s ezt az értéket tekintettem 100 %-nak. A fehérjék hődenaturációja egy ideig visszafordítható folyamat, ám túllépve ezt az időt az enzimek véglegesen inaktiválódnak, amit a nem kovalens kölcsönhatások, pl. hidrogén kötések megszűnése okoz. A különböző eredetű α -glükoszidázok általunk mért hőmérséklet optimum ill. stabilitás adatai jó egyezést mutatnak az irodalmi adatokkal (5. táblázat).

5. táblázat. A különböző *Aspergillus* törzsek által termelt –glükózidázok hőmérséklet optimuma ill. stabilitása pNP-Glc szubsztráttal

Forrás	<i>A. carbonarius</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. phoenicis</i>	
	optimum °C	stabilitás °C	optimum °C	stabilitás °C	optimum °C	stabilitás °C
Saját eredmény	60	50-ig	60	50-ig	60	50-ig
Watanabe 1992			55	55-ig		
Galas 1997			65			
Sternberg 1977					70-75	
Zeng 1989					60	55-ig

A pH enzim aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálatakor megállapítottam, hogy pNP-Glc szubsztráttal mindhárom *Aspergillus* törzs által termelt –glükózidáz pH optimuma a pH 4.5-5.0 tartományba esett. Mindegyik –glükózidáz teljesen elvesztette aktivitását 7.5 pH-n. Cellobióz szubsztráttal a pH optimum mindhárom forrásból származó enzimnél pH 4.0-4.5 volt, mind glükóz, mind búzakorpa táptalajról. Az enzimek pH stabilitását is pH 2.5-8.0 tartományban vizsgáltam, s az enzimek származására való tekintet nélkül stabilnak bizonyultak pH 4.0 és 8.0 között. Az irodalmi adatokat jól megerősítik eredményeim, az *A. carbonarius* –glükózidázáról nincs hasonló irodalmi adat (6. táblázat).

6. táblázat. A különböző *Aspergillus* törzsek által termelt –glükózidázok pH optimuma ill. stabilitása pNP-Glc szubsztráttal

Forrás	<i>A. carbonarius</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. phoenicis</i>	
	optimum	stabilitás	optimum	stabilitás	optimum	stabilitás
Saját eredmény	5.0	4.0-8.0	4.5-5.0	4.0-8.0	5.0	4.0-8.0
Watanabe 1992			4.5	4.5-7.0		
McClearly 1988			4.0	2.5-9.0		
Sternberg 1977					4.0	2.5-9.0
Zeng 1989					5.0	4.0-7.5

A kinetikai vizsgálatok során a tisztított α -glükozidázok jellemző kinetikai paramétereit határoztam meg *p*NP-Glc és cellobióz szubsztrátokkal. A kinetikai görbék nem lineáris illesztését a GraFit programmal végeztem. *p*NP-Glc szubsztrát esetén a különböző eredetű enzimek K_m értékei között nem volt jelentős eltérés (7. táblázat). Az egyes *Aspergillus* törzseknél, a kétféle C-forráson termelt α -glükozidázok K_m értékei szintén hasonló értékeket mutattak. A legalacsonyabb V_{max} értéket az *A. carbonarius* α -glükozidáza mutatta, ennél fogva a legalacsonyabb V_{max}/K_m értékkel is ez rendelkezett. A leggyorsabban és leghatékonyabban pedig az *A. niger* által termelt enzim hidrolizálta a *p*NP-Glc szubsztrátot (legmagasabb V_{max} és V_{max}/K_m értékek).

7. táblázat. A különböző *Aspergillus* törzsek által termelt α -glükozidázok *p*NP-Glc szubsztrátra vonatkozó kinetikai paramétere

Törzs	K_m (mM)	V_{max} (mkatal/kg)	V_{max}/K_m (katal/kg·M)
<i>A. carbonarius</i> ^a	0.63 ± 0.058	167 ± 2	265 ± 0.09
<i>A. niger</i> ^a	0.74 ± 0.032	430 ± 11	581 ± 0.05
<i>A. phoenicis</i> ^a	0.65 ± 0.055	236 ± 7	364 ± 0.09
<i>A. carbonarius</i> ^b	0.67 ± 0.008	224 ± 2	335 ± 0.013
<i>A. niger</i> ^b	0.48 ± 0.025	372 ± 4	775 ± 0.053
<i>A. phoenicis</i> ^b	0.58 ± 0.034	267 ± 2	461 ± 0.06

^a 1% (w/v) glükóz C-forrás; ^b 20 % (w/v) búzakorpa C-forrás

Cellobióz szubsztrát alkalmazásakor a K_m értékek 3.4–6.2-szer nagyobbak voltak, mint a *p*NP-Glc szubsztrát esetén (8. táblázat), s az adatok nem mutattak számottevő eltérést a különböző *Aspergillus* fajok által a kétféle táptalajon termelt enzimek kinetikai tulajdonságai között. A V_{max} értékek átlagosan 1.5-ször voltak magasabbak, mint a *p*NP-Glc szubsztrát hasításakor. A legmagasabb V_{max} értéket az *A. niger* érte el mind a glükóz, mind a búzakorpa C-forráson termelt α -glükozidázzal. Cellobióz szubsztrát esetén a V_{max}/K_m adatok 24-65 %-ai voltak a *p*NP-Glc szubsztrátra mért értékeknek. Az *A. niger* és *A. phoenicis* által termelt enzimek azonos hatékonysággal hidrolizálták a cellobiózt, míg az *A. carbonarius* α -glükozidáza bizonyult a legkevesbé hatékonynak. A két szubsztrátnál jelentős eltérést mutattak az enzimek mind affinitásban, mind hatékonyságban; a *p*NP-Glc felé nagyobb

affinitással rendelkeztek, és hatékonyabban is hidrolizálták. Ez azt jelzi, hogy a *p*-nitro-fenil aglikon sokkal jobb távozó csoport. Az a tény, hogy az enzimek nem mutattak más *p*-nitrofenil-glikozid szubsztrátok irányában aktivitást, mutatja, hogy a cukorgyűrű hidroxil csoportjainak térállása nagyon fontos az enzimek működése szempontjából; az általam vizsgált enzimek szűk szubsztrát specifitásúak.

8. táblázat. A különböző *Aspergillus* törzsek által termelt α -glükozidázok cellobióz szubsztrátra vonatkozó kinetikai paraméterei

Törzs	K_m (mM)	V_{max} (mkatal/kg)	V_{max}/K_m (katal/kg·M)
<i>A. carbonarius</i> ^a	3.71 ± 0.41	256 ± 4	69 ± 0.11
<i>A. niger</i> ^a	2.82 ± 0.47	647 ± 25	229 ± 0.17
<i>A. phoenicis</i> ^a	1.92 ± 0.12	455 ± 11	237 ± 0.07
<i>A. carbonarius</i> ^b	2.99 ± 0.092	243 ± 5	81 ± 0.02
<i>A. niger</i> ^b	2.97 ± 0.22	595 ± 16	200 ± 0.08
<i>A. phoenicis</i> ^b	2.0 ± 0.13	404 ± 12	202 ± 0.07

^a 1% (w/v) glükóz C-forrás; ^b 20 % (w/v) búzakorpa C-forrás

Az *A. niger* által termelt α -glükozidáz esetén a *p*NP-Glc szubsztrátra kapott K_m értékek jó egyezést mutatnak az irodalmi adatokkal (Dekker 1986, McClearly és Harrington 1988, Watanabe és mts-i 1992, Galas és Romanowska 1997, Rashid és Siddiqui 1997). Nagyobb eltérést mutatnak a cellobióz szubsztrát esetén mért K_m adatok, hiszen a Dekker (1986) által mért K_m értéknek ($K_m=5.63$ mM) a fele, míg a Galas és Romanowska (1997) szerinti értéknek ($K_m=1.5$ mM) csaknem a kétszerese a mi K_m adatunk. Az *A. phoenicis*-nél a cellobiózra mért K_m sokkal magasabb, mint a Zeng és Zhang (1989) által közölt érték ($K_m=0.75$ mM). Az *A. carbonarius* α -glükozidázára nincs ilyen irodalmi adat.

Az *A. carbonarius* által termelt α -glükozidáz molekula tömege SDS-PAGE-l meghatározva 108 kDa volt.

5.2. Az *Aspergillus carbonarius* által termelt α -glükózidáz működési mechanizmusának vizsgálata

Mint a célkitűzésekben említettem, dolgozatom másik nagy fejezete és egyben fő része az *A. carbonarius* által termelt α -D-glükózidáz működési mechanizmusának vizsgálata. Kísérleteimhez minden esetben a 4.3. fejezetben leírtak szerint előállított és a 4.7. fejezet szerint tisztított enzim oldatot használtam.

5.2.1. Inhibíciós vizsgálatok

A különböző tulajdonságú inhibitor vegyületekkel végzett inhibíciós kinetikai vizsgálatok az enzim szubsztrátkötő helyének feltérképezésére szolgálnak. A szubsztrát specifitás vizsgálatok során kiderült, hogy az általam vizsgált *A. carbonarius* α -glükózidáz szűk szubsztrát specifitású enzim, azaz csak α -glükózidos kötést hidrolizál (3.1.3. fejezet). Ez a tény már elmond egy nagyon fontos információt a kötőhelyről; a szubsztrát piranozid gyűrűjén található hidroxil csoportok térállása abszolút, bármilyen eltérés valószínűleg essenziális hidrogén kötések kialakulását gátolja meg.

Ugyancsak a szubsztrát glikon részével való kölcsönhatásról adnak felvilágosítást a glükózzal és a glükonsav(1-5)laktonnal elvégzett inhibíciós kísérletek. Mindkét inhibitor kompetitív módon gátolta az enzim működését. A glükóz hatékony gátlószernek bizonyult ($K_i=8.5$ mM), ami szokatlan a tanszéken eddig vizsgált α -glükózidázok sorában. A korábban tanulmányozott α -glükózidázok pl. sertés vese α -glükózidáz (Pócsi és Kiss 1988), fehér here α -glükózidáz (Pócsi és mts-i 1989), manióka α -glükózidáz (Keresztessy és mts-i 1994a) széles szubsztrát specifitású enzimek voltak, melyek működésére a glükóz nem fejtett ki gátló hatást. Ezzel szemben az *A. carbonarius* α -glükózidáza szűk szubsztrát specifitású és a glükóz jó inhibíciós hatása arra utal, hogy az aktív centrumnak a cukorrésszel kialakuló kölcsönhatása ugyanolyan fontos, mint a hidrofób aglikonnal létrejövő kölcsönhatás (ld. később). A széles szubsztrát specifitású enzimek esetén pedig a hidrofób aglikonnal kialakuló kölcsönhatás a domináns. Az aldonsav(1-5)laktonok a glikozidázok nagyon specifikus, ún. átmeneti állapot analóg inhibitorai, igen hasznos vegyületek a szubsztrát kötés és hasítás tanulmányozásánál (Leaback 1968). A glükonsav(1-5)lakton igen erős gátlószernek bizonyult ($K_i=24$ μ M), két nagyságrenddel jobbnak, mint akár a glükóz, akár egy tio-glükozid (ld. később). Ez bizonyítékul szolgál arra, hogy az *A. carbonarius* α -glükózidáz a Koshland által leírt, s a dolgozat elején ismertetett glikozidázok általános működési mechanizmusa szerint működik. A glükonsav(1-5)lakton ugyanis félszék konformációjú vegyület, s mint a Koshland féle

működési modellből tudjuk, a glikozidázoknál az átmeneti állapotban a szubsztrát félszék konformációt vesz fel.

Az 1-tio-glükózid típusú szubsztrát analóg inhibitorok (*p*-nitrofenil-1-tio és *p*-aminofenil-1-tio β -D-glükózidok, *p*NTP-Glc, *p*ATP-Glc) alkalmazásával információt kaphatunk az aglikon kötőhely tulajdonságairól is. Mindkét inhibitor kompetitív módon gátolta az enzimet. A *p*NTP-Glc jobb inhibitornak bizonyult ($K_i=2$ mM) a *p*ATP-Glc-nál ($K_i=50$ mM). Ez az eredmény az aglikon kötőhely hidrofób jellegét mutatja, mert a hidrofíl amino csoport szubsztituens jelenléte 25-ször gyengébb kötődést okoz. Ezek az eredmények hasonlóak a tanszéken korábban vizsgált széles szubsztrát specifitású manióka -glükózidáz (Keresztessy és mts-i 1994a) és sertésvese -glükózidáz (Pócsi és Kiss 1988) esetén kapott eredményekhez .

5.2.2. A kinetikai paraméterek pH függésének vizsgálata

A működési mechanizmus vizsgálatoknál alapvető az enzim kinetikai tulajdonságainak tanulmányozása. A kinetikai paraméterek (K_m , V_{max}) meghatározásáról az előző fejezetben szóltam, emellett vizsgáltam a kinetikai paraméterek pH függését.

A kinetikai konstansok pH függésének tanulmányozásának jelentősége, hogy azokból következtetni lehet az enzim működésében, azaz az enzim-szubsztrát komplex kialakulásában és a szubsztrát hidrolízisében részt vevő, ionizálható katalitikus csoportokra. A V_{max} pH függése felvilágosítást ad a szubsztrát hidrolízisében részt vevő aminosav oldalláncokról, a V_{max}/K_m pH függése az enzim hatékonyságára, az ES komplex kialakulására utal.

Vizsgálataim során meghatároztam a *p*NP-Glc szubsztrátra vonatkozó kinetikai paramétereket különböző pH értékeken (pH 2.5-6.5), az eredményeket a 6. és 7. ábrák mutatják be. A kapott kísérleti pontok jól illeszkedtek az elméleti görbékre, melyeket nem lineáris illesztéssel, GraFit illesztőprogram segítségével adtam meg, az (1) és (2) egyenletek alapján (Tipton és Dixon 1979, Cornish-Bowden 1979):

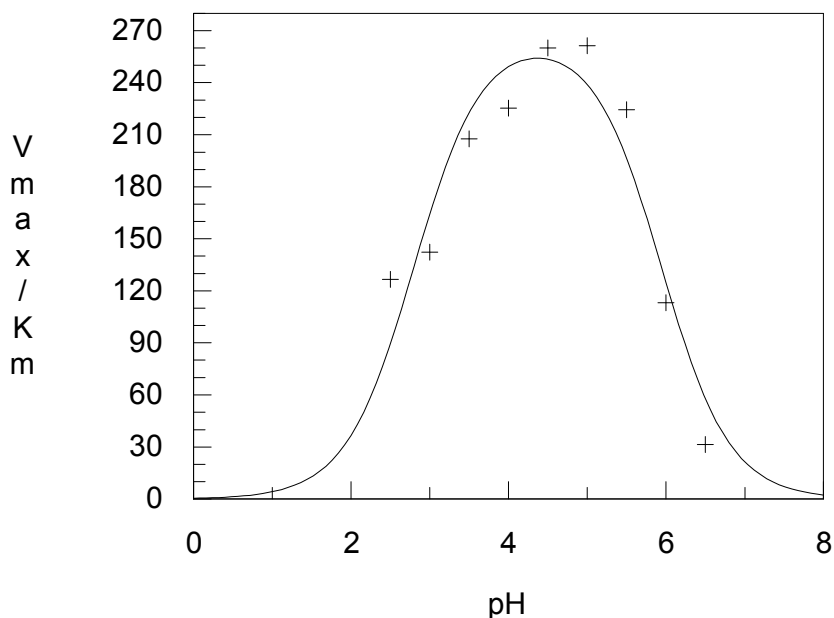
$$V_{max} = \frac{\tilde{V}_{max}}{1 + ([H^+]/K_{ES1}) + (K_{ES2}/[H^+])} \quad (1)$$

$$V_{max} / K_m = \frac{\tilde{V}_{max} / \tilde{K}_m}{1 + ([H^+]/K_{E1}) + (K_{E2}/[H^+])} \quad (2)$$

ahol $\tilde{V}_{\max}$ és $\tilde{V}_{\max} / \tilde{K}_m$ a pH-tól független kinetikai paraméterek, K_{E1} és K_{E2} a katalízisben részt vevő aminosav oldalláncok savi disszociációs állandói a szabad enzimből, K_{ES1} és K_{ES2} pedig az enzim-szubsztrát komplexben.

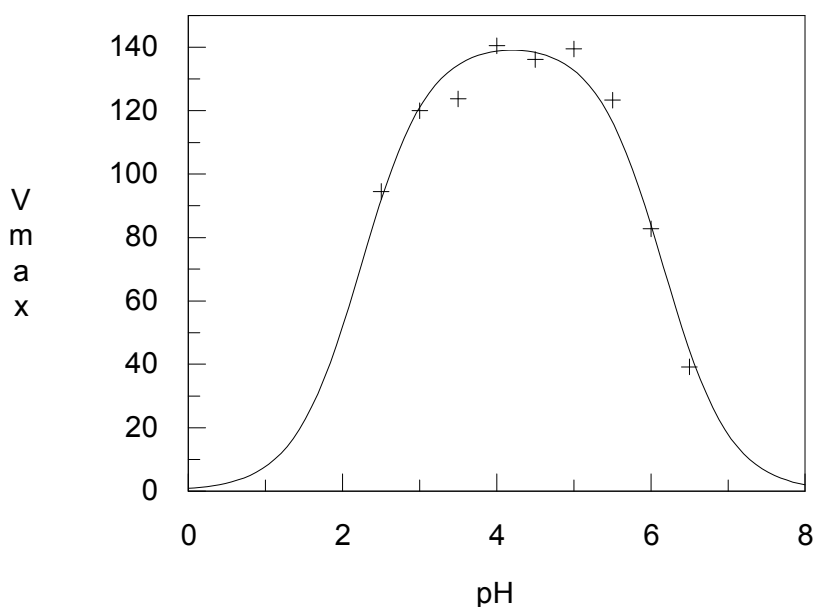
A kísérleti pontok jó illeszkedése az 1. és 2. egyenletek alapján illesztett elméleti görbékre arra utal, hogy a szubsztrát hidrolízisében két ionizálható aminosav oldallánc vesz részt. Azaz, az enzim működésére érvényes a Peller-Alberty féle diprotikus enzim modell, mely szerint a katalízis során a két ionizálható csoport közül az egyik ionizált, a másik protonált (Peller és Alberty 1959, Cornish-Bowden 1979).

A 6. ábrán ábrázoltam a $V_{\max}/K_m$ pH függését, mely az enzim hatékonyságára utal. A legjobb illesztést abban az esetben kaptam, amikor $pK_{E1}=2.8$ illetve $pK_{E2}=5.93$ értékeket használtam. Ezek az értékek, összevetve irodalmi adatokkal és aminosav oldalláncok disszociációs állandóival, arra engednek következtetni, hogy egy ionizált karboxilát csoport mellett egy protonált karboxil csoport vagy egy hisztidin oldallánc vesz részt az ES komplex kialakításában. Az említett ionizált karboxilát igen alacsony pK értéke ($pK_{E1}=2.8$) szerint ez egy erősen savas jellegű csoport.



6. ábra A $V_{\max}/K_m$ pH függése ($V_{\max}/K_m$: katal/kg·M)

A $V_{\max}$ pH függésénél a legjobb illesztést a $pK_{ES1}=2.24$ és a $pK_{ES2}=6.14$ értékekkel értük el (7. ábra). A $V_{\max}$ pH függéséből a szubsztrát hidrolízisében részt vevő aminosav oldalláncokra lehet következtetni, s az eredmények szerint ezek a csoportok hasonlóak a $V_{\max}/K_m$ pH függésénél megállapított csoportokhoz. Ha feltételezzük, hogy mind a szabad enzimben, mind az enzim-szubsztrát komplexben ugyanazok a katalitikus csoportok játszottak szerepet a pH függés vizsgálatánál, összehasonlítva a pK értékeket megállapíthatjuk, hogy az enzim-szubsztrát komplexben változott az oldalláncok pK értéke. Nevezetesen, a szubsztrát kötődése révén az anionos csoport, aminek a deprotonált állapota szükséges a katalízishez és ami a nukleofil támadást intézi a szubsztrát cukor részének C-1 atomja ellen, savi disszociációs konstansa jelentősen csökkent ($pK_{ES1}-pK_{EI} = -0.56$), míg a protonált csoporté kisebb mértékben nőtt ($pK_{ES2}-pK_{E2} = 0.21$), azaz a disszociált csoport még disszociáltabb lesz a protonált oldallánc pedig gyengébben savassá válik, ami a katalízis szempontjából kedvező.



7. ábra A $V_{\max}$ pH függése ($V_{\max}$: katal/kg)

A $V_{\max}$ és a $V_{\max}/K_m$ a legnagyobb értékeket a pH optimumon veszik fel, haladva a savasabb pH tartomány felé, a protonált aminosav oldalláncok számának növekedésével csökken az értékük. Ugyanígy a lúgos pH tartományban, ahogy a deprotonált csoportok kerülnek túlsúlyba, szintén csökken mindkét érték. Mindebből szintén arra lehet következtetni, hogy az enzim-szubsztrát komplex kialakulásához és a szubsztrát hidrolíziséhez is egy protonált és egy deprotonált aminosav oldallánc szükséges.

A K_m pH függés vizsgálatának eredménye szerint a K_m a pH optimumon (pH 4.5 -5.0) volt a legkisebb, azaz az enzim-szubsztrát komplex ezen a pH-n a legstabilabb.

Az irodalomban számos esetben hasonló eredményekről számoltak be glükózidázokra vonatkozóan, pl. manióka -glükózidáz (Keresztessy és mts-i 1994a), árpa -glükózidáz (Skoubas és Georgatsos 1997), *Schizophyllum commune* -glükózidáz (Clarke 1990), édes mandula β -glükózidáz (Dale és mts-i 1986) esetén. Régebben a kinetikai paraméterek pH függéséből kapott pK_A értékek alapján szintén egy karboxil és egy hisztidin/bázikus karboxil oldallánc részvételét javasolták az enzimek katalitikus működésében. További vizsgálatok azonban nem igazolták hisztidin oldalláncok közvetlen részvételét a katalízisben, viszont megerősítették két karboxil csoport szerepét (Clarke és mts-i 1993).

5.2.3. Karboxil oldalláncok kémiai módosítása

A kinetikai paraméterek pH függésének vizsgálata c. fejezetben említettem, hogy a katalízisben részt vevő ionizálható csoportok nagy valószínűséggel karboxil csoportok (glutaminsav vagy aszparaginsav oldalláncok karboxil csoportjai), esetleg hisztidin oldallánc. Ezt bizonyítandó, ezeket az oldalláncokat karboxil csoportra specifikus reagensekkel módosítottam. Ehhez nukleofil glicin-metil-észter jelenlétében vízzeloldható karbodiimidet (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid — EDAC) illetve Woodward K reagenst (N-etil-5-fenilizoxazólium-3-szulfonát — WRK) alkalmaztam (Lundblad és Noyes 1985, Keresztessy és mts-i 1994a). A hisztidin oldallánc szerepének tanulmányozására dietil pirokarbonátot (DEP) használtam.

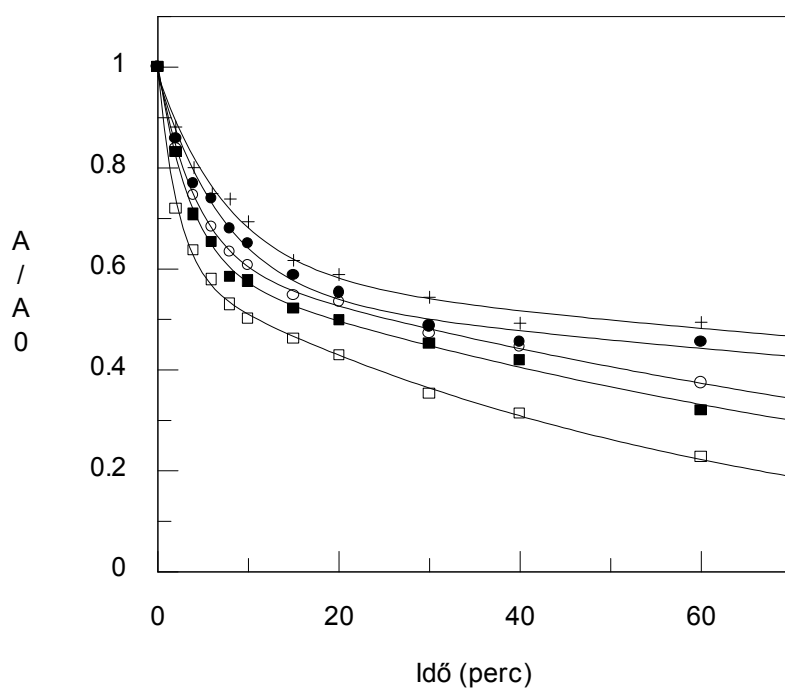
A DEP hatására az enzim inaktíválódott, 50 °C-n 75 mM reagens koncentrációt alkalmazva az aktivitás a kiindulási érték 27%-ára csökkent. Az eredmények szerint azonban az inaktíválás irreverzibilis volt, hiszen hozzáadott hidroxilamin hatására nem nőtt (nem tért vissza) a módosított enzim aktivitása. Ilyen módon a hisztidin oldalláncok katalitikus szerepéről nem lehet következtetést levonni, ill. valószínűsíthető, hogy nincs közvetlen szerepük a szubsztrát hasításában.

A glicin-metil-észter jelenlétében alkalmazott EDAC inaktíválta az enzimet. Az EDAC koncentrációját 7-40 mM között változtattam, s az EDAC koncentrációjától függően 50-80 %-s aktivitás csökkenést figyeltem meg. Az inaktíválási reakciót 60 percig végeztem szobahőmérsékleten, 4.75 pH-n. Az inaktívált enzim relatív aktivitását (A/A_0 , 3. egyenlet) ábrázolva az idő függvényében kétfázisú görbét kaptam, amely komplex kinetikát jelez, s amely két elsőrendű folyamatra bontható (8. ábra). Az első 8 percben gyors aktivitás

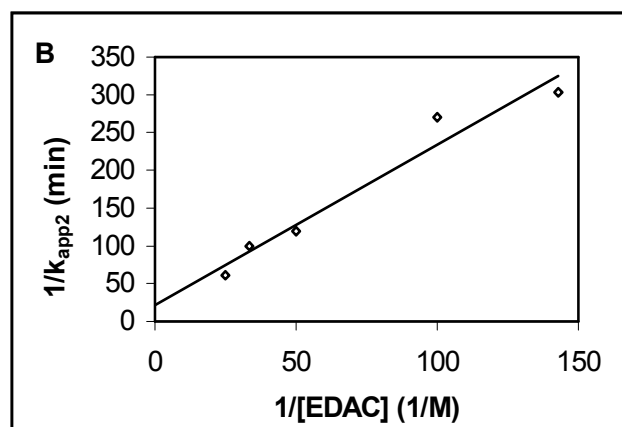
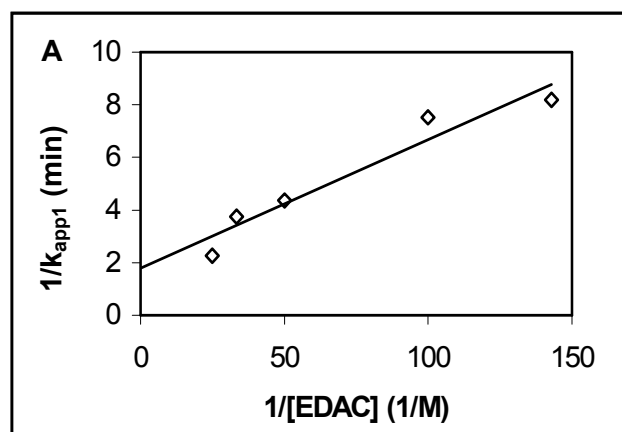
csökkenés figyelhető meg. Az inaktiválódás jelentős része (70-50 %) gyakorlatilag ekkor ment végbe, ezt a k_{app1} pszeudo-elsőrendű sebességi konstans jellemzi. A második szakaszban kisebb volt az inaktiváció sebessége, 50 perc alatt már csak 20-30 %-l csökkent az aktivitás. Ennek a szakasznak a kinetikájáról a k_{app2} pszeudo-elsőrendű sebességi konstans ad felvilágosítást. A karbodiimides módosítás nem specifikus a katalitikus karboxil csoportokra, ezért lehet a módosítás kétfázisú. Az inaktiváció első szakaszában valószínűleg katalitikus karboxil csoportok módosultak –ezért volt gyorsabb az aktivitás csökkenés–, míg a lassabb szakaszban olyan karboxil csoportok, melyek az enzim felületén hozzáférhetőek a reagens számára és jelenlétük szükséges az enzim működéséhez pl. az enzim szerkezetének fenntartásában játszanak szerepet, de nincs katalitikus szerepük. A kísérleti pontok jól illeszkednek a 3. egyenletből kapható elméleti görbével (Ray és Koshland 1961):

$$A/A_0 = (1 - F_1)e^{-(k_1 + k_2)t} + (F_1)e^{-k_2t} \quad (3)$$

ahol A_0 a kezeltlen enzim aktivitása, A/A_0 az inaktivált enzim relatív aktivitása, F_1 konstans, t az idő. A pszeudo-elsőrendű sebességi konstansokat (k_{app1} és k_{app2}) Ray és Koshland (1961) módszerével határoztam meg a fenti egyenlet alapján, GraFit program segítségével; 40 mM EDAC koncentrációnál $k_{app1}=0.44 \text{ perc}^{-1}$, $k_{app2}=0.0164 \text{ perc}^{-1}$. A különböző reagens koncentrációkhoz tartozó k_{app1} és k_{app2} látszólagos sebességi konstansok reciprokát ábrázolva az EDAC koncentráció reciprokának függvényében, a kapott egyenesek y tengely metszete jelenti a valódi sebességi konstansok reciprokát; $k_1=0.56 \text{ perc}^{-1} \text{ M}^{-1}$, $k_2=0.046 \text{ perc}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (9. ábra).



8. ábra. -glükózidáz inaktiválása a karboxil csoportra szelektív EDAC-I.
 0.5 mM glicin-metil-észter jelenlétében kezeltem az enzimet 7 mM (+), 10 mM (●), 20 mM (○), 30 mM (■) és 40 mM (□) EDAC-I. A jelzett időpontokban mintát vettem és meghatároztam a maradék aktivitást. Az elméleti görbéket a (3) egyenlet alapján illesztettem.

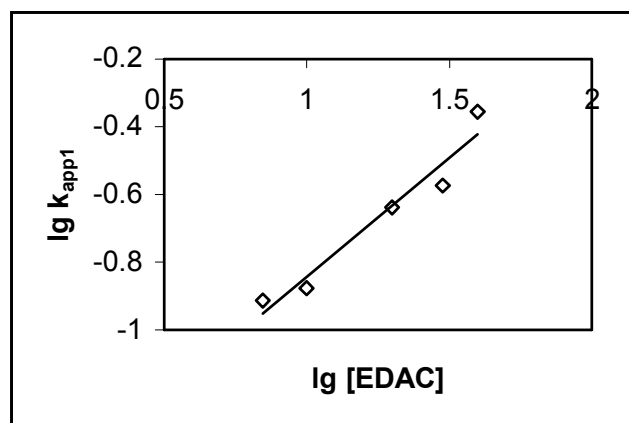


9. ábra. A látszólagos sebességi konstansok reciprocai az EDAC koncentráció reciprokának függvényében.

A) $1/k_{app1} - 1/[EDAC]$

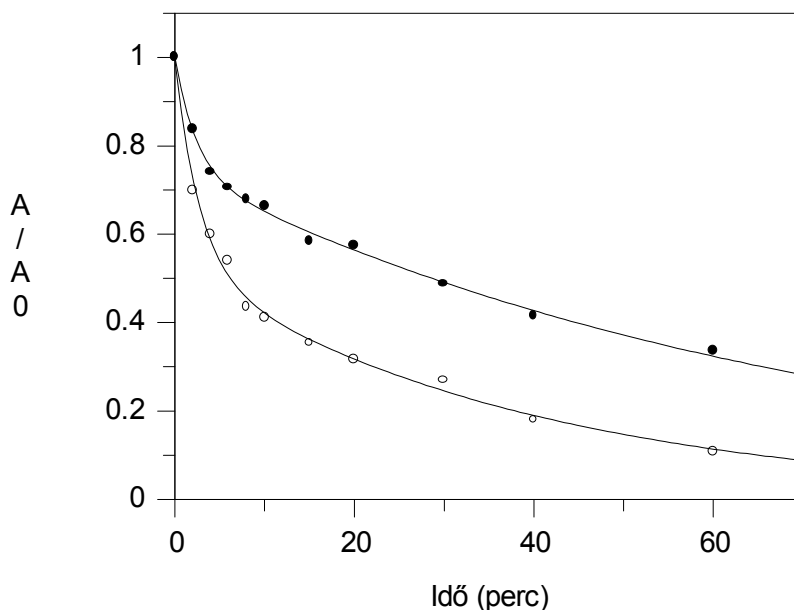
B) $1/k_{app2} - 1/[EDAC]$

A sebességi állandók segítségével a reakció rendűségére is lehet következtetni. A $\lg k_{app1}$ - $\lg$ EDAC koncentráció ábrán az egyenes meredeksége 0.703, ami elég közel áll az 1 értékhez ahhoz, hogy megegyezzen a reakció rendűségével, azaz a módosítás során 1 molekula EDAC 1 enzim molekulával reagál (10. ábra) (Levy és mts-i 1963, Cornish-Bowden 1979). A specifikus reagenssel történő módosítás eredményei arra utalnak, hogy az *A. carbonarius* –glükózidázában valóban van egy, az enzim működéshez szükséges karboxil oldallánc.



10. ábra. Az inaktiváció gyors szakaszát jellemző látszólagos sebességi állandó logaritmusának függése az inaktivátor koncentráció logaritmusától.

Annak az eldöntésére, hogy ez az EDAC által módosított karboxil oldallánc valóban az aktív centrumban található-e, az enzim egyik kompetitív inhibitorát, a *p*-nitro-tiofenil –D-glükopiranozidot (*p*NTP-Glc) használtam. A vizsgálatok során mértem az inaktiválás sebességét az inhibitor jelenlétében ($10 \text{ mM} = 5 K_i$) és hiányában (11. ábra). Az ábrán látható, hogy a *p*NTP-Glc jelenlétében csökken az inaktiválás sebessége, az inhibitor alkalmazásának eredményeképpen a k_{app1} sebességi állandó 54 %-l csökkent. A *p*NTP-Glc kötődése tehát védelmet nyújtott az EDAC inaktiváló hatásával szemben, ami bizonyíték arra, hogy az EDAC által módosított katalitikus csoport az enzim aktív centrumában található.



11. ábra A kompetitív inhibitor "védő" hatása az EDAC inaktíváló hatásával szemben. A - glükózidázt 30 mM EDAC-l kezeltem, 10 mM *p*NTP-Glc, mint kompetitív inhibitor jelenlétében (●) ill. hiányában (○).

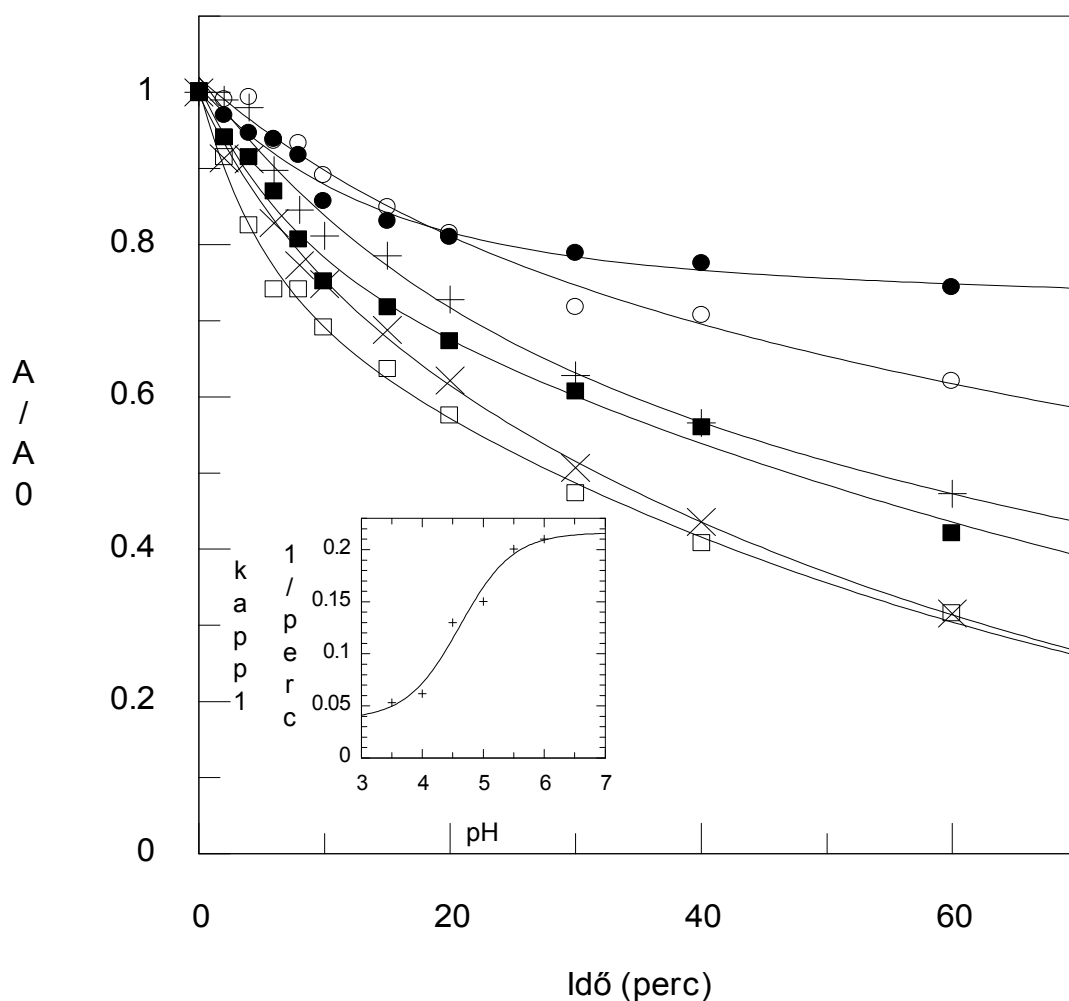
A módosítási reakció pH függésének tanulmányozása felvilágosítást ad a az EDAC-l reagáló oldallánc jellegéről. A pH függés vizsgálatok során meghatároztam a karbodiimides módosítás sebességét különböző pH értékeken (12. ábra), kiszámoltam az egyes pH értékekhez tartozó látszólagos sebességi állandókat (k_{app1}) a fent leírt módon, majd ábrázoltam ezeket a pH függvényében (12. ábra, beszúrt ábra). Az elméleti görbe ábrázolásánál feltételeztük, hogy a módosítási reakció egyetlen irreverzibilis lépésben megy végbe az alábbiak szerint (4. egyenlet):



A 12. beszúrt ábrán látható elméleti görbével a kísérleti úton meghatározott k_{app1} látszólagos sebességi állandókat ábrázoltam a pH függvényében, a mért pontsorra az elméleti görbét az (5) egyenlet alapján (Tipton és Dixon 1979) illesztettem GraFit program segítségével:

$$k_{app} = \frac{\tilde{k}_{app} x}{1 + [H^+] / K_A} \quad (5)$$

ahol x a reagens (EDAC) koncentrációja, K_A pedig az EDAC által módosított, katalitikus aktivitással rendelkező csoport savi disszociációs állandója.



12. ábra. α -glükoszidáz inaktiválása EDAC-l különböző pH értékeken, pH 3.5 (●), pH 4.0 (○), pH 4.5 (+), pH 5.0 (■), pH 5.5 (□), pH 6.0 (x).

Beszúrt ábra: az inaktiválás gyors szakasza látszólagos sebességi állandójának pH függése.

A legjobb görbe illeszkedést a $K_A = 2.45 \times 10^{-5}$ értéknél kaptuk, azaz a $pK_A = 4.61$. Az inaktiválás a legnagyobb sebességgel a pH optimum környékén ment végbe. Ezen a pH-n csak a katalitikus nukleofil deprotonált (a protonáló oldallánc protonált), így a reagens a nukleofilt módosítja. Alacsonyabb pH-n csökken a módosítás sebessége, magasabb pH-n

pedig a látszólagos sebesség nő, az inaktiválás aspecifikus, hiszen egyre több karboxil csoport lesz deprotonált. A fenti tények alapján feltételezhető, hogy az EDAC a katalitikus nukleofilt módosította, ami egy Glu vagy egy Asp karboxil oldallánca.

Rashid és Siddiqui (1998) *Aspergillus niger* –glükózidázának karboxil csoportjait módosították EDAC-l glicinamid (GAM) illetve etiléndiamindihidroklorid (EDAM), mint nukleofil jelenlétében. Céljuk az enzim hőstabilitásának növelése volt. Azt találták, hogy alacsonyabb hőmérsékleten (55 és 60 °C) az enzim hőstabilitása csökkent, míg magasabb hőmérsékleten (67 és 70 °C) nőtt a kezelés hatására (az EDAM hatására jobban nőtt). Magyarázatuk szerint magasabb hőmérsékleten konformációs változások következnek be az enzim szerkezetében. A nukleofil reagensek a negatív töltések eliminációjával (a GAM semlegesítette a karboxil csoportok negatív töltését, az EDAM pedig még pozitívvá is változtatta azt) a módosított enzim konformációját változtatták olyan módon, amely növeli az enzim termostabilitását.

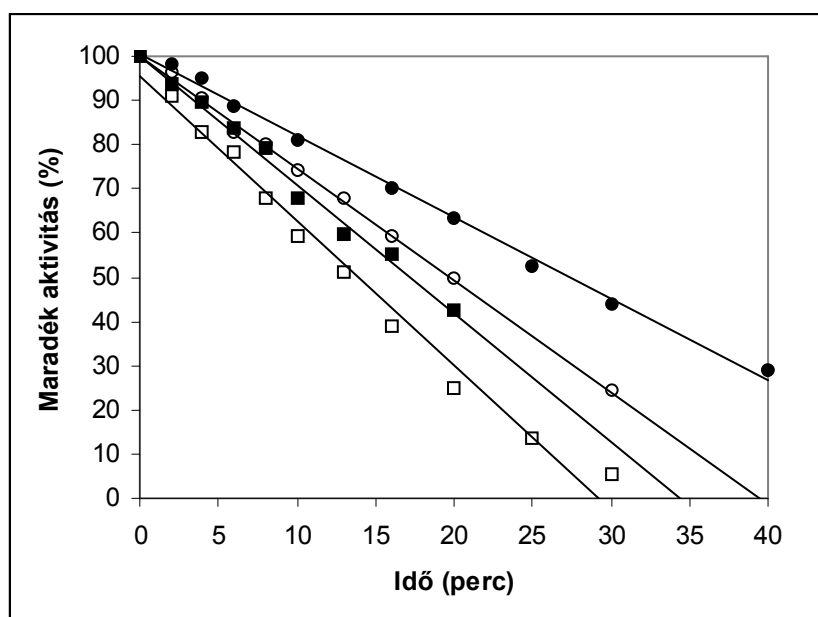
A szintén karboxil csoportokra specifikus Woodward reagens K (WRK) (Lundblad és Noyes 1985, Keresztessy és mts-i 1994a) alkalmazásakor is azt tapasztaltam, hogy a reagens hatékonyan inaktíválta az *A. carbonarius* által termelt –glükózidázt. A WRK koncentrációját 20-50 mM között változtattam és a reagens koncentrációjától függően az eredeti aktivitás a 30 illetve 7 %-ára csökkent. A reakciót 40 percig végeztem 50 °C-n, pH 5.0-n. Megállapítható, hogy a két, karboxil csoportra specifikus reagens hasonló hatékonysággal inaktíválta az enzimet, hiszen mindkettőt hasonló koncentráció tartományban alkalmaztam és az inaktíválódás mértéke a WRK alkalmazásakor is 80-60 % volt 8 perc után. A 40 perces inkubálási idő elteltével pedig a maradék aktivitás az eredeti 7-25 %-a volt. A WRK esetén azonban az aktivitás csökkenés nem két fázisú volt, hanem lineáris. Egy másik különbség az EDAC és a WRK között, hogy míg az EDAC-s inaktíválás szobahőmérsékleten folyt, a WRK csak magasabb hőmérsékleten, 50 °C-n inaktíválta hatékonyan az enzimet (pl. 25 °C-n 40 perc után csak 20 %-s aktivitás csökkenés volt megfigyelhető 50 mM WRK jelenlétében). A WRK-s módosítás hőmérséklet függéséről nincs adat az irodalomban, a tanszéken korábban viszont megfigyelték a jelenséget *A. carbonarius* –xilózidázánál (Kiss és mts-i 2002). Mivel az enzim hőmérsékleti optimuma 60 °C, valószínű, hogy magasabb hőmérsékleten könnyebben kialakul az aktív centrumnak az a szerkezete ami elősegíti az enzim-szubsztrát komplex illetve az enzim-inaktivátor komplex kialakulását. A WRK-s és EDAC-s módosítási kinetika különbözőségének oka abban keresendő, hogy eltérő az inaktíválás mechanizmusa a két reagens esetén. A WRK specifikus a katalitikus csoportra, míg az EDAC kevésbé specifikus, ez utóbbi minden hozzáférhető karboxil csoportot módosít. Az EDAC esetén a

valódi módosító reagens a karbodiimid által aktivált glicin-metil-észter, ami savamid kötést alakít ki a karboxilát csoportokkal. A WRK a szubsztráttal való nagyobb szerkezeti hasonlóságánál és hidrofób jellegénél fogva specifikusan az aktív centrum karboxil csoportjait módosítja.

Ebben az esetben is különböző inaktivátor koncentrációk jelenlétében inkubáltam az enzimet és a meghatározott időnként vett mintákból aktivitást mértem. Amikor a % maradék aktivitást ábrázoltam az idő függvényében, egyenest kaptam (13. ábra), ami látszólagos elsőrendű kinetikára utal, ellentétben az EDAC-s módosítás kétfázisú kinetikájával. Ilyen esetekben, mint azt már bizonyították, létezik egy sebesség meghatározó lépés az enzim irreverzibilis inaktiválása során, s ez az enzim és az inaktivátor közötti reverzibilis komplex jelenlétére utal a kovalens kötés kialakulását megelőzően (Kitz és Wilson 1962). Az enzim és az aktív centrumra specifikus reagens a 6. egyenlet szerint reagál egymással. Az enzim és az inaktivátor között egyensúlyi folyamatban enzim-inaktivátor komplex alakul ki, mely folyamatot a K_i egyensúlyi állandóval jellemezhetünk. Ezután kovalens kötés alakul ki az enzim és az inaktivátor molekula között, k_i sebességi állandóval (Kitz és Wilson 1962, Pétra 1971):



ahol E az enzim, I az inaktivátor, $E \cdot I$ az enzim-inaktivátor komplex, $E - I$ a módosított, inaktív enzim, K_i a látszólagos inhibíciós konstans, k_i az inaktiváció elsőrendű sebességi állandója.



13. ábra. β -glükózidáz inaktiválása a karboxil csoportra szelektív WRK-val.
A β -glükózidázt 20 mM (●), 30 mM (○), 40 mM (■) és 50 mM (□) WRK-val kezeltem. A jelzett időpontokban mintát vettem és meghatároztam a maradék aktivitást.

Kitz és Wilson (1962) írta le az aktív centrumra specifikus inaktivátorok kinetikáját, melyek egy nem kovalens közti terméken keresztül alakítják ki a kovalens enzim-inaktivátor komplexet. Az inaktivátor által okozott aktivitás csökkenés a következő egyenlettel írható le (7. egyenlet):

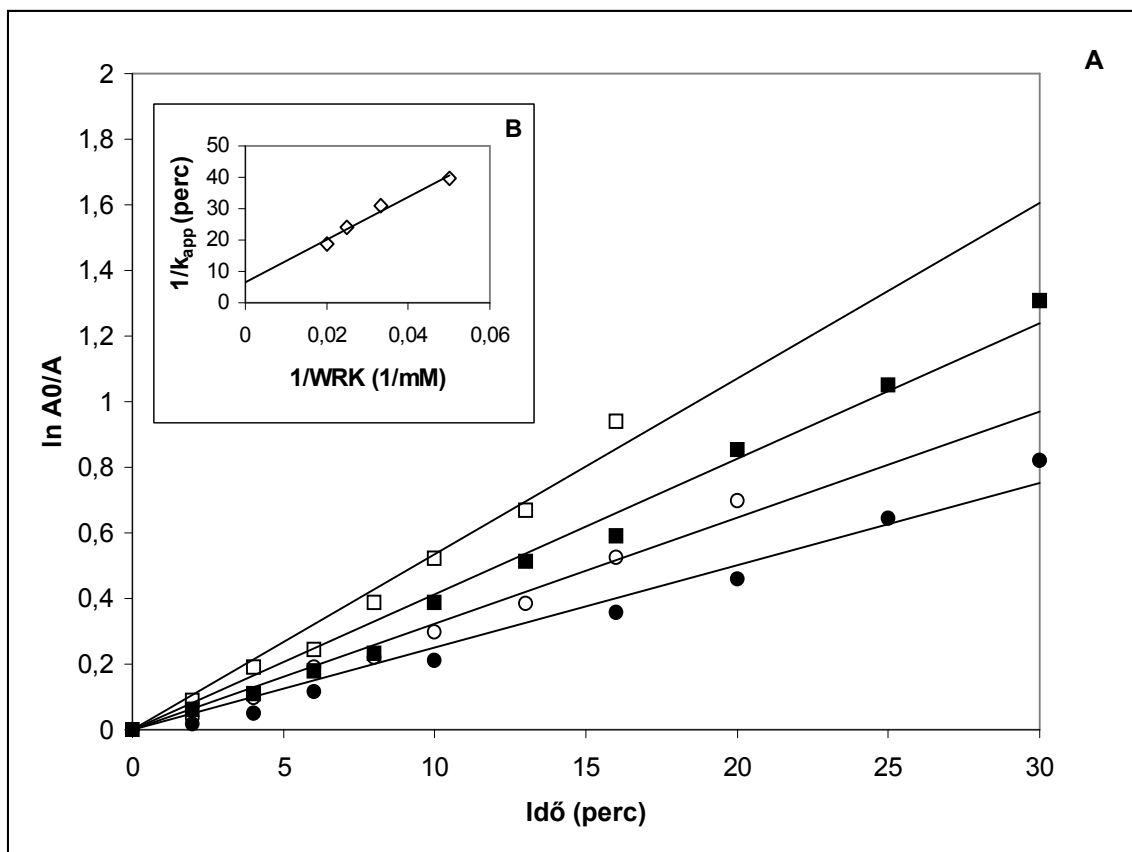
$$\ln \frac{A_0}{A} = \frac{k_i \cdot t}{1 + K_i/[I]} = k_{app} \cdot t \quad (7)$$

ahol A_0 a kezdeti sebesség, (a kezeltlen enzim aktivitása), A az inaktiválás során egy adott t időpontban a sebesség, K_i a látszólagos inhibíciós konstans, k_i az inaktiváció sebességi állandója, I az inaktivátor koncentrációja és k_{app} a látszólagos elsőrendű sebességi állandó. A látszólagos sebességi állandó inaktivátor koncentrációtól való függését a 7. egyenlet átrendezésével kapjuk meg:

$$\frac{1}{k_{app}} = \frac{1}{k_i} + \frac{K_i}{k_i} \cdot \frac{1}{[I]} \quad (8)$$

Az inaktiválás kinetikájának leírása, azaz a K_i és k_i meghatározása a (7) és (8) egyenletek alapján történt. Az $\ln A_0/A$ -idő ábrázolásnál (14/A ábra) az egyenesek meredeksége jelenti a különböző WRK koncentrációhoz tartozó látszólagos sebességi állandókat (k_{app}). Az $1/k_{app}$ - $1/WRK$ koncentráció ábra segítségével (14/B ábra) pedig meghatároztam a folyamat látszólagos inhibíciós konstansát és az inaktiváció elsőrendű sebességi állandóját: $K_i=105.9$ mM és $k_i=0.154$ min⁻¹. A $\lg k_{app}$ - $\lg WRK$ ábrázolásból a reakció rendűségére következtethettem; az egyenes meredeksége 0.82 volt, ami szerint 1 inaktívátor molekula 1 enzim molekulával reagál (15. ábra). Eredményeim megerősítik, hogy legalább egy esszenciális karboxil csoport jelen van az enzim aktív centrumában.

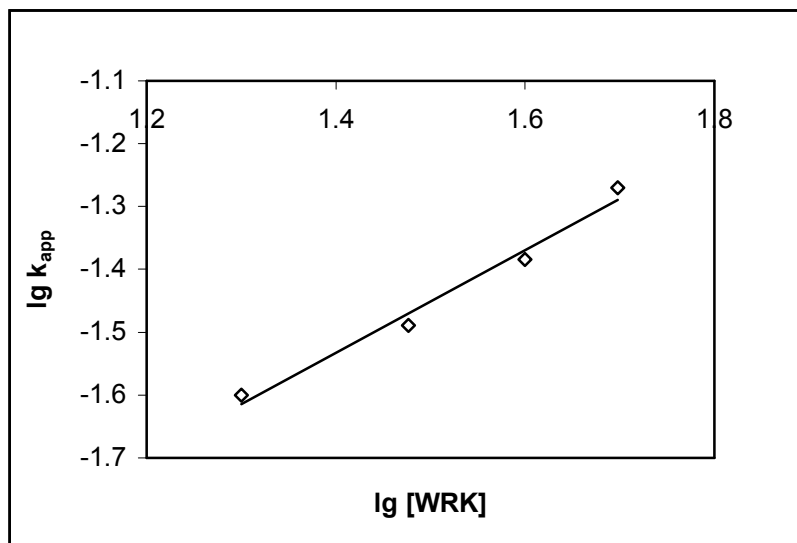
Annak a vizsgálatára, hogy a módosított karboxil oldallánc valóban az aktív centrumban lokalizálódik, szintén elvégeztem az inaktiválást egy kompetitív inhibitor jelenlétében. Ebben az esetben is a *p*NTP-Glc-t használtam erre a célra, megmértem az inaktivációs folyamat sebességét az inhibitor jelenlétében (20 mM=10 K_i) és hiányában (16. ábra). A *p*NTP-Glc jelenléte a módosítási reakcióelegyben azt eredményezte, hogy a látszólagos sebességi állandó 0.0276 min⁻¹-ről 0.019 min⁻¹-re csökkent, tehát a kompetitív inhibitor részlegesen "megvédte" az enzimet a WRK inaktíváló hatásától. Ez az eredmény szintén megerősíti, hogy a WRK, mint karboxil csoportra specifikus reagens által módosított oldallánc az enzim aktív centrumában található.



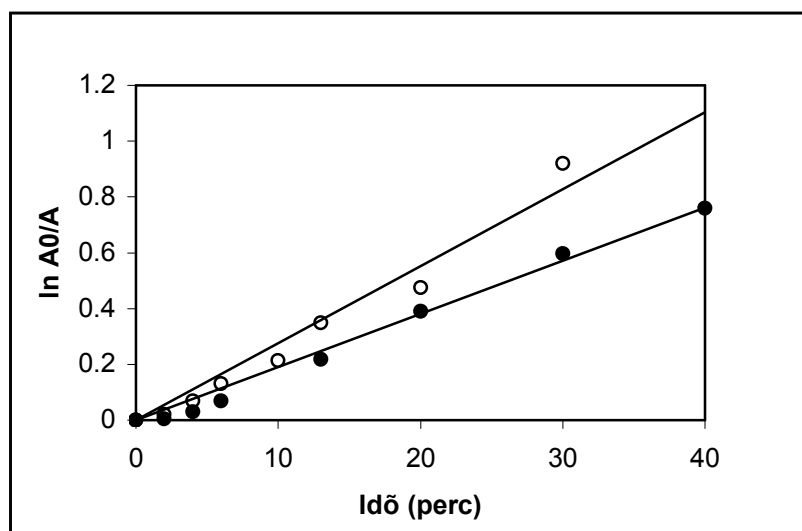
14. ábra A α -glükózidáz WRK-val történő módosítása

A) $\ln A_0/A$ az idő függvényében. Az egyenesek meredeksége adja a különböző WRK koncentrációkhoz tartozó k_{app} értékeket. Az alkalmazott WRK koncentrációk: 20 mM (●), 30 mM (○), 40 mM (■), 50 mM (□).

B) A különböző WRK koncentrációkhoz tartozó k_{app} értékek reciproka a WRK koncentráció reciprokának függvényében.

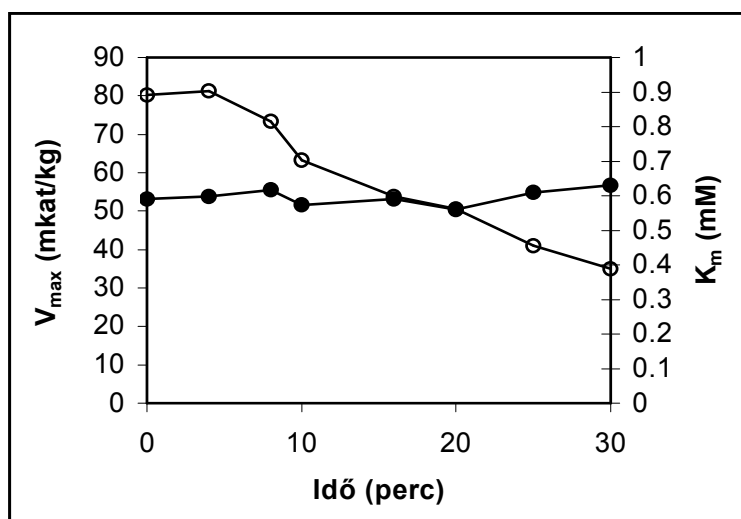


15. ábra. A $\lg k_{app}$ függése a $\lg$ WRK koncentrációtól.



16. ábra A kompetitív inhibitor "védő" hatása a WRK inaktiváló hatásával szemben.
A β -glükózidázt 25 mM WRK-l kezeltem, 20 mM p NTP-Glc, mint kompetitív inhibitor jelenlétében (●) ill. hiányában (○).

A kinetikai paraméterek változásának vizsgálata az inaktiválási reakció során felvilágosítást ad arról, hogy a módosított karboxil oldallánc milyen szerepet tölt be az enzim működésében. A módosított karboxil csoport kinetikai paraméterekre gyakorolt hatását a WRK-s módosítás során úgy vizsgáltam, hogy a meghatározott időnként vett mintákból meghatároztam a módosított enzim K_m és V_{max} értékét *p*NP-Glc szubsztrátra nézve. A K_m és V_{max} értékének alakulását az idő függvényében a 17. ábra mutatja. Látható, hogy míg a K_m gyakorlatilag változatlan maradt (értéke 0.56 mM és 0.63 mM között változott) addig a V_{max} 30 perces inkubálás alatt több, mint a felére csökkent (80 mkatal/kg-ról 35 mkatal/kg-ra). A K_m az enzim–szubsztrát komplex kialakulásáról ad felvilágosítást, a V_{max} pedig a szubsztrát átalakításáról. Ezek szerint a módosított karboxil oldallánc a szubsztrát hasításában játszik szerepet.



17. ábra A –glükózidáz jellemző kinetikai paramétereinek változása a WRK-s módosítás hatására; K_m (●), V_{max} (○).

Mindkét, karboxil csoportra specifikus módosító reagens alkalmazásával bizonyítottam, hogy az *A. carbonarius* által termelt –glükózidáz tartalmaz olyan karboxil oldalláncokat, melyek az enzim működése szempontjából nélkülözhetetlenek. Ezek közül legalább egy az enzim aktív centrumában helyezkedik el és Asp vagy Glu oldalláncának karboxil csoportja. Szerepe nagy valószínűséggel a szubsztrát hasításában van.

Woodward és mts-i az izoxazólium sók alkalmazását elsősorban karboxil csoportok aktiválására fejlesztették ki peptidek szintézise céljából vízmentes körülmények között

(Woodward és Olofson 1966). Később azonban kiterjesztették használatukat fehérjék karboxil csoportjainak módosítására, ahogy az irodalomban számos példa mutatja ezt. A karboxil csoportok szerepét az enzim katalitikus működésében több glikozidáz esetén kimutatták a karboxil csoport kémiai módosításával és a módosulás kinetikai vizsgálatával (többek között karbodiimid és Woodward K reagens alkalmazásával); pl. manióka -glükózidáz (Keresztessy és mts-i 1994a), *Trichoderma reesei* -glükózidáz (Mata és mts-i 1992, 1993), árpa -glükózidáz (Skoubas és Georgatsos 1997), *Schizophyllum commune* -glükózidáz (Clarke 1990) *Trichoderma reesei* cellobiohidroláz I (Tomme és Claeyssens 1989), *Flavobacterium dormitator* endo- -glükánáz (Yamamoto és mts-i 1983), *Aspergillus carbonarius* -xilozidáz (Kiss és mts-i 2002) vagy Jack Bean borsó –mannozidáz (Burrows és Rastall 1998) esetén. A 9. táblázatban példaként különböző glikozidázok WRK-val történő inaktiválásának kinetikai paramétereit mutatom be.

9. táblázat. Néhány glikozidáz WRK-val történő inaktiválásának kinetikai paramétere

Enzim	k_i (min^{-1})	K_i (mM)
marha karboxipeptidáz (Pétra 1971)	2.19	37.7
manióka -glükózidáz (Keresztessy és mts-i 1994a)	0.87 ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)	20.7
<i>Escherichia coli</i> uridin foszforiláz (Komissarov és mts-i 1995)	1.2	0.07
<i>A. carbonarius</i> -xilozidáz (Kiss és mts-i 2002)	0.78	677
<i>A. carbonarius</i> -glükózidáz (saját eredmények)	0.154	105.9

A K_i értékeket összehasonlítva megállapítható, hogy az inaktiválás inhibíciós konstansai azoknál az enzimeknél alacsonyabbak, ahol a hidrofób kölcsönhatásoknak nagyobb szerepük van a szubsztrát megkötésében. Az *A. carbonarius* -xilozidáza (Kiss és mts-i 2002) és -glükózidáza esetén a hidrofób kölcsönhatásoknak kisebb a szerepük, a hidrofób tulajdonságú WRK kevésbé kötődött az aktív centrumba így a K_i értékek egy nagyságrenddel nagyobbak a táblázatban bemutatott enzimekénél. Kivételt képez az

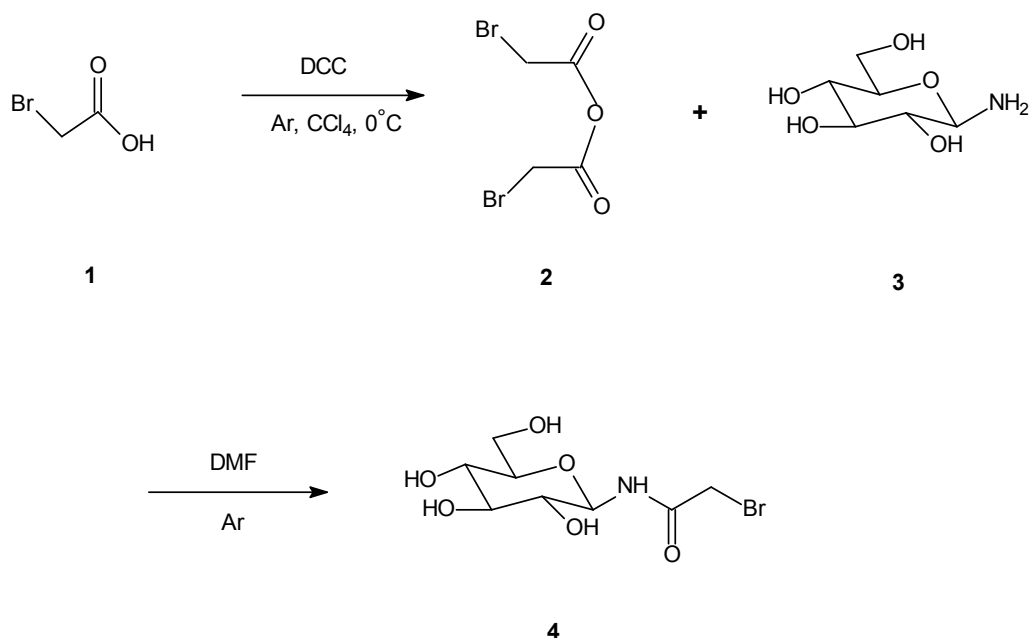
Escherichia coli uridin foszforiláza, aminek extrém alacsony a K_i értéke, ez a WRK és az uridin közötti nagy szerkezeti hasonlósággal magyarázható. Ezt az is mutatja, hogy a módosítási reakciónál ez utóbbi esetben μM nagyságrendű volt a WRK koncentrációja, míg a többi esetben 5-50 mM. A k_i értékekből pedig megállapítható, hogy az inaktiválás sebessége az *A. carbonarius* -glükózidáza esetén a legkisebb az itt bemutatott enzimek közül.

5.2.4. Az aktív centrumban található karboxil oldalláncok affinitás jelölése

Speciális inaktivátorokat elterjedten alkalmaznak glikozidázok működési mechanizmus vizsgálatára, elsősorban az enzimek aktív centrumában található katalitikus csoportok azonosítására. A mechanizmus alapú inaktivátorok lehetnek aktivált glikozidok, melyek az anomer centrum közelében egy reaktív csoporttal szubsztituáltak, vagy olyan vegyületek, amik az enzim katalitikus működése által aktiválódnak. Képesek az enzimmel glikozil-enzim közti terméket kialakítani, hidrolízisük viszont lassú, melynek eredményeképpen felhalmozódik a közti termék, így azonosítható a kötésben részt vevő katalitikus aminosav oldallánc. Ilyenek pl. a konduritól epoxidok (Legler 1977) vagy a 2-dezoxi-2-fluoro-glikozidok (Withers és mts-i 1988b, 1990). Az affinitás jelölő molekulák az inaktivátorok másik csoportját jelentik. Az affinitás jelölő technikák során általában reaktív szubsztrát analóg molekulákat alkalmaznak, melyek a szubsztráttal való nagy szerkezeti hasonlóságuknál fogva specifikusan az aktív centrumba kötődnek, s ott kovalens kötést alakítanak ki a katalitikus vagy reaktív csoportokkal (Legler 1977). Az *N*-brómacetil-glikopiranozil-aminok ilyen affín jelölő molekulák, melyek eredményes használatát már bizonyították (Naider és mts-i 1972, Viratelle és mts-i 1977, Black és mts-i 1993, Keresztessy és mts-i 1994b, Tull és mts-i 1996). Működésük alapja, hogy az aglikonon levő CH_2 csoport a karbonil csoport e^- szívó hatása miatt parciálisan pozitív töltésű lesz és az így a kialakuló pozitív töltés nukleofil támadásra érzékenyebbé válik. Ezt szintén elősegíti, hogy a Br jó távozó csoport. Ilyen módon a reagens alkalmas arra, hogy a pH optimumon a katalitikus nukleofillel, vagy magasabb pH-n a katalitikus protondonorral nukleofil szubsztitúciós reakcióban vegyen részt ezzel alkilezve a katalitikus csoportokat stabil kovalens kötés kialakításával (Keresztessy és mts-i 1994b, Keresztessy és Kiss, közlés alatt). Alkalmazásuknak a tanszéken is vannak hagyományai (Kiss és mts-i 2002), többek között ezért esett a választásunk erre az affín jelölő molekulára.

Vizsgálataim során *N*-brómacetil- -D-glükopiranozil-amint (NBAGA) alkalmaztam, melyet szintetikus úton állítottam elő. Az előállítás két fő lépésből állt. Az első lépésben brómecetsavból (1) és 1 ekvivalens *N,N'*-diciklohexil-karbodiimidből brómecetsav-anhidridet

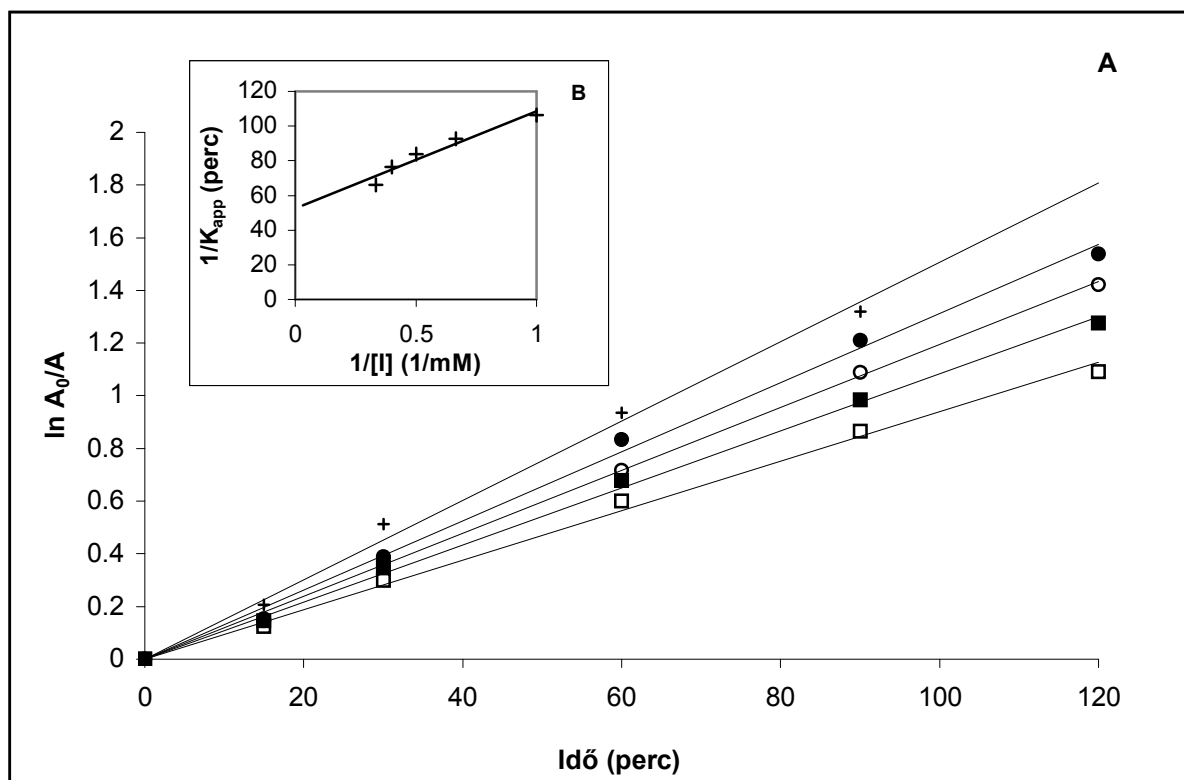
(2) szintetizáltam vízmentes körülmények között, széntetraklorid oldószerben. Majd ezt követően a brómacetsav-anhidrid és 1 ekvivalens -D-glükopiranozil-amin (3) reakciójával kaptam a NBAGA-t (4) szintén vízmentes körülmények között (18. ábra) (Thomas 1977).



18. ábra. N-Brómacetil- -D-glükopiranozil-amin szintézise

A reaktív szubsztrát analóg NBAGA molekulával történő kezelés hatására az *A. carbonarius* által termelt -glükozidáz inaktiválódott. Az inaktiválási reakciót 50 °C-n, 120 percig végeztem, az NBAGA koncentrációját 1.0-3.0 mM között változtattam. Az enzim aktivitása lineárisan csökkent az idő függvényében, az inaktivátor koncentrációjától függően a 120. perc végére az eredeti aktivitás 33-15 %-a volt. Az NBAGA tehát igen alacsony koncentrációban hatékonyan inaktiválta az enzimet.

Az inaktiválódás ebben az esetben is, ugyanúgy, mint a WRK-val történő kezelés esetén, látszólagos elsőrendű kinetikával írható le. Itt is a Kitz és Wilson (1962) által leírt kinetika (lsd. 5.2.3. fejezet) segítségével értékeltem a mérési eredményeket, a kísérleti pontok jó egyezést mutattak a 7. egyenlet alapján illesztett egyenessel (19. ábra).



19. ábra. *A. carbonarius* –glükózidázának inaktiválása

N-brómacetil- –D-glükopiranozil-aminnal.

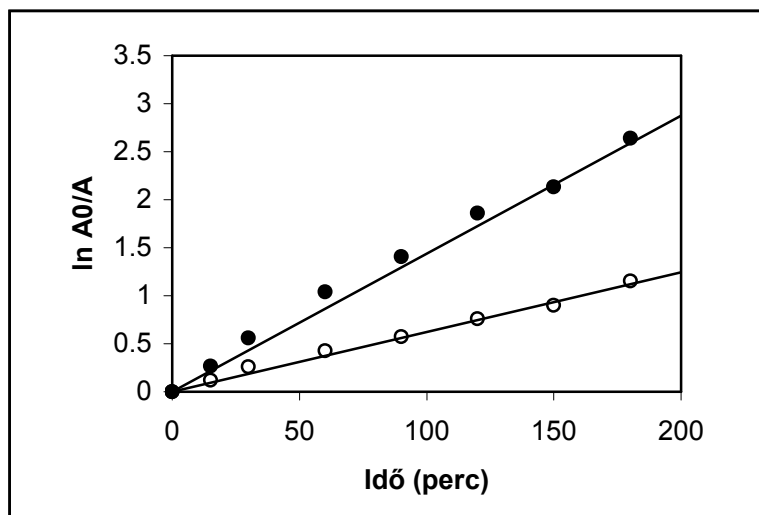
A) Az inaktiválás során 85 μg enzimet 1.0 mM ($\square$), 1.5 mM ($\blacksquare$), 2.0 mM ($\circ$), 2.5 mM ($\bullet$) és 3.0 mM (+) NBAGA jelenlétében inkubáltam 50 °C-n, 4.0 pH-n. A meghatározott időnként vett mintákból maradék aktivitást mértem.

B) Az "A" ábra illesztett egyeneseinek meredeksége, azaz a k_{app} értékek dupla reciprok ábrázolása az inaktivátor koncentráció függvényében.

A fenti ábra segítségével határoztam meg az inaktiválás kinetikai állandóit; $K_i=1.06$ mM, $k_i=0.019$ min⁻¹, míg az inaktiválás hatékonyságát jellemző k_i/K_i állandó 17.92 min⁻¹M⁻¹ -nak adódott. Ez két nagyságrenddel nagyobb, mint amit a manióka –glükózidázának NBAGA-l történő inaktiválása során mértek ($k_i/K_i=0.108$ min⁻¹M⁻¹) (Keresztessy és mts-i 1994b).

Az NBAGA-l történő inaktiválás során is meg kívántam bizonyosodni arról, hogy az inaktivátor valóban az aktív centrumban levő oldalláncot módosítja. Ennek érdekében ebben az esetben is a pNTP-Glc, mint kompetitív inhibitor jelenlétében (8 mM=4 K_i) és hiányában is elvégeztem az inaktiválást. Az eredményt a 20. ábra mutatja, mely szerint az inhibitor jelenlétében az inaktiválódás sebessége csökkent, jelezvén a versengést az inhibitor és az

inaktivátor között a kötőhelyért. A látszólagos sebességi állandó értéke 0.0144 min^{-1} -ről 0.0062 min^{-1} -re csökkent. Ezek szerint az NBAGA valóban egy olyan oldallánccal reagált, ami az enzim aktív centrumában található.



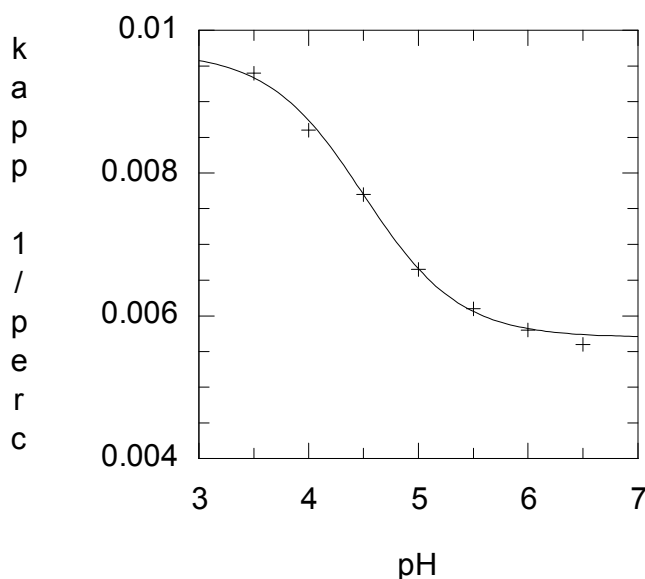
20. ábra. A *p*NTP-Glc nyújtotta részleges védelem az NBAGA inaktiváló hatásával szemben. A β -glükózidázt 3.0 mM NBAGA-l kezeltem a kompetitív inhibitor jelenlétében (8 mM) (●) és hiányában (○). A jelzett időpontokban mintát vettem és meghatároztam a maradék aktivitást.

Vizsgáltam hogyan változik a látszólagos sebességi állandó a pH változásával. A kísérlet során 3.0-7.0 pH-jú pufferben inkubáltam az enzimet az inaktivátorral, s a fent leírt módon meghatároztam az egyes pH értékekhez tartozó látszólagos sebességi állandókat. Azt tapasztaltam, hogy a k_{app} értéke függött a pH-tól (21. ábra). Ilyen esetekben, amikor az enzimnek két formája reagál az inaktivátorral (E és EH^+), a következő egyenlet írja le az inaktiválás sebességi állandójának pH függését (Naider és mts-i 1972):

$$k_{app(sat)} = k_i' \alpha + k_i''(1 - \alpha) = k_i' \frac{K}{K + [H^+]} + k_i'' \frac{[H^+]}{K + [H^+]} \quad (9)$$

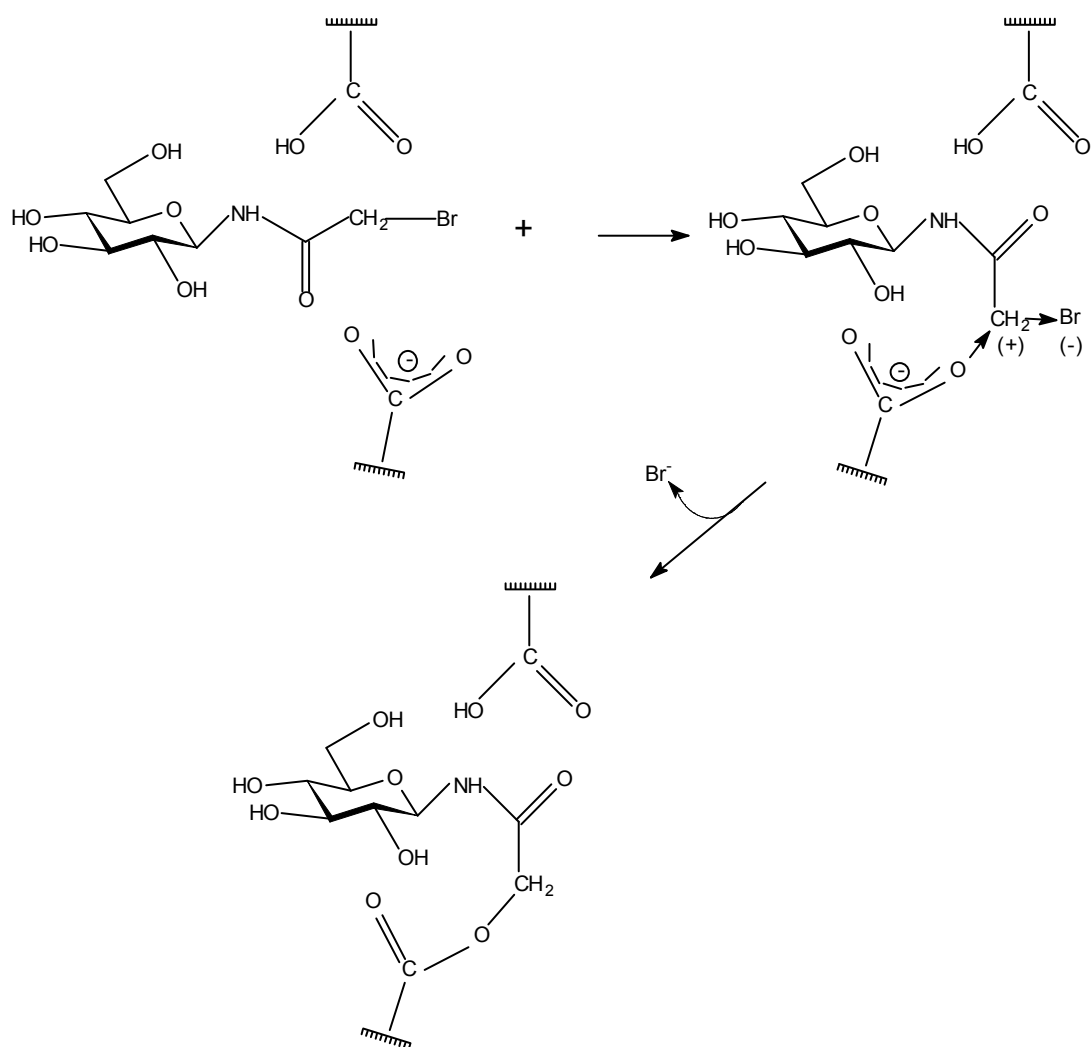
ahol $k_{app(sat)}$ a látszólagos sebességi állandó az inaktivátor telítési koncentrációjánál, k_i' és k_i'' az enzim protonált és deprotonált formájának inaktiválási másodrendű sebességi konstansai és K az inaktivátorral reagáló csoport disszociációs konstansa. A kísérleti pontokra jól illeszkedett a 9. egyenlet szerint meghatározott elméleti görbe. Az elméleti görbe a legjobb

illeszkedésénél egy 4.5 pK_A értékű csoport részvételét jelezte az inaktiválási reakcióban, míg a $k_i'=0.0057 \text{ min}^{-1}$ és $k_i''=0.0097 \text{ min}^{-1}$ volt.



21. ábra. Az NBAGA inaktiváció látszólagos sebességi állandójának pH függése.

A látszólagos sebességi állandó az enzim pH optima környékén, illetve az annál savasabb pH tartományban volt a legnagyobb. A V_{max} pH függésénél láttuk, hogy a katalitikus nukleofil erősen savas jellegű, ezért már alacsony pH-n deprotonált, ezért tudta azt módosítani az inaktivátor. Alacsonyabb pH-n nem megy végbe a módosítási reakció (hiszen itt az enzim inaktiválódik, ill. erősen savas pH-n a nukleofil és a protonáló aminosav oldallánc is protonált,) lúgos körülmények között pedig mindkettő deprotonált, így az enzimes reakció lassan megy végbe. A pH optimumon a katalitikus nukleofil deprotonált, a protonáló aminosav oldallánc viszont protonált. Ilyen körülmények között az enzim a legnagyobb hatékonysággal tud működni, nagy az inaktiválás k_{app} értéke. A pH függés görbe inflexió pontja jelöli ki az inaktivátor által módosított csoport pK_A értékét, amely $pK_A=4.5$ -nek adódott, tovább erősítve azt a feltételezést, mely szerint az inaktivátor a katalitikus nukleofillel reagált. A -glükózidáz karbodiimides módosítása során az EDAC által módosított csoport pK_A értéke ($pK_A=4.61$) nagyon hasonló az itt kapott pK_A értékhez, s ezek szerint feltételezhető, hogy a két reagens ugyanazt a katalitikus karboxilt módosította. Ezek szerint az NBAGA-l történő inaktiválás feltételezett mechanizmusát mutatja be a 22. ábra.



22. ábra Az *A. carbonarius* -glükózidáz *N*-brómacetil- -*D*-glükopiranozil-amminnal történő inaktiválásának feltételezett mechanizmusa.

Ellentétben az *A. carbonarius* -glükózidázával (ami szűk szubsztrát specifitású) a manióka növényből izolált széles szubsztrát specifitású cianogén -glükózidáz esetén a savkatalitikus csoportot módosították az NBAGA-l (Keresztessy és mts-i 1994b). Az affinitás jelölők, így pl. az NBAGA használata alkalmas a katalitikus csoportok konkrét azonosítására is. Szintén a manióka -glükózidázában radioaktív NBAGA-val történő jelöléssel azonosították a Glu-198 aminosavat, mint az aktív centrumban levő protondonort (Keresztessy és mts-i 1994b). A *Flavobacterium meningosepticum* -glükózidáz esetén NBAGA segítségével azonosították a Glu-473-t, mint a savkatalitikus oldalláncot, illetve 2',4'-dinitrofenil-2-dezoxi-2-fluoro- -*D*-glükózid alkalmazásával az Asp-247-t, mint a

katalitikus nukleofilt. Mindkét esetben a jelölt enzim proteolitikus emésztésével, peptid térképezéssel majd ezt követő tandem MS analízissel azonosították a katalitikus csoportokat (Chir és mts-i 2002). Ugyanakkor, a katalitikus nukleofilt (Glu-358) azonosították *Agrobacterium* -glükózidázában, igaz, nem NBAGA-1, hanem egy 2-dezoxi-2-fluoroglükózidot, mint mechanizmus alapú inaktívátort alkalmazva (Withers és mts-i 1990). Keresztessy és Kiss -glükózidázok egy csoportjával végeztek inaktivációs vizsgálatokat NBAGA-1, melynek alapján két csoportba sorolták az enzimeket; az egyik csoportnál a savkatalitikus oldalláncot, míg a másiknál a katalitikus nukleofilt módosították (Keresztessy és Kiss, közlés alatt).

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatómunkám során fungális eredetű, *Aspergillus carbonarius*-ból izolált α -glükoszidáz enzim tisztításával, biokémiai jellemzésével és működési mechanizmusának vizsgálatával foglalkoztam.

Az enzimforrásként választott, s az irodalomban kevésbé ismert *A. carbonarius* α -glükoszidáz termelését két másik ismert *Aspergillus* faj, az *A. niger* és *A. phoenicis* α -glükoszidáz termelésével hasonlítottam össze. A kísérletek során kétféle táptalajon tenyésztettem a három különböző törzset; szilárd fázisú búzakorpa táptalajt és folyékony, glükóz C-forrást tartalmazó táptalajt alkalmaztam. Búzakorpa C-forráson az *A. niger*, míg glükóz C-forráson az *A. phoenicis* bizonyult a legjobb enzimtermelőnek.

Az enzimek tiszta formában való kinyerésére három lépéses tisztítási eljárást dolgoztam ki, mely hidrofób kromatográfiából, méretkizárásos kromatográfiából és kromatofókuszálasból állt. Az *A. carbonarius* α -glükoszidáza esetén a tisztítási folyamat végén az enzim 102-szeresére tisztult és 60 %-s hozammal kaptam vissza. Összehasonlítottam a három különböző *Aspergillus* fajból izolált α -glükoszidáz biokémiai tulajdonságait is. Vizsgálataim során meghatároztam az enzimek izoelektromos pontját kromatofókuszálassal, a pH és a hőmérséklet hatását az enzim működésre és stabilitásra, illetve a kinetikai paramétereket *p*NP-Glc és cellobióz szubsztrátokkal. Az *A. carbonarius* által termelt α -glükoszidáz egy savas jellegű fehérje, mivel izoelektromos pontja pH 4.2. Működésének hőmérséklet optimuma 60 °C, pH optimuma pedig pH 5.0 volt, stabilitását 50 °C-ig és pH 4.0-8.0 tartományban őrizte meg. Az enzim jellemző kinetikai paraméterei *p*NP-Glc szubsztrátra; $K_m=0.67$ mM és $V_{max}=224$ mkatal/kg, cellobióz szubsztrátra $K_m=3$ mM és $V_{max}=243$ mkatal/kg. A kinetikai paraméterekből arra lehet következtetni, hogy a *p*NP-Glc felé nagyobb affinitással rendelkezik az enzim és hatékonyabban is hidrolizálja. Az *A. niger* és *A. phoenicis* által termelt α -glükoszidázok minden fent említett tulajdonságban nagy hasonlóságot mutattak az *A. carbonarius* enziméhez, tehát a vizsgált három α -glükoszidáz biokémiai tulajdonságai közel azonosak. Mindhárom enzim csak α -glükoszidáz aktivitással rendelkezett, azaz szűk szubsztrát specifitásúak, ami azt mutatja, hogy a cukorgyűrű hidroxil csoportjainak térállása nagyon fontos az enzimek működése szempontjából. Az *A. carbonarius* α -glükoszidáz esetén SDS-PAGE alkalmazásával megállapítottam, hogy az enzim molekulasúlya 108 kDa.

További vizsgálataim az *A. carbonarius* -glükozidáz működési mechanizmusának felderítésére vonatkoztak. Az inhibíciós kinetikai kísérletekkel a szubsztrátkötő helyet vizsgáltam. A szubsztrát glikon részével való kölcsönhatásról adnak felvilágosítást a glükózzal és a glükonsav(1-5)laktonnal végzett inhibíciós kísérletek. A glükóz jó gátló hatása arra utal, hogy az aktív centrumnak a cukorrésszel kialakuló kölcsönhatása ugyanolyan fontos, mint a hidrofób aglikonnal létrejövő kölcsönhatás. A glükonsav(1-5)lakton, mint átmeneti állapot analóg inhibitor, igen jó gátló hatása bizonyíték arra nézve, hogy az átmeneti állapotban a szubsztrát félszék konformációt vesz fel. Az 1-tio-glükozid típusú inhibitorok alkalmazása rávilágított, hogy az aglikon kötőhely hidrofób jellegű.

A kinetikai paraméterek pH függését felderítő vizsgálatokból kiderült, hogy a szubsztrát hidrolízisében két ionizálható aminosav oldallánc vesz részt, melyek közül az egyiknek deprotonálnak, a másiknak protonálnak kell lennie a hatékony működés érdekében. Mind a szabad enzim, mind az enzim-szubsztrát komplexre jellemző pK értékek alapján feltételezhető, hogy a szubsztrát megkötéséhez és hidrolíziséhez egy ionizált karboxilát és egy protonált karboxil csoport jelenléte szükséges. Az említett ionizált karboxilát igen alacsony pK értéke ($pK_{E1}=2.8$) szerint ez egy erősen savas jellegű csoport.

A karboxil csoportoknak az enzim működésében betöltött szerepének vizsgálatához két, karboxil csoportra specifikus reagenssel (vízoldható karbodiimid és Woodward reagens K) végeztem kémiai módosítási reakciókat. Mindkét reagens esetében vizsgáltam az inaktiválás kinetikáját és egy kompetitív inhibitor által kifejtett védőhatást, mely vizsgálatok eredményéből arra lehet következtetni, hogy az *A. carbonarius* -glükozidáza valóban tartalmaz olyan karboxil oldalláncokat melyek esszenciálisak az enzim működése szempontjából és ezek közül legalább egy az enzim aktív centrumában található. A karbodiimides inaktiválás pH függéséből feltételezhető, hogy a reagens a katalitikus nukleofillel reagált és a módosított csoport valóban egy Glu vagy egy Asp karboxil oldallánca. Jelentősége a szubsztrát hasításában van, hiszen a karboxil csoport WRK-val történő módosításának hatására a V_{max} értéke csökkent, míg a K_m gyakorlatilag változatlan maradt.

A továbbiakban az aktív centrumban található karboxil csoport affinitás jelölését kívántam megvalósítani egy reaktív szubsztrát analóg molekulával, az *N*-brómacetil- -D-glükopiranozil-aminnal, melynek affinitás jelölő tulajdonságát más -glükozidázok esetén bizonyították. A szintetizált NBAGA teljesen inaktiválta az enzimet. Aktív centrum specifikus (affinitás jelölő) jellegét kompetitív ligand segítségével bizonyítottam, melynek jelenlétében csökkent az inaktiválás sebessége. Az inaktiválás pH függése alapján nagyon

valószínű, hogy a módosított karboxilát a katalitikus nukleofillel azonos. További bizonyíték, hogy a módosult oldalláncra meghatározott pK_A érték ($pK_A=4.5$) összhangban volt a karbodiimid által módosított csoport pK_A értékével ($pK_A=4.61$), ami megfelel a katalitikus nukleofil savi disszociációs állandójának. Ezek szerint a két reagens ugyanazt a karboxil csoportot módosította. Eredményeim egyeznek korábbi megfigyelésekkel, melyek szerint az inaktívátor a katalitikus nukleofilt módosítja.

7. SUMMARY

INVESTIGATION THE MECHANISM OF ACTION OF AN EXTRACELLULAR -D-GLUCOSIDASE FROM *ASPERGILLUS CARBONARIUS*

-D-Glucosidases catalyze the hydrolysis of aryl- and alkyl- -D-glucosides as well as glucosides containing a glucosyl moiety as aglycon (eg., cellobiose). Current research on -glucosidases has significant scientific, medical and economic implications. β -Glucosidases play central role in numerous biological processes. In human therapeutics the deficiencies of -glucosidase encoding genes are responsible for many hereditary diseases. The specific inhibitors of glycoside hydrolysis can serve as potential drugs in the case of diabetes or virus infections. Plant β -glucosidases have been implicated in a variety of growth, productivity, defense and food toxicity related reactions such as cyanogenesis.

Cellulose, the most abundant renewable resource, forms the highest proportion of agricultural residues and municipal garbage. In fungi and bacteria β -glucosidases are involved in cellulose and cellobiose catabolism as part of the cellulase complex. Cellulases break down cellulose to cellobiose and β -glucosidases hydrolyze cellobiose to two glucose molecules. β -Glucosidase is inhibited by its end product, glucose; the substrate cellobiose accumulates and in turn inhibits the cellulase complex. If the rate-limiting step catalyzed by -glucosidase in cellulose hydrolysis can be overcome, glucose production from cellulose by enzymatic means should become economically feasible. Thus, fungal and bacterial β -glucosidases appear as ideal candidates for engineering a β -glucosidase to be used as part of the cellulase complex in the industrial-scale conversion of cellulose to glucose.

It has already been shown that the *Aspergilli* are powerful producers of β -glucosidases and supplementation of cellulases with exogenously added *Aspergillus* -glucosidase increases the rate of cellulose hydrolysis. Extending the research of new enzyme sources we investigated the β -glucosidase production of *Aspergillus carbonarius*. The main aim of our research was to investigate the mechanism of action of this enzyme because this fungus and its β -glucosidase have not been examined yet.

The -glucosidase production of *A. carbonarius* was compared to that of two well characterized *Aspergillus* species, *A. niger* and *A. phoenicis*, respectively. For enzyme production two different growth conditions were used; the liquid fermentation medium

contained glucose as carbon source while the solid state medium contained wheat bran carbon source. Each *Aspergillus* strain produced extracellular β -glucosidase. The enzyme production reached the highest value on the 10th day on wheat bran and on the 9th day on glucose carbon source in the case of all *Aspergillus* strains examined. In the case of the submerged fermentation the fungi started to produce β -glucosidase only when all the glucose was consumed from the fermentation broth, this refers to catabolite repression. The amount of β -glucosidase increased continuously until the last day of fermentation in both media. Comparing the β -glucosidase production of the shaken flask cultures on the glucose carbon source, *A. phoenicis* achieved the highest enzyme activity, yield and productivity values whilst *A. niger* had the highest specific activity value. On solid state medium *A. niger* proved to be the best enzyme producer.

A rapid and efficient procedure was developed for the purification of the β -glucosidases, which involved three steps; hydrophobic interaction chromatography (HIC), size exclusion chromatography and chromatofocusing. The *A. carbonarius* β -glucosidase was purified 102-fold with an overall yield of 60 % and a specific activity of 715 nkatal/mg protein towards *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (*p*NP-Glc). The β -glucosidases were purified to homogeneity and the purified enzyme showed a single protein band on SDS-PAGE. In the purification procedure pigments, polysaccharides and contaminating proteins had to be eliminated from the crude preparations. The fermentation broth contained other glycosid hydrolases, such as β -D-galactosidase, β -D-xylosidase and α -L-arabinosidase, respectively.

All enzymes examined showed only β -glucosidase activity. In order to characterize the enzymes from different sources the isoelectric points of the enzymes were determined by chromatofocusing and the effect of temperature and pH on enzyme activity and stability was also investigated using both *p*NP-Glc and cellobiose as substrates. The β -glucosidase isolated from *A. carbonarius* was an acidic protein with pI value of pH 4.2. The temperature optima of the enzyme was 60 °C and after two hours of incubation it remained stable up to 50 °C for both *p*NP-Glc and cellobiose as substrates. The pH optima of the *A. carbonarius* β -glucosidase was pH 5.0 with *p*NP-Glc and pH 4.0-4.5 with cellobiose substrate and was stable in the pH range of 4.0-8.0. The β -glucosidases isolated from *A. phoenicis* and *A. niger* had similar properties and also similar results were obtained for the enzymes produced on glucose and wheat bran carbon sources.

The kinetic parameters of the β -glucosidases were determined by non-linear fitting of the classic Michaelis-Menten rate equation to the experimental data. That of the *A.*

carbonarius α -glucosidase were $K_m=0.67$ mM and $V_{max}=224$ mkatal/kg for *p*NP-Glc, $K_m=3$ mM and $V_{max}=243$ mkatal/kg for cellobiose as substrate. There was no significant difference between the K_m values of the enzymes from different origins. The K_m values were 3.4-6.2 times higher for cellobiose than for *p*NP-Glc in all cases. The V_{max}/K_m values for cellobiose were 24-65 % of those for *p*NP-Glc. These facts indicate that the enzymes have higher affinity towards *p*NP-Glc and hydrolyse it more efficiently than cellobiose. The molecular weight of the *A. carbonarius* α -glucosidase was determined by SDS-PAGE. The molecular weight of the enzyme is 108 kDa.

The α -glucosidase isolated from *A. carbonarius* has narrow substrate specificity because it only hydrolyses β -glucosidic bonds. It means that the orientation of the hydroxyl groups of the pyranoside ring of the substrate is very important possibly because of establishing essential hydrogen bonds on the substrate binding.

Inhibition studies were carried out to obtain information about the substrate binding site of the α -glucosidase. The inhibition experiments with glucose and glucono(1-5)lacton provided information about the interactions between the substrate binding site and the carbohydrate moiety of the substrate. The good inhibitory effect of the glucose reveals that, in contrast to other β -glucosidases examined earlier in our department, the interaction of the carbohydrate moiety of the substrate is as important as the one with the hydrophobic aglycon. Glucono(1-5)lacton is a transition state analogue inhibitor and its strong inhibitory effect proves that in the transition state the substrate is distorted into half chair conformation. 1-Thio-glucoside inhibitors were used to obtain further information on the structure of the active centre with respect to the interactions with the aglycon part of the substrate. Our results indicated that the aglycon binding site has hydrophobic character.

According to the results of the investigation of the effect of pH on the kinetic parameters, the hydrolysis of the substrate can be described on the basis of the diprotic enzyme model, that is, two ionizable amino acid side chains take part in the catalysis; one of them must be ionized while the other must be protonated. The pH dependence of the V_{max}/K_m gives information about the enzyme efficiency and substrate binding and the V_{max} reveals for the amino acid side chains hydrolysing the substrate. At the pH dependence of the V_{max}/K_m for *p*NP-Glc the values of the molecular acid dissociation constants of the free enzyme were $pK_{E1}=2.8$ and $pK_{E2}=5.93$. These values permit us to conclude that besides an ionized carboxylate group, a protonated carboxyl group is involved in the formation of the ES complex. The very low pK value of the ionized carboxylate suggests that this is an extremely acidic group. In the case of the pH dependence of the maximal velocity for *p*NP-Glc

hydrolysis the acid dissociation constants of the amino acid side chains involved in catalysis were $pK_{ES1}=2.24$ and $pK_{ES2}=6.14$. These groups are similar to those of the free enzyme. The acidity of these groups in the free enzyme changed on binding of the substrate in a way that the anionic group became more acidic and the proton donor became weaker acidic which is favourable for the efficient catalysis.

On the basis of the pH dependence studies we wanted to investigate the possibility whether carboxylate groups are the essential ionizable groups in *A. carbonarius* -glucosidase. For this purpose Woodward reagent K and a water soluble carbodiimide (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDAC) in the presence of nucleophile glycine methyl ester were used as selective modifying agents for these functional residues. The enzyme was inactivated by both reagents. While the WRK inactivated the enzyme according to pseudo-first order kinetics, in the case of the EDAC we observed complex kinetics where the inactivation of the enzyme could be resolved into two first order processes. The difference in the kinetics of the inactivations can be explained by the different modification mechanism of the reagents. In the case of the WRK the inactivation is more specific for the carboxyl groups located in the active site due to the reagent's hydrophobic character and structural similarity to the substrate. In the case of the EDAC mediated inactivation the glycine methyl ester (which is activated by the EDAC) makes a nucleophile attack modifying not only the active site carboxylates but other carboxylates, too which are easily accessible for the reagent. Kinetic analysis of the modifications suggested that one EDAC or WRK molecule reacted with one enzyme molecule. These results further supported that at least one essential carboxylate residue is present in the *A. carbonarius* -glucosidase. The rate of inactivations were also measured in the presence of a competitive inhibitor (*p*-nitro-thiophenyl β -D-glucopyranoside, *p*NTP-Glc). In both cases the enzyme was partially protected against inactivation by the inhibitor demonstrating that the modified group is involved in the active center of the enzyme and may play catalytic role. From the pH dependence of the EDAC-mediated inactivation the acid dissociation constant of the modified group was $pK_A=4.61$, supporting the hypothesis that a carboxylate residue of an Asp or Glu plays catalytic nucleophile role in the active center of the -glucosidase. Considering that the rate of inactivation was the highest at the enzyme's optimum pH value (pH 4.5-5.5), and that in this pH the nucleophile is deprotonated and the acid catalyst group is protonated we can assume that the EDAC modified the catalytic nucleophile. Similar result was obtained with WRK, which inactivated the enzyme at pH optimum, which is pH 5.0. The effect of modifying the essential carboxylate on the kinetic constant of the enzyme was also investigated. After

incubation with WRK $V_{\max}$ decreased to the half of that of the unmodified enzyme, while K_m did not changed significantly. These results clearly indicate that the carboxylate group plays role in the substrate cleavage and not binding.

As it was shown by the inactivation with specific chemical modifications (WRK, EDAC and glycin methyl ester) it can be suggested that a carboxylate nucleophile is involved in the catalytic process. To obtain further support to this idea, an affinity label *N*-bromoacetyl- β -D-glucopyranosylamine (NBAGA) was used, whose affinity labeling character has been already proved in the case of other β -glucosidases. NBAGA was synthesized in our laboratory in two steps; to obtain bromoacetic anhydride, bromoacetic acid was treated with *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide and than with the reaction of the bromoacetic anhydride and β -D-glucopyranosylamine NBAGA was obtained.

The enzyme was effectively inactivated by NBAGA according to pseudo-first order kinetics. Protection by *p*NTP-Glc against inactivation demonstrated the active site specific (affinity labeling) character of the NBAGA. The rate of inactivation was the highest at the optimum pH value of the enzyme suggesting that the catalytic nucleophile was modified by the NBAGA similarly to the case of the EDAC-mediated modification. Also, the acid dissociation constant of the modified group ($pK_A=4.5$) was very similar to that of the residue modified by EDAC. These facts permit us to conclude that modification by NBAGA could be directed toward the carboxylate group acting as the catalytic nucleophile in the mechanism of action of this enzyme. This is in good agreement with earlier observations where in the case of different glycoside hydrolases the catalytic nucleophile was modified by *N*-bromoacetyl- β -D-glucopyranosylamines. However in some cases the modification of the acid catalyst proton donor group was reported.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Ait, N., Creuzet, N. and Cattanoë, J. 1979 Characterization and purification of thermostable β -glucosidase from *Clostridium thermocellum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 537-546.
- Allen, A. L. and Sternberg, D. 1980 β -Glucosidase production by *Aspergillus phoenicis* in stirred tank fermentors. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **10**, 180-197.
- Baird, S. D., Hefford, M. A., Johnson, D. A., Sung, W. L., Yagucgi, M. and Seligy, V. L. 1990 The Glu residue in the conserved Asn-Glu Pro sequence of two highly divergent endo- β -1,4-glucanases is essential for enzymatic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**, 1035-1039.
- Battalino, R. A., Hueergo, M., Pilosuf, A. M. R. and Bartholomai, G. B. 1991 Culture requirements for production of protease by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 292-296.
- Béguin, P. 1990 Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 219-248.
- Belaich, A., Fierobe, H.-P., Baty, D., Busetta, B., Bagnara-Tardif, C., Gaudin, C. and Belaich J.-P. 1992 The catalytic domain of endoglucanase A from *Clostridium cellulolyticum*: effects of arginine 79 and histidine 122 mutations on catalysis. *J. Bacteriol.* **174**, 4677-4682.
- Beldman, G., Searle-Van Leeuwen, M. F. Rombouts, F. M. and Voragen, F. G. J. 1985 The cellulase of *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.* **140**, 301-308.
- Black, T. S., Kiss, L., Tull, D. and Withers, S. G. 1993 N-Bromoacetyl-glycopyranosylamines as affinity labels for a β -glucosidase and a cellulase. *Carb. Res.* **250**, 195-202.
- Blake, C. C. F., Mair, G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C. and Sarma, V. R. 1967 Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. *Proc. Royal Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* **167**, 378-388.
- Bourne, Y. and Henrissat, B. 2001 Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 593-600.
- Breuil, C., Wojtezak, G. and Sandler, J. N. 1986 Production and localization of cellulases and β -glucosidase from the thermophilic fungus *Thielavia terrestris*. *Biotechnol. Lett.* **8**, 673-676.

- Brown, J. A., Falconer, D. J. and Wood, T. M. 1987 Isolation and properties of mutants of the fungus *Penicillium pinophilum* with enhanced cellulase and β -glucosidase production. *Enzyme Microb. Technol.* **9**, 169-175.
- Brown, R. D. and Gritzali, M. 1984 Microbial enzymes and lignocellulose utilization. *Basic Life Sci.* **28**, 239-265.
- Brumbauer, A., Füleki, I., Réczey, K. and Kemény, S. 2003 β -glucosidase production by *Aspergillus niger*: optimisation the composition of medium. *J. Biotechnol. Közlés alatt*.
- Brumbauer, A., Göte, J. and Réczey, K. 2000 Study on heterogeneity of β -glucosidase from *Aspergillus* species by using counter-current distribution. *J. Chrom.* **734**, 247-254.
- Brun, E., Moriaud, F., Gans, P., Blackledge, M. J., Barras, F. and Marion, D. 1997 Solution structure of the cellulose-binding domain of the endoglucanase Z secreted by *Erwinia chrysanthemi*. *Biochem.* **36**, 16074-16086.
- Burrows, H. M. and Rastall, R. A. 1998 Essential carboxyl and tryptophan residues in Jack Bean α -mannosidase. *Phytochemistry* **48**, 257-260.
- Chang, M. M., Chou, T. Y. C. and Tsao, G. T. 1981 Structure, pretreatment and hydrolysis of cellulose. *Adv. Biochem. Eng.* **20**, 15-42.
- Chir, J., Withers, S., Wan, C.-F. and Li, Y.-K. 2002 Identification of the two essential groups in the family 3 β -glucosidase from *Flavobacterium meningosepticum* by labelling and tandem mass spectrometric analysis. *Biochem. J.* **365**, 857-863.
- Clarke, A. J. 1990 Chemical modification of a β -glucosidase from *Schizophyllum commune*: evidence for essential carboxyl groups. *Biochim. Biophys. Acta* **1040**, 145-152.
- Clarke, A. J., Bray, M. R. and Strating, H. 1993 β -Glucosidases, β -glucanases and xylanases. Their mechanism of catalysis. in β -Glucosidases: Biochemistry and molecular biology, ed. Esen, A., Chap. 3., p. 27-41, American Chemical Society, Washington.
- Cornish-Bowden, A. 1979 Effects of pH and temperature on enzymes. In: Fundamentals of Enzyme Kinetics, Chap. 7., pp. 130-146, Butterworth & Co Ltd, London.
- Coughlan, M. P. 1985 The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.* **3**, 39-109.
- Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Bevan, D. R., Henrissat, B. and Esen, A. 2000 The mechanism of substrate (aglycone) specificity in β -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize β -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13555-13560.

- Dale, M. P., Kopfler, W. P., Chait, I. and Byers, L. D. 1986 β -Glucosidase: substrate, solvent, and viscosity variation as probes of the rate-limiting steps. *Biochemistry* **25**, 2522-2529.
- Damude, H. G., Gilkes, N. R., Kilburn, D. G., Miller, Jr. R. C. and Warren, R. A. J. 1993 Endoglucanase CasA from alkalophilic *Streptomyces* strain KSM-9 is a typical member of family B of β -1,4-glucanases. *Gene*. **123**, 105-107.
- Davies, G. and Henrissat, B. 1995 Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. **3**, 852-859.
- Davies, G. J., Mackenzie, L. F., Varrot, A., Dauter, M., Brzozowski, A. M., Schulein, M and Withers, S. G. 1998 Snapshots along an enzymatic reaction coordinate: analysis of a retaining β -glycoside hydrolase. *Biochemistry* **37**, 11707-11713.
- Dekker, R. F. H. 1986 Kinetic, inhibition and stability properties of a commercial β -glucosidase preparation (cellobiase) from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lingocellulose. *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 1438-1442.
- Dekker, R. H. F. and Wallis, A. F. A. 1983 Enzymic saccharification of sugarcane bagasse by autohydrolysis steam explosion. *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 3027-3048.
- Deslongchamps, P. 1983 Stereoelectronic effects in organic chemistry. Pergamon Press: New York.
- Emert, G. H., Gum, E. K., Lang, J. A., Lin, T. H. and Brown, R. D. 1974 Cellulases. *Adv. Chem. Ser.* **36**, 79-100.
- Enari, T. M. 1987 Enzymatic hydrolysis of cellulose: is the current theory of the mechanisms of hydrolysis valid? *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **5**, 67-87.
- Fagerstam, L. G. and Petterson, L. G 1980 Cellobiohydrolases of *Trichoderma reesei* QM9414. A new type of cellulolytic synergism. *FEBS Lett.* **119**, 97-100.
- Fagerstam, L. G., Petterson, L. G. and Engstrom, J. A. 1984 The primary structure of a 1,4- -glucan cellobiohydrolase from the fungus *Trichoderma reesei* QM9414. *FEBS Lett.* **167**, 309-315.
- Fan, L. T., Lee, Y. H. and Beardmore, D. H. 1980 Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 1527-1542.
- Fort, S., Varrot, A., Schulein, M., Cottaz, S., Driguez, H. and Davies, G. J. 2001 Mixed linkage cellooligosaccharides: a new class of glycoside hydrolase inhibitors. *Chem. Biochem.* **2**, 319-325.

- Fukuda, H., Imura, M., Kasahara, H., Kirimura, K. and Usami, S. 1987 Effects of the addition of laminaran on β -glucosidase production by *Trichoderma viridie*. *J. Ferment. Technol.* **65**, 91-93.
- Galas, E. and Romanowska, I. 1997 Purification and some properties of β -glucosidase from *Aspergillus niger* IBT-90. *Acta Microbiol. Pol.* **46**, 241-252.
- Gebler, J. C., Aebersold, R. and Withers, S. G. 1992a Glu-537, not Glu-461, is the nucleophile in the active site of (lac Z) β -galactosidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**, 11126-11130.
- Gebler, J., Gilkes, N. R., Claeyssens, M., Wilson, D. B., Bégiun, P., Wakarchuk, W. W., Kilburn, D. G., Miller, R. C. Jr., Warren, R. A. J. and Withers, S. G. 1992b Stereoselective hydrolysis catalyzed by related β -1,4-glucanases and β -1,4-xylanases. *J. Biol. Chem.* **267**, 12559-12561.
- Ghareib, M. and Nour el Dein, MM. 1994 Lytic activity of enzyme preparation from *Aspergillus carbonarius*. *Acta Microbiol. Pol.* **43**, 321-325.
- Gilkes, N. R., Claeyssens, M., Aebersold, R., Henrissat, B., Meinke, A., Morrison, H. D., Kilburn, D. G., Warren, R. A. J. and Miller, R., C. 1991 Structural and functional relationships in two families of β -1,4-glycanases. *Eur. J. Biochem.* **202**, 367-377.
- Gilligan, W. and Reese, E. T. 1954 Evidence for multiple components in microbial cellulases. *Can. J. Microbiol.* **1**, 90-107.
- Gong, C. S. Ladisch, M. R. and Tsao, G. T. 1979 Biosynthesis, purification and mode of action of cellulases of *Trichoderma reesei*. *Adv. Chem. Ser.* **181**, 262-287.
- Gräbnitz, A., Seiss, M. Rucknagel, K. P. And Staudenbauer, W. L. 1991 Structure of the β -glucosidase gene bglA of *Clostridium thermocellum*. Sequence analysis reveals a superfamily of cellulases and β -glycosidases including human lactase/phlorizin hydrolase. *Eur. J. Biochem.* **200**, 301-309.
- Gritzali, M. and Brown, R. D. Jr. 1979 The cellulase system of *Trichoderma*. Relationships between purified extracellular enzymes from induced or cellulose-grown cells. *Adv. Chem. Ser.* **181**, 237-260.
- Hagget, K. D., Choi, W. Y. and Dunn, N. W. 1978 Mutants of *Cellulomonas* which produce increased levels of β -glucosidase. *Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol.* **6**, 189-191.
- Hartree, E. F. 1972 Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422-427.

- Hazlewood, G. P., Davidson, K., Lauire, J. I., Huskisson, N. S. and Gilbert, H. J. 1993 Gene sequence and properties of Cell, a family E endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 307-316.
- Heightman, T. D. and Vasella, A. 1999 Recent insights into inhibition, structure and mechanism of configuration-retaining glycosidases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 750-770.
- Henrissat, B. 1991 A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280**, 309-316.
- Henrissat, B. 1993 New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **293**, 781-788.
- Henrissat, B. 1996 Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**, 695-696.
- Henrissat, B., Claeyssens, M., Tomme, P., Lemesle, L. and Mornon, J.-P. 1989 Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene* **81**, 83-95.
- Henrissat, D. and Davies, G. 1997 Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 637-644.
- Hugget, A. S. G. and Nixon, D. A. 1957 Glucose oxidase method for measurement of glucose. *Biochem. J.* **66**, 12-15.
- Humphrey, A. E. 1979 Hydrolysis of cellulose: mechanisms of enzymatic and acid catalysis. *Adv. Chem. Ser.* **181**, 25-53.
- Ikegami, T., Okada, T., Hashimoto, M., Seino, S., Watanabe, T. and Shirakawa M. 2000 Solution structure of the chitin-binding domain of *Bacillus circulans* WL-12 chitinase A1. *J. Biol. Chem.* **275**, 13654-13661.
- Imoto, T., Johnson, L., North, A., Phillips, D. and Rupley, J. 1972 in *The enzymes*, Academic Press, New York. ed. P. D. Boyer. 3rd ed. 7, 665.
- Itzstein, M. and Colman, P. 1996 Design and synthesis of carbohydrate-based inhibitors of protein-carbohydrate interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 703-709.
- Jain, D. and Ghose, T. K. 1984 Cellobiose hydrolysis using *Pichia etchellsii* cells immobilized in calcium alginate. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 340-346.
- Jenkins, J., Leggio, L. L., Harris, G. and Pickersgill, R. 1995 β -glucosidase, β -galactosidase, family A cellulases. Family F xylanases and two barley glucanases form a superfamily of enzymes with 8-fold β/α architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of β -strands four and seven. *FEBS Lett.* **362**, 281-285.

- Joosten, H. M., Goetz, J., Pittet, A., Schellenberg, M. and Bucheli, P. 2001 Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *Int. J. Food Microbiol.* **65**, 39-44.
- Kasumi, T., Tsumuraya, Y., Brewer, C. F., Kersters-Hilderson, H., Claeysens, M. and Hehre, E. J. 1987 Catalytic versatility of *Bacillus pumilus* -xylosidase: glycosyl transfer and hydrolysis promoted with α - and β -D-xylosyl fluoride. *Biochemistry* **26**, 3010-3016.
- Kavitha, R. and Umesh-Kumar, S. 2000 Genetic improvement of *Aspergillus carbonarius* for pectinase overproduction during solid state growth. *Biotechnol Bioeng.* **67**, 121-125.
- Keresztessy, Zs. and Kiss, L. N-Bromoacetyl- -D-glycopyranosylamines as probes of the mechanism of action of β -glycosidases *Biochim. Biophys. Acta.* Közlés alatt.
- Keresztessy, Zs. Kiss, L. és Hughes, M. A. 1994a Investigation of the active site of the cyanogenic β -D-glucosidase (linamarase) from *Manihot esculenta crantz* (cassava). I. Evidence for an essential carboxylate and a reactive histidine residue in a single catalytic center. *Arch. Biochem. Biophys.* **314**, 142-152.
- Keresztessy, Zs. Kiss, L. és Hughes, M. A. 1994b 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.
- Kevei, F., Hamari, Z., Varga, J., Kozakiewicz, Z. and Croft, J. H. 1996 Molecular polymorphism and phenotypic variation in *Aspergillus carbonarius*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **70**, 59-66.
- Kiss, T. and Kiss, L. 2000 Purification and characterisation of an extracellular β -D-xylosidase from *Aspergillus carbonarius*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 465-470.
- Kiss, T., Erdei, A. and Kiss, L. 2002 Investigation of the active site of the extracellular β -D-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**, 3245-3251.
- Komissarov, A. A., Romanova, D. V. and Debabov, V. G. 1995 Complete inactivation of *Escherichia coli* uridine phosphorylase by modification of Asp with Woodward reagent K. *J. Biol. Chem.* **270**, 10050-10055.
- Koshland D. E. 1953 Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biol. Rev.* **28**, 416-436.
- Kumar, P. K. R. and Lonsane, B. K. 1989 Microbial production of gibberellins: state of art. *Adv. Appl. Microbiol.* **34**, 29-139.

- Kuroki, R., Weaver, L. H. and Matthews, B. W. 1995 Structure-based design of a lysozyme with altered activity. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 1007-1011.
- Kuroki, R., Weaver, L. H. and Matthews, B. W. 1999 Structural basis of the conversion of the T4 Isozyme into a transglycosidase by reengineering the active site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 8949-8954.
- Kyriacou, A., Mackenzie, C. R. and Neufeld, R. J. 1987 Detection and characterization of the specific and nonspecific endoglucanases of *Trichoderma reesei*: evidence demonstrating endoglucanase activity by cellobiohydrolase II. *Enzyme Microb. Technol.* **9**, 25-32.
- Ladish. M. R. Hong, J. Voloch, M. and Tsao, G. T. 1981 Cellulase kinetics. *Basic Life Sci* **18**, 55-83.
- Laemmli, U. K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laine, R. A. 1994 A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields 1.05×10^{12} structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology* **4**, 759-767
- Lal  gerie, P., Legler, G. and Yon, J. M. 1982 The use of inhibitors in the study of glycosidases. *Biochimie* **64**, 977-1000.
- Lawson, S. L., Wakarchuk, W. W. and Withers, S. G. 1996 Effects of both shortening and lengthening the active site nucleophile of *Bacillus circulans* xylanase on catalytic activity. *Biochemistry* **35**, 10110-10118.
- Lawson, S. L., Wakarchuk, W. W. and Withers, S. G. 1997 Positioning the acid/base catalyst in a glycosidase: studies with *Bacillus circulans* xylanase. *Biochemistry* **36**, 2257-2265.
- Leaback, D. H. 1968 On the inhibition of β -N-acetyl-D-glucosaminidase by 2-acetamido-2-deoxy-D-glucono-(1-5)-lactone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32**, 1025-1030.
- Leatherbarrow, R. J. 1990 GraFit version 2.0. Erithacus Software Ltd. Staines, UK.
- Leclerc, M., Blondin, B., Ratamahenia, R., Arnaud, A. and Galzy, P. 1985 Selection and study of mutants of *Dekkera intermedia* and *Candida wickerhamii* depressed for β -glucosidase production. *FEMS Microbiol. Lett.* **30**, 389-392.
- Legler, G. 1977 Glucosidases. *Methods Enzymol.* **46**, 368-381.
- Legler, G. and Jülich, E. 1984 Synthesis of 5-amino-5-deoxy-D-mannopyranose and 1,5-dideoxy-1,5-imino-D-mannitol, and inhibition of α - and β -D-mannosidases. *Carb. Res.* **128**, 61-72.

- Levy, H. M., Leber, P. D. and Ryan, E. M. 1963 Inactivation of myosin by 2,4-dinitrophenol and protection by adenosin triphosphate and other phosphate compounds. *J. Biol. Chem.* **238**, 3654-3659.
- Lonsane, B. K., Ghidyal, N. P., Budiatman, S. and Ramakrishna, S. V. 1985 Engineering aspects of solid-state fermentation. *Process Biochem.* **7**, 258-264.
- Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. 1985 The modification of carboxyl groups. *In: Chemical reagents for protein modification, Vol: II.*, pp. 105-122. eds., CRC Press, Florida.
- Mackenzie, L. F., Wang, Q., Warren, R. A. J. and Withers, S. G. 1998 Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 5583-5584.
- Malet, C. and Planas, A. 1998 From β -glucanase to β -glucosynthase: glycosyl transfer to α -glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking in its catalytic nucleophile. *FEBS Lett.* **440**, 208-212.
- Mandels, M. 1982 Cellulases. *Ann. Repts. Ferment. Process.* **5**, 35-78.
- Mandels, M. and Reese, E. T. 1964 Fungal cellulases and the microbial decomposition of cellulosic fabric. *Dev. Ind. Microbiol.* **5**, 5-20.
- Mandels, M. and Weber J. 1969 Production of cellulase. *Adv. Chem. Ser.* **95**, 391-414.
- Mandels, M., Medeiros, J. E., Andreotti, R. E. and Bissett, F. H. 1981 Enzymatic hydrolysis of cellulose: evaluation of cellulase culture filtrates under the use conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 2009-2026.
- Marsden, W. L. and Gray, P. P. 1986 Enzymatic hydrolysis of cellulose in lignocellulosic materials. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **3**, 235-276.
- Mata, I., Castillón, M. P., Dominguez, J. M., Macarrón, R. and Acebal, C. 1993 Chemical modification of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* QM 9414. *J. Biochem.* **114**, 754-759.
- Mata, I., Estrada, P., Macarrón, R., Dominguez, J. M. and Castillón, M. P. 1992 Chemical mechanism of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* QM 9414. pH-dependence of kinetic parameters. *Biochem. J.* **283**, 679-682.
- McCarter, J. D. and Withers, S. G. 1994 Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 885-892.
- McCarter, J. D., Yeung, W., Chow, J., Dolphin, D. and Withers, S. G. 1997 2-Deoxy-2-fluoro disaccharides: incorporating aglycone specificity into mechanism-based glycosidase inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 5792-5797.

- McCarter, J., Adam, M. and Withers, S. G. 1992 Binding energy and catalysis: fluorinated and deoxygenated glycosides as mechanistic probes of *Escherichia coli* (lac Z) β -galactosidase. *Biochem. J.* **286**, 721-727.
- McClearly, B. V. and Harrington, J. 1988 Purification of β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Methods Enzymol.* **160**, 575-583.
- McIntosh, L. P., Hand, G., Johnson, P. E., Joshi, M., Korner, M., Plesniak, L. A., Ziser, L., Wakarchuk, W. W. and Withers, S. G. 1996 The pKa of the general acid/base group of a glycosidase cycles during catalysis: A ^{13}C -NMR study of *Bacillus circulans* xylanase. *Biochemistry* **35**, 9958-9966.
- Miller, G. 1959 Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- Naider, F., Bohak, Z. and Yariv, J. 1972 Reversible alkylation of a methionyl residue near the active site of β -galactosidase. *Biochemistry* **11**, 3202-3207.
- Nakayama, M. Tomita, Y., Suzuki, H. and Nisizawa, K. 1976 Partial proteolysis of some cellulase components from *Trichoderma viridie* and the substrate specificity of the modified products. *J. Biochem.* **79**, 955-966.
- Namchuk, M. and Withers, S. G. 1995 Mechanism of *Agrobacterium* β -glucosidase: kinetic analysis of the role of non-covalent enzyme-substrate interactions. *Biochemistry* **34**, 16194-16202.
- Niwa, T., Inouye, S., Tsuruoka, T., Koaze, Y. and Niida, T. 1970 "Nojirimycin" as a potent inhibitor of glucosidase. *Agric. Biol. Chem.* **34**, 966-968.
- Notenboom, V., Birsan, C., Nitz, M., Rose, D. R., Warren, R. A. J. and Withers, S. G. 1998a Active site mutations lead to covalent intermediate accumulation in *Cellulomonas fimi* -1,4-glycosidase Cex: insights into transition state stabilization. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 812-818.
- Notenboom, V., Birsan, C., Warren, R. A. J., Withers, S. G. and Rose, D. R. 1998b Exploring the cellulose/xylan specificity of the β -1,4-glycanase Cex from *Cellulomonas fimi* through crystallography and mutation. *Biochemistry* **37**, 4751-4758.
- Peller, L. and Alberty R. A. 1959 Multiple intermediates in steady state enzyme kinetics. I. The mechanism involving a single substrate and product. *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 5907-5914.
- Pétra, H. P. 1971 Modification of carboxyl groups in bovine carboxypeptidase A I. Inactivation of the enzyme by N-ethyl-5-phenylisoxazolium-3'-sulfonate (Woodward's reagent K). *Biochemistry* **10**, 3163-3170.

- Petterson, L. G., Fagerstam, L. G., Bhikhabhai, R. and Leandoer, K. 1981 The cellulase complex of *Trichoderma reesei* QM9414. *in the* Ekman Days. International symposium on wood and pulping chemistry. SPCI, Stockholm, **3**, 39-42.
- Pócsi, I. and Kiss, L. 1988 Kinetic studies on the broad-specificity β -D-glucosidase from pig kidney. *Biochem. J.* **256**, 139-146.
- Pócsi, I., Kiss, L., Hughes, M. A. és Nánási, P. 1989 Kinetic investigation of the substrate specificity of the cyanogenic β -D-glucosidase (linamarase) of white clover. *Arch. Biochem. Biophys.* **272**, 496-506.
- Raghothama, S., Simpson, P. J., Szabó, L., Nagy, T., Gilbert, H. J. and Williamson, M. P. 2000 Solution structure of the CBM10 cellulose binding module from *Pseudomonas* xylanase A. *Biochemistry* **39**, 978-984.
- Rashid, M. H. and Siddiqui, K. S. 1997 Purification and characterization of a β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol. (Praha)* **42**, 544-550.
- Rashid, M. H. and Siddiqui, K. S. 1998 Thermodynamic and kinetic study of stability of the native and chemically modified β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Proc. Biochem.* **33**, 109-115.
- Ray, W. Y. and Koshland, D. E. 1961 A method for characterizing the type and numbers of groups involved in enzyme action. *J. Biol. Chem.* **236**, 1973-1979.
- Réczey, K., Brumbauer, A., Bollók, M., Szengyel, Zs. and Zacchi, G. 1998 Use of hemicellulose hydrolysate for β -glucosidase fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70-72**, 225-235.
- Reese, E. T. 1977 Degradation of polymeric carbohydrates by microbial enzymes. *Rec. Adv. Phytochem.* **11**, 311-367.
- Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J. K. C. and Jones, T. A. 1990 Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* **249**, 380-386.
- Sidhu, G., Withers, S. G., Nguyen N. T., McIntosh, L. P., Ziser, L. and Brayer, G. D. 1999 Sugar ring distortion in the glycosyl-enzyme intermediate of a family G/11 xylanase. *Biochemistry* **38**, 5346-5354.
- Sinnott M. L. 1987 Glycosyl group transfer. *in* Enzyme mechanism, ed. M. I. Page, A. Williams, Royal Society of Chemistry, London, p. 259-297.
- Sinnott M. L. 1990 Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**, 1171-1202.

- Skoubas, A. and Georgatsos, J. G. 1997 Identification of essential amino acids for the catalytic activity of barley β -glucosidase. *Phytochemistry* **46**, 997-1003.
- Srivastava, S. K., Gopalkrishnan, K. S. and Ramachandran, K. B. 1987 The production of β -glucosidase in shake-flasks by *Aspergillus wentii*. *J. Ferment. Technol.* **65**, 95-99.
- Sternberg, D., Vijakumar, P. and Reese, E. T. 1977 β -Glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Can. J. Microbiol.* **23**, 139-147.
- Sulzenbacher, G., Driguez, H., Henrissat, B., Schulein, M. and Davies, G. J. 1996 Structure of the *Fusarium oxysporum* endoglucanase I with a nonhydrolyzable substrate analogue: substrate distortion gives rise to the preferred axial orientation for the leaving group. *Biochemistry* **35**, 15280-15287.
- Taherzadeh, M. J., Eklund, R., Gustaffson, L., Niklasson, C. and Lidén, G. 1997 Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. *Ind. Eng. Chem. Res.* **36**, 4659-4665.
- Takenishi, S., Tsujisaka, Y. and Fukumoto, J. 1973 Studies on hemicellulases IV. Purification and properties of the β -xylosidase produced by *Aspergillus niger* van Thieghem. *J. Biochem.* **73**, 335-343.
- Taylor, G. 1996 Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 830-837.
- Teeri, T. T., Lehtovaara, P., Kauppinen, S., Salovouri, I. and Knowles, J. 1987 Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes: gene sequence and expression of cellobiohydrolase II. *Gene* **51**, 43-52.
- Tews, I., Perrakis, A., Oppenheim, A., Dauter, Z., Wilson, K. S. and Vorgias, C. E. 1996 Bacterial chitinase structure provides insight into catalytic mechanism and the basis of Tay-Sachs disease. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 638-648.
- Thomas, E. W. 1977 Carbohydrate binding sites. *Methods Enzymol.* **46**, 362-368
- Tipton, K. F. and Dixon, H. B. F. 1979 Effects of pH on enzymes. *in* Methods in Enzymology, 63, Chap. 11., 183-234. Academic Press, San Diego.
- Tomme, P. and Claeysens, M. 1989 Identification of a functionally important carboxyl group in cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *FEBS Lett.* **243**, 239-243.
- Tomme, P., Chauvaux, S., Béguin, P., Dhurjati, P. and Aubert, J.-P. 1991 Identification of a histidyl residue in the active center of endoglucanase D from *Clostridium thermocellum*. *J. Biol. Chem.* **266**, 10313-10318.

- Trimbur, D., Warren, R. A. J. and Withers, S. G. 1993 A β -glucosidase from an *Agrobacterium* sp. Structure and biochemistry. in β -Glucosidases: Biochemistry and molecular biology, ed. Esen, A., Chap. 4, p. 42-55, American Chemical Society, Washington.
- 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.
- Tull, D., Withers, S. G., Gilkes, N. R., Kilburn, D. G., Warren, R. A. J. and Aebersold, R. 1991 Glutamic acid 274 is the nucleophile in the active site of a "retaining" exoglucanase from *Cellulomonas fimi*. *J. Biol. Chem.* **266**, 15621-15625.
- Unno, T., Ide, K., Yazaki, T., Tanaka, Y., Nakakuki, T. and Okada, G. 1993 High recovery purification and some properties of a β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 2172-2173.
- Varrot, A., Schulein, M., Pipelier, M., Vasella, A. T. and Davies, G. J. 1999 Lateral protonation of a glycosidase inhibitor. Structure of the *Bacillus agaradhaerens* Cel5A in complex with a cellobiose-derived imidazole at 0.97 Å resolution. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 2621-2622.
- Viratelle, O. M., Yon, J. M. and Yariv, J. 1977 The inactivation of β -galactosidase by N-bromoacetyl- β -D-glucosylamine. *FEBS Lett* **79**, 110- 112.
- Vocadlo, D. J., Davies, G. J., Laine, R. and Withers, S. G. 2001 Catalysis by hen egg white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* **412**, 835-838.
- Wang, Q. and Withers, S. G. 1995a Substrate-assisted catalysis in glycosidases. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 10137-10138.
- Wang, Q., Graham, R. W., Trimbur, D., Warren, R. A. J. and Withers, S. G. 1994 Changing enzymatic reaction mechanisms by mutagenesis: conversion of a retaining glucosidase to an inverting enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11594-11595.
- Wang, Q., Trimbur, D., Graham, R., Warren, R. A. and Withers, S. G. 1995b Identification of the acid/base catalyst in *Agrobacterium faecalis* β -glucosidase by kinetic analysis of mutants. *Biochemistry* **34**, 14554-14562.
- Watanabe, T., Sato, T., Yoshioka, S., Koshijima, T. and Kuwahara, M. 1992 Purification and properties of *Aspergillus niger* β -glucosidase. *Eur. J. Biochem.* **209**, 651-659.
- Wheatly, M. A. and Phillips, C. R. 1984 Enzymatic properties of β -glucosidase activity. *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 41-50.

- White, A., Tull, D., Johns, K., Gilkes, N. R., Withers, S. G. and Rose, D. R. 1996 Crystallographic observation of a covalent catalytic intermediate on a β -glycosidase. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 149-154.
- 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. and Street, I. P. 1988a Identification of a covalent α -D-glucopyranosyl enzyme intermediate formed on a β -glucosidase. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 8551-8553.
- Withers, S. G., Rupitz, K. and Street I. P. 1988b 2-Deoxy-2-fluoro-D-glycosyl fluorides. A new class of specific mechanism-based glycosidase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **263**, 7929-7932.
- Withers, S. G., Warren R. A. J., Street I. P., Rupitz K., Kempton J. B. and Aebersold R. 1990 Unequivocal demonstration of the involvement of a glutamate residue as a nucleophile in the mechanism of a „retaining” glycosidase. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 5887-5889.
- Wolfenden, R., Lu, X. and Young, G. 1998 Spontaneous hydrolysis of glycosides. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 6814-6815.
- Wood, T. M and McCrae, S. I. 1975 The cellulase complex of *Trichoderma koningii*. in Symp. Enzyme Hydrol. Cellul. ed: Bailey, M., Enari, T. M., Linko, M. Auckland, Finland. 231-254.
- Wood, T. M. 1981 Enzyme interactions involved in fungal degradation of cellulosic materials. in the Ekman Days. International symposium on wood pulping chemistry. SPCI, Stockholm, **3**, 31-38.
- Wood, T. M. and McCrae, S. I. 1986 Purification and properties of a cellobiohydrolase from *Penicillium pinophylum*. *Carb. Res.* **148**, 331-344.
- Woodward, J. and Arnold, S. L. 1981 The inhibition of β -glucosidase activity in *Trichoderma reesei* C30 cellulase by derivatives and isomers of glucose. *Biotechnol. Bioeng.* **18**, 1553-1562.
- Woodward, J. and Wiseman, A. 1982 Fungal and other β -glucosidases. Their properties and applications. *Enzyme Microb. Technol.* **4**, 73-79.
- Woodward, R. B. and Olofson, R. A. 1966 The reaction of isoxazolium salts with nucleophiles. *Tetrahedron, Suppl.*, **7**, 415-149.
- Yamamoto, S., Miyagi, M. and Nagasaki, S. 1983 Amino acid residues involved in the action of endo-(1-3)- β -D-glucanase II from *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae* FA-5. *Carb. Res.* **114**, 137-145.

- Zechel, D. L. and Withers, S. G. 1999 Mechanisms of glycosyl transfer. *In* Comprehensive Natural Products Chemistry; Poulter, C. D., Ed.; Elsevier: New York, Vol. 5, 279-314.
- Zechel, D. L. and Withers, S. G. 2000 Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc. Chem. Res.* **33**, 11-18.
- Zechel, D. L. and Withers, S. G. 2001 Dissection of nucleophilic and acid-base catalysis in glycosidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 573-580.
- Zeikus, J. G. 1980 Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **34**, 423-464.
- Zeng, Y. and Zhang, S. 1989 Purification and properties of β -glucosidases from *Aspergillus phoenicis*. *Acta Microbiol. Sin.* **29**, 195-199.

9. PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A dolgozat témakörében megjelent közlemények:

1. **Jäger, Sz.**, Brumbauer, A., Fehér, E., Réczey, K. and Kiss, L.
Különböző *Aspergillus* fajok által termelt β -glükózidázok fermentációja és jellemzése.
Acta Biologica Debrecina **22** (2000), 135-139.
2. **Jäger, Sz.** and Kiss, L.
N-Bromoacetyl- β -D-glucopyranosylamine as affinity label for β -D-glucosidase from *Aspergillus carbonarius*.
Acta Biologica Debrecina **23** (2001) 1-3.
3. **Jäger, Sz.**, Brumbauer, A., Fehér, E., Réczey, K. and Kiss, L.
Production and characterization of β -glucosidases from different *Aspergillus* strains.
World Journal of Microbiology and Biotechnology **17** (2001), 455-461.
4. **Jäger, Sz.** and Kiss, L.
Investigation the active site of the extracellular β -D-glucosidase from *Aspergillus carbonarius*.
Archives of Biochemistry and Biophysics (2003) Közlés alatt.

Publikációk egyéb témákban:

5. Agócs, A., Herczegh, P., **Jäger, Sz.**, Kiss, L. and Batta, Gy.
Synthesis of 3-oxagranatane-type alkaloid analogs from carbohydrates.
Tetrahedron **57** (2001) 253-239.
6. Beki, E., Nagy, L., Vanderleyden, J., **Jäger, Sz.**, Kiss, L., Fülöp, L., Hornok, L. and Kukolya, J.
Cloning and heterologous expression of a β -D-mannosidase encoding gene from *Thermobifida fusca* TM51.
Applied and Environmental Microbiology **69** (2003) 9-15.

A dolgozat témakörében bemutatott poszterek és előadások:

1. **Jäger, Sz. és Kiss, L.**

Aspergillus carbonarius által termelt β -glükózidáz izolálása és tisztítása.

Magyar Poliszacharidkémiai Munkabizottsági Ülés, 1999, Budapest

2. **Jäger, Sz. and Kiss, L.**

Investigation of the mechanism of action of β -glucosidase enzymes.

International Student Conference of Vasile Goldis University, 1999, Arad, Románia

3. **Jäger, Sz., and Kiss, L.**

Purification and characterization of extracellular β -glucosidase from *Aspergillus carbonarius*.

MTA Szénhidrátkémiai Munkabizottsági Ülés, 1999, Mátrafüred

4. **Jäger, Sz., and Kiss, L.**

Purification and characterization of extracellular β -glucosidase from *Aspergillus carbonarius*.

26th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies 1999, Nizza, Franciaország

5. **Jäger, Sz., and Kiss, L.**

N-Bromoacetyl- β -D-glucopyranosylamine as affinity label for β -glucosidase from *Aspergillus carbonarius*.

MTA Szénhidrátkémiai Munkabizottság Ülés, 2000, Mátrafüred

6. **Jäger, Sz., Brumbauer, A., Fehér, E., Réczey, K., és Kiss, L.**

Különböző *Aspergillus* fajok által termelt β -glükózidáz enzimek fermentációja és jellemzése.

IX. Fermentációs kollokvium, MBKE Biotechnológiai Szakosztály és MTA Biomérnöki Munkabizottság, 2000, Debrecen

7. **Jäger, Sz.**, and Kiss, L.

N-Bromoacetyl- β -D-glucopyranosylamine as affinity label for β -glucosidase from *Aspergillus carbonarius*.

27th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies 2001, Lisszabon, Portugália

8. **Jäger, Sz.**, és Kiss, L.

Aspergillus carbonarius β -glükózidázának izolálása, tisztítása és működési mechanizmusának vizsgálata.

Magyar Poliszacharidkémiai Munkabizottság Ülés, 2001, Budapest

9. Beki, E., Kukolya, J., Posta, K., **Jäger, Sz.**, Kiss, L., Hornok, L.

A *Thermobifida fusca* TM51 törzsből származó β -mannozidáz (EC 3.2.1.25) gén klónozása és jellemzése.

Az 50 éves Magyar Mikrobiológiai Társaság 2001 évi Jubileumi Nagygyűlése, 2001, Balatonfüred

10. **Jäger, Sz.**, Kiss, L.

N-Bromoacetyl- β -D-glucopyranosylamine as affinity label for β -glucosidase from *Aspergillus carbonarius*.

DE TTK Biológus Napok, 2001, Debrecen

11. **Jäger, Sz.**, és Kiss, L.

Aspergillus carbonarius extracelluláris β -glükózidáz aktív centrumának vizsgálata.

Debreceni Tudományos Napok, a Biológiai Tanszékcsoport Ülése, 2002, Debrecen