



**Élelmiszertudományi Kar
Sör- és Szeszzipari Tanszék**

Pectinex ultra enzimkészítmény transzglykozil aktivitásának vizsgálata

TDK dolgozat

Styevkó Csilla

III. évfolyam, Biomérnök BSc



TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0005

TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0023

Témavezetők: Dr. Habil. Nguyen Duc Quang, egyetemi docens
Styevkó Gabriella, PhD hallgató

**Budapest
2012**

Tartalomjegyzék

1	BEVEZETÉS	3
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1	Oligoszacharidok.....	4
2.2	Oligoszacharidok fizikai-kémiai tulajdonságai.....	4
2.3	Oligoszacharidok fiziológiai tulajdonságai.....	5
2.4	Oligoszacharidok osztályozása	8
2.4.1	Galakto-oligoszacharidok	8
2.4.2	Laktulóz	9
2.4.3	Laktoszacharóz	9
2.4.4	Frukto-oligoszacharidok	9
2.4.5	Palatinóz- vagy izomaltulóz-oligoszacharidok	10
2.4.6	Glikozil-szacharóz	11
2.4.7	Malto-oligoszacharidok	11
2.4.8	Izomalto-oligoszacharidok.....	11
2.4.9	Ciklodextrinek	12
2.4.10	Gentio-oligoszacharidok	13
2.4.11	Szójabab oligoszacharidok	13
2.4.12	Xilo-oligoszacharidok.....	13
2.5	Oligoszacharidok előállítása	14
2.5.1	Kémiai előállítás	14
2.5.2	Enzimes előállítás	14
2.5.3	Glikozidázok.....	15
2.5.4	Glikozil-transzferázok	18
2.6	Pectinex ultra SP-L	20
3	KÍSÉRLETI RÉSZ.....	22
3.1	Célkitűzések	22
3.2	Kísérleti hely	22
3.3	Anyagok és módszerek.....	23
3.3.1	Felhasznált anyagok.....	23
3.3.2	Alkalmazott módszerek	23
3.4	Eredmények és értékelésük.....	27
3.4.1	Pectinex ultra enzimek készítmény invertáz és β -galaktozidáz aktivitása	27
3.4.2	Különböző biszubsztrát rendszerek hatása a Pectinex ultra glikozil-transzferáz aktivitására	28
3.4.3	Szacharóz:maltóz arányának hatása a transzglikozil aktivitásra	32
3.4.4	Szénhidrát tartalom hatása a glikozil-transzferáz aktivitásra	33
4	ÖSSZEFOGLALÁS	36
5	FELHASZNÁLT IRODALOM	38

1 BEVEZETÉS

Az elmúlt időszakban az oligoszacharidokkal kapcsolatos kutatások számottevő fejlődése volt megfigyelhető. Ennek oka, hogy ezek a szénhidrátok fontos szerepet töltenek be a táplálkozásban illetve az élelmiszer-, gyógyszer-, bútór-, papír- és a kozmetikaiparban, valamint az üzemanyag termelésben is. Számos biológiai folyamatban részt vesznek, például gyulladásos folyamatokban, bakteriális és vírusos fertőzésekben, sejt-sejt kommunikációban és immunválasz reakciókban (Shetty *et al.*, 2006, Mussato & Mancilha, 2007; Homann & Seibel, 2009, Antošová & Polakovič, 2001). Továbbá léteznek olyan oligoszacharidok, amelyek fizikai-kémiai illetve fiziológiai tulajdonságaik révén funkcionális élelmiszer összetevőként is hasznosíthatók. Egyes oligoszacharidokat az emésztőrendszer enzimeit nem képesek lebontani, így diabetikus vagy alacsony kalóriatartalmú termékek gyártására is felhasználhatók (Mussato & Mancilha, 2007). Emellett prebiotikus hatásúak is lehetnek, azaz kedvezően befolyásolhatják a vastagbélben élő jótékony hatású mikroorganizmusok szaporodását illetve aktivitását.

E szénhidrátok szintézise kémiai és enzimikus módszerrel is lehetséges. Az enzimikus módszerek előnye, hogy a biokatalizátorok régió- és sztereospecifitással rendelkeznek illetve széleskörű reakciókörülmények között alkalmazhatók (Perugino *et al.*, 2004). Ezzel szemben a kémiai előállítás bonyolult és költséges folyamat, valamint a léptéknövelés megoldása is nehéz. A felsorolt indokok miatt az elmúlt években az enzimikus szintézis vált a legtöbb kutató által választott módszerré. Két fő enzim típust használnak oligoszacharidok szintézisére: hidrolázokat (glikozidázok: EC 3.2) és transzferázokat (glikoziltranszferázok: EC 2.4). Jelenleg a kereskedelemben kapható prebiotikus oligoszacharidokat is enzimek transzglikoziláz aktivitásának felhasználásával állítják elő (Crittenden & Playne, 1996; Prapulla *et al.*, 2000).

Az utóbbi években azonban megjelent egy új kutatási irányzat, amely az új típusú úgynevezett “tailor-made” (előre szabott) oligoszacharidok előállítását célozza meg. A “tailor-made” oligoszacharidok specifikus méretűek és specifikus glikopiranozil egységekből épülnek fel (Homann & Seibel, 2009). A témához kapcsolódva, a TDK munkám során a Pectinex ultra SP-L enzimkészítmény transzglikozil aktivitását vizsgáltam új típusú oligoszacharidok szintézise céljából.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Oligoszacharidok

A szénhidrátokat molekulaméretük illetve polimerizáltságuk alapján három csoportba oszthatjuk: monoszacharidok, oligoszacharidok és poliszacharidok. Az oligoszacharidok olyan összetett szénhidrátok, amelyek 3-10, más szerzők szerint 3-19 monoszacharid egységből épülnek fel (Weijers *et al.*, 2008, Mussatto & Mancilha, 2007). Ezek a meghatározások azonban nem racionális fiziológiai vagy kémiai tulajdonságokon alapulnak, ugyanis néhány diszacharid (pl. laktulóz) hasonló tulajdonságokat mutat, mint a nagyobb polimerizáltságú szénhidrátok és gyakran fő komponensei az élelmiszergyártásban alkalmazott oligoszacharid termékeknek. Következtesésképpen, az oligoszacharidok kis molekulatömegű szénhidrátok. Fiziológiai tulajdonságaik alapján az oligoszacharidok emészthető és nem emészthető kategóriába sorolhatók (Crittenden & Playne, 1996; Mussatto & Mancilha, 2007; Hirayama, 2002).

2.2 Oligoszacharidok fizikai-kémiai tulajdonságai

Az oligoszacharidok vízben oldódó vegyületek, melyek édesítő értéke 0,3-0,6-szorosa a szacharózenak. Édesítő hatásuk függ a kémiai szerkezettől, az oligoszacharid polimerizációs fokától és a termékben jelen levő mono- és diszacharidok mennyiségétől (Crittenden & Playne, 1996; Voragen, 1998). Delzenne (2003) szerint a lánc hossz növelésével az oligoszacharidok édesítő értéke csökken. E tulajdonságuk hasznosnak bizonyul olyan élelmiszereknél, ahol a szacharóz alkalmazása korlátozott túlzott édessége miatt. Az oligoszacharidok használhatók térfogatnövelőként mesterséges édesítőszerrel együtt (például aszpartám, szukralóz), ahol az adalékanyagok utóízének elfedése a cél.

A nagy molekulásúlyuknak köszönhetően a mono- és diszacharidokhoz képest nagyobb viszkozitással rendelkeznek. Az egyes oligoszacharid típusok között a stabilitás nagymértékben eltér. Ez függ a felépítő cukoregységektől, a gyűrűs és anomer szerkezettől és a kötés típusától. Általában a β -kötés erősebb az α -kötésnél, és a hexózok erősebben kötöttek, mint a pentózok (Mussatto & Mancilha, 2006). Az élelmiszerekben lévő oligoszacharidok azonban pH=4 alatt és hőkezelés vagy hosszantartó szobahőmérsékletű tárolás hatására hidrolizálódhatnak, így elvesztve a táplálkozási és fizikai-kémiai tulajdonságaikat (Mussatto & Mancilha, 2006).

Az oligoszacharidok használhatók mélyhűtött élelmiszerek fagyasztási hőmérsékletének megváltoztatására és hőkezelt termékek Maillard-reakció által okozott barnulásának csökkentésére. Fokozott nedvesség-visszatartási képességgel is rendelkeznek, amely megakadályozza az élelmiszerek túlzott kiszáradását. Kis vízaktivitást biztosítanak, ami alkalmas lehet mikrobiológiai szennyeződések szabályozására. Emellett az oligoszacharidok a keményítő retrogradáció erős inhibitorai (Prapulla *et al*, 2000; Mussatto & Mancilha, 2007).

2.3 Oligoszacharidok fiziológiai tulajdonságai

Az oligoszacharidok kedvező fizikokémiai jellemzőkkel rendelkeznek, a rájuk irányuló nagy érdeklődés oka azonban mégis az, hogy jótékony fiziológiai tulajdonsággal rendelkeznek, így élelmiszerösszetevőként használhatók.

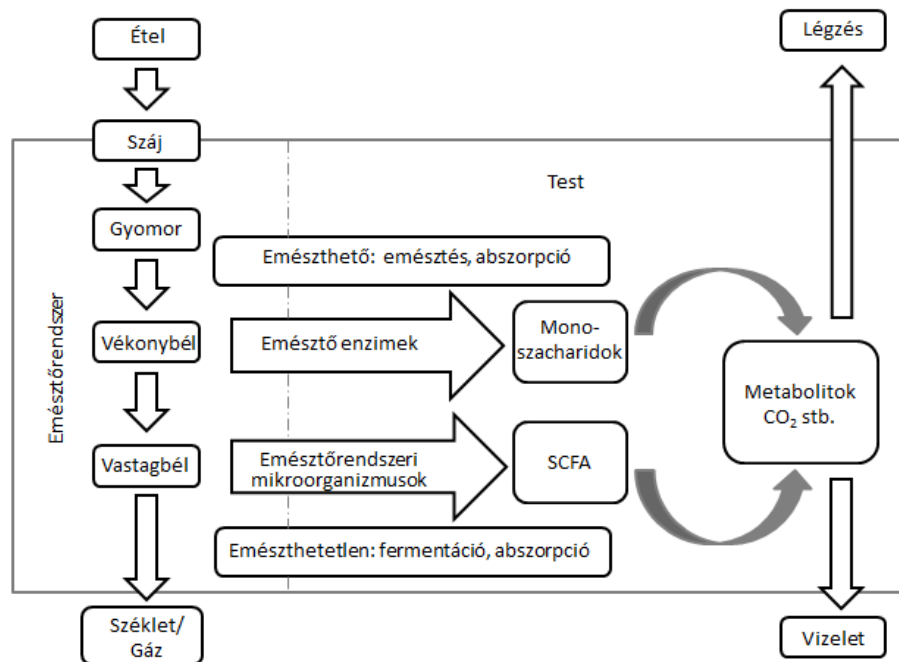
A keményítővel és az egyszerű cukrokkal ellentétben, egyes oligoszacharidokat a száj mikroflórája (pl. *Streptococcus mutans*) nem hasznosít, ezáltal nem okoznak fogszuvasodást (Prapulla *et al*, 2000). Ennek köszönhetően jól alkalmazhatók cukorhelyettesítőként cukrászati termékekben, rágógumikban, joghurtokban és üdítőitalokban.

Egyes oligoszacharidok az emberi szervezet által nem emészthetők (NDO=non-digestible oligosaccharide; nem emészthető oligoszacharidok), mivel az emberi szervezetből hiányoznak az enzimek, amelyek az alkotó monoszacharid egységek közötti kötést hidrolizálni képesek. Emészthetetlenségük teszi lehetővé, hogy édes, alacsony kalóriatartalmú, diétás illetve cukorbetegség által is fogyasztható élelmiszerek előállítására használják (Crittenden & Playne, 1996).

Az elfogyasztott NDO-k eljutnak a vastagbélbe, ahol kis oligomerekre és monomerekre hidrolizálódnak és tovább metabolizálódnak egyes anaerob baktériumok által. A vastagbélben történő fermentáció során nem csak a baktériumok szaporodásához szolgáltatnak energiát, hanem a szervezet számára metabolikusan nem hasznosítható gázok (H_2 , CO_2 , CH_4), valamint rövidláncú zsírsavak (SCFA) (pl. acetát, a propionát, a butirát és az L-laktát) termelődnek. A nem emészthető oligoszacharidok metabolizmusának könnyebb megértését az 1. ábra segíti.

A NDO-k annak ellenére, hogy nem látják el a szervezetet monoszacharidokkal, indirekt energiaforrások és anyagcsere szabályozók. A vastagbélben termelődő rövidláncú zsírsavak (SCFA) mennyisége és típusa függ a NDO típusától valamint a vastagbél mikroflórájának összetételétől. Az emésztőrendszerben rendkívül sok, főleg obligát anaerob baktérium van jelen. Ez a mikrobiális közösség rendkívül összetett, mind a mikroorganizmusok számát (hozzávetőlegesen 10^{13}), mind azok sokféleségét (400-500 különböző faj) tekintve. E

mikroorganizmusok közül, a legtöbb hasznos a szervezet számára. Egyes bélbaktérium fajok azonban patogének, akut és krónikus betegségek kiváltó okai lehetnek. Kémiai szerkezetük miatt a NDO-kat csak korlátozott számú baktérium hasznosítja, ezáltal elősegítve azok növekedését. A béltraktusban jelen levő baktériumok közül leginkább a bifidobaktériumok és lactobacillusok képesek az oligoszacharidokat hasznosítani, ezáltal kedvező hatást gyakorolni az emberi test működésére (Mussatto & Mancilha, 2007; Oku & Nakamura, 2002).



1. ábra: Az emészthető és nem-emészthető szénhidrátok anyagcsere folyamatának különbségei (Hirayama, 2002)

A vastagbélben az oligoszacharidok fermentálhatósága függ a polimerizációs foktól, a felépítő monoszacharidok glikozidos kötésétől és az elágazások mértékétől, a baktériumok közötti szinergiától, az oligoszacharid-baktérium-fermentációs termék kapcsolattól, a fermentáció természetétől és a szacharolitikus kapacitástól. A vastagbél baktériumai által végzett NDO-hasznosítás a következő hatásokat gyakorolhatja a szervezetre:

1. *A vastagbél mikroflórájának módosítása:* Az oligoszacharidok szubsztrátumként szolgálnak az anaerob baktériumok, főleg a bifidobaktériumok, növekedéséhez/szaporodásához, ez által közvetetten gátolják a káros baktériumok jelenlétét a vastagbélben. A csecsemők bélrendszerében kialakuló bifidomikroflóra pl. az anyatejben található galaktóz tartalmú oligoszacharidoknak köszönhető (Crittenden & Playne, 2009; Loo *et al.*, 1999).

2. *A vastagbél illetve a széklet pH-jának csökkentése:* A vastagbélben történő oligoszacharid fermentáció során a keletkezett rövidláncú zsírsavak csökkentik a vastagbél illetve a széklet pH-ját. Az alacsony pH gátolja bizonyos patogén baktérium fajok növekedését, a bifidobaktériumok és a tejsavbaktériumok szaporodását azonban stimulálja (Mussatto & Mancilha, 2007; Loo *et al.*, 1999).
3. *Székrekedés enyhítése:* A nem emészthető oligoszacharidok, az étkezési rostokhoz hasonlóan, megelőzik a székrekedést. A vastagbél baktériumai által végzett NDO fermentáció végtermékei a rövidláncú zsírsavak, melyek eredményesen felszívódnak a humán vastagbél hámsejtjeiben, stimulálják azok növekedését valamint a só és a víz felszívódását. Növelik az ozmotikus nyomást és ezáltal a széklet nedvességtartalmát (Qiang *et al.*, 2009).
4. *Tápanyagtermelés, mint például a B vitaminok (B₁, B₂, B₆, B₁₂, nikotinsav és folsav) szintézise* (Caselato de Sousa *et al.*, 2011).
5. *Hasmenés kialakulásának megelőzése:* E tulajdonságuk közvetlen összefüggésben állhat a bifidobaktériumok gram+ és gram- baktériumokra gyakorolt gátló hatásával (Qiang *et al.*, 2009).
6. *Emésztőrendszeri, légzőszervi, húgyúti és ivarszervi fertőzések megelőzése* azáltal, hogy gátolják a baktériumok megtapadását az epithel sejtek felületén (Mussatto & Mancilha, 2007; Crittenden & Playne, 2009).
7. *Ásványi anyagok felszívódásának indukálása (pl. vas, kalcium és magnézium):* A nem emészthető oligoszacharidok által megkötött ásványi anyagok nem szívódnak fel, így eléri a vékonybelet, ahol a szénhidrát mátrixból felszabadulva szívódnak fel. A vastagbélben felszívódó kalcium nagymértékben csökkentheti a csonttritkulás kialakulásának kockázatát, mivel ez az ásványi anyag elősegíti a csontsűrűség és a csonttömeg növekedését (Gibson & Rastall, 2006; Qiang *et al.*, 2009).
8. *Szénhidrát és lipid anyagcserére gyakorolt jótékony hatás:* Csökkentik a vér koleszterin, triglicerid és foszfolipid koncentrációját, ezáltal mérsékelve a diabétesz illetve az elhízás kialakulásának kockázatát. Egyes kutatók szerint a vérérum koleszterin koncentrációja összefügg a bélmikroflóra váltoásaival. Egyes *Lactobacillus acidophilus* törzsek képesek asszimilálni a koleszterint, míg más mikrobák képesek a koleszterin bélfalon keresztüli felszívódását gátolni. Más vélemények szerint a lipidanyagcsere változása a máj metabolikus alkalmazkodásának következménye, amit a rövidláncú zsírsavak indukálnak. (Crittenden & Playne, 2009; Mussatto & Mancilha, 2007).

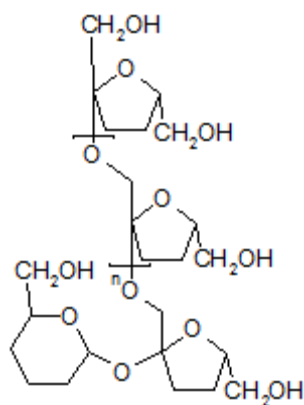
9. *A rák (főként a vastagbélrák) kockázatának csökkentése.* Valószínűsíthető, hogy az oligoszacharidok antikarcinogén hatása összefüggésben van a sejtszintű immunitás növekedésével, a sejtfal összetételével és a bifidobaktériumok extracellulárisan termelt anyagaival. A széklet egyes fiziológiai paraméterei, így a pH, az ammónia, a p-krezol és az indol tartalom kockázati tényezőknek tekinthetők a vastagbélrák kialakulásánál. Egy humán tanulmány bizonyította, hogy a transzgalaktozilált diszacharidok bevitele csökkenti a széklet pH-ját valamint az ammónia, a p-krezol és az indol koncentrációját, valamint elősegíti a bifidobaktériumok és a laktobacillusok növekedését és a *Bacteroidaceae* populáció csökkenését. Az alacsony pH a rákkeltő anyagok kiválasztását is segíti (Mussatto & Mancilha, 2007; Qiang *et al.*, 2009).

Az emberi szervezetre gyakorolt jótékony hatásai miatt ezeket a vegyületeket funkcionális élelmiszerként tartják számon. A legtöbb NDO-t a prebiotikumok közé sorolják, mivel szelektíven stimulálják az emberi szervezet számára hasznos baktérium fajok növekedését és/vagy metabolikus aktivitását, adagolásukkal javítják a vastagbél mikroflórájának összetételét, és ez által a szervezet egészségi állapotát (Mussatto & Mancilha, 2007).

2.4 Oligoszacharidok osztályozása

2.4.1 Galakto-oligoszacharidok

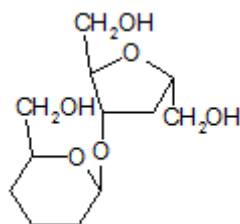
Szerkezetük: α -D-Glu(1,4)-[β -D-Gal(1,6)]_n, ahol n=2-5 (2. ábra). Kereskedelmi előállításuk laktózból történik a β -galaktozidáz enzim galaktoziltranszferáz aktivitásának felhasználásával, amit magas laktóz koncentrációval érnek el. Prebiotikus élelmiszer összetevőként alkalmazhatók, mivel elősegíti a bifidobaktériumok növekedését a vastagbélben (Crittenden & Playne, 2009; Hirayama, 2002).



2. ábra: Galakto-oligoszacharidok kémiai szerkezete

2.4.2 Laktulóz

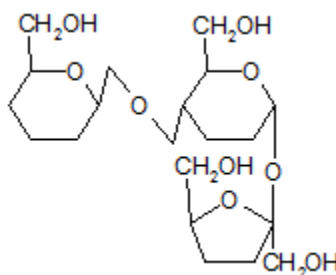
Szerkezete: β -D-Gal(1,4)- β -D-Fru (3. ábra). Lúgos izomerizációval állítható elő, mely során a laktóz glükóz részét fruktózzá alakítják. Az emberi szervezet számára nem emészthető, kalóriatartalma alacsony. Elősegíti a bifidobaktériumok növekedését, így prebiotikus élelmiszer összetevőként alkalmazzák. Széles körben használják (gyógyszerként) a székrekedés és a májeredetű agyvelő-bántalom gyógyászati kezelésére (Crittenden & Playne, 1996; Delzenne, 2003).



3. ábra: A laktulóz kémiai szerkezete

2.4.3 Laktoszacharóz

Szerkezete: β -D-Gal(1,4)- α -D-Glu-(1,2)- β -D-Fru (4. ábra). A laktoszacharóz egy triszacharid, amely laktóz és szacharóz keverékéből állítható elő a β -frukto-furanozidáz enzim transzfruktoziláz aktivitásának felhasználásával. Bifidogenikus élelmiszer összetevőként alkalmazzák (Prapulla *et al.*, 2000; Mussatto & Mancilha, 2007).



4. ábra: Laktoszacharóz kémiai szerkezete

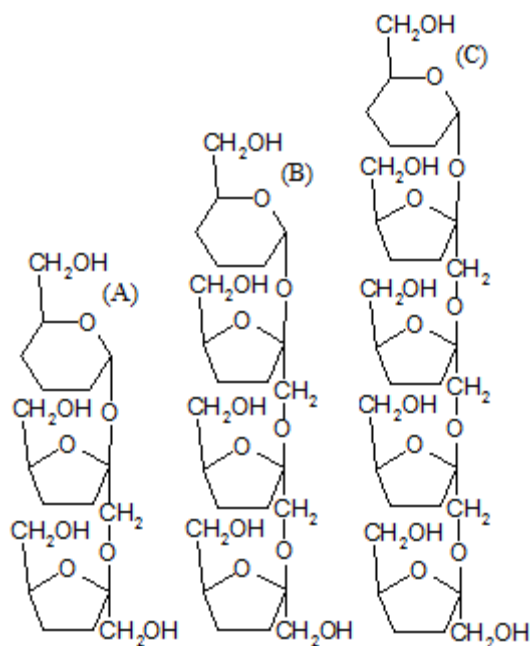
2.4.4 Fruktó-oligoszacharidok

Szerkezetük: α -D-Glu(1,2)-[β -D-Fru(1,2)]_n, ahol n=2-4

β -D-Fru(1,2)-[β -D-Fru(1,2)]_n, ahol n=1-9

α -D-Glu(1,2)-[β -D-Fru(1,2)]_n, ahol n=2-9 (5. ábra)

Két különböző folyamattal állíthatók elő, némileg különböző végtermékkel. Szacharózból a β -frukto-furanozidáz enzim transzfruktoziláz aktivitásával, valamint inulinból az inulináz enzim segítségével, kontrollált enzimatis hidrolízissel. A különböző módszerekkel előállított frukto-oligoszacharidoknak más-más az alkalmazási területük. A transzfruktozilációval előállított frukto-oligoszacharidokat prebiotikumként, míg az inulinból előállított hosszabb láncú frukto-oligoszacharidokat zsírhelyettesítőként alkalmazzák (Crittenden & Playne, 1996; Oku & Nakamura, 2002; Hirayama, 2002).



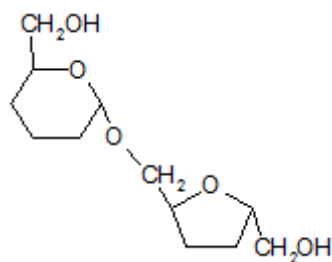
5. ábra: A frukto-oligoszacharidok szerkezete

(A) kesztóz, (B) nisztóz, (C) fruktozil-nisztóz

2.4.5 Palatinóz- vagy izomaltulóz-oligoszacharidok

Szerkezetük: $[\alpha\text{-D-Glu}(1,6)\text{-D-Fru}]_n$, ahol $n=2\text{-}4$. A palatinózt (6. ábra) szacharózból állítják elő rögzített izomaltulóz-szintázzal. Az így előállított palatinóz diszacharid emészthető a vékonybélben, így nem alkalmazható prebiotikumként. Fontos tulajdonságuk, hogy kicsi a kariogén hatásuk. (Prapulla *et al.*, 2000)

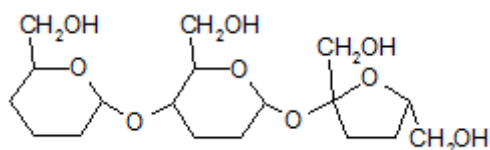
A palatinóz-oligoszacharidok azonban nem emészthetők és bifidogén hatásuk van. Az oligoszacharidok e típusát a palatinóz intermolekuláris dehidratációjával állítják elő (Prapulla *et al.*, 2000).



6. ábra: Palatinóz szerkezete

2.4.6 Glikozil-szacharóz

Szerkezete: α -D-Glu(1,4)- α -D-Glu(1,2)- β -D-Fru (7. ábra). Maltózból és szacharózból állítják elő ciklomaltodextrin-glukanotranszferáz enzimmel. A glikozil-szacharózt az élelmiszeriparban főként édesítőszerként használják, hozzávetőlegesen fele olyan édes, mint a szacharóz. Jelentősen csökkenti a fogszuvasodás kialakulásának esélyét, azonban nem bifidogén. Széles körben alkalmazzák az élelmiszeriparban a kristályosodás, a barnulási reakciók és a keményítő retrogradáció mértékének csökkentésére is (Crittenden & Playne, 1996; Mussatto & Mancilha, 2007).



7. ábra: A glikozil-szacharóz szerkezete

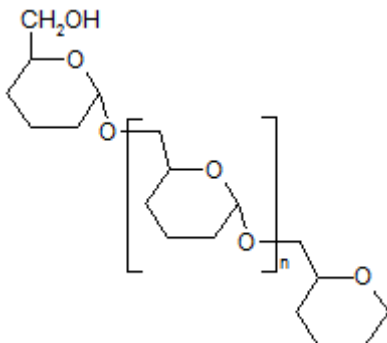
2.4.7 Malto-oligoszacharidok

Szerkezetük: $[\alpha$ -D-Glu(1,4)]_n, ahol $n=2-7$. Kereskedelmi célra (általánosan) keményítőből állítják elő a pullulanáz és az izoamiláz enzimmel, kombinálva különböző alfa-amilázok hidrolitikus aktivitásával. Különböző α -amilázok eltérő reakció specifitással rendelkeznek, és különböző lánchosszúságú malto-oligoszacharidokat eredményeznek. Megállapították (Prapulla *et al.*, 2000), hogy a malto-oligoszacharidok fogyasztásával javul a vastagbél állapota azáltal, hogy csökkentik a káros baktériumok (pl. a *C. perfringens* és az *Enterobacteriaceae* családba tartozó fajok) számát illetve aktivitását, bifidogén tulajdonságuk azonban még nem bizonyított.

2.4.8 Izomalto-oligoszacharidok

Szerkezetük: $[\alpha$ -D-Glu(1,6)]_n, ahol $n=2-5$ (8. ábra). Előállításuk kétlépéses enzimkatalízissel történik. Első lépésben a keményítő folyósítása történik α -amilázzal, majd a második lépésben

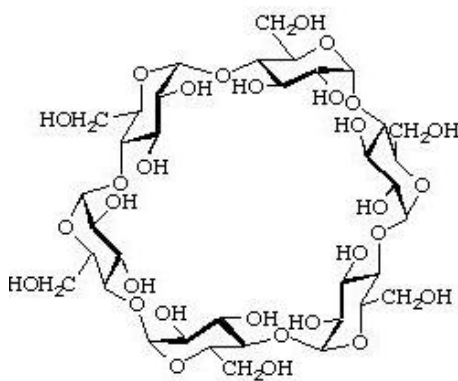
a folyósított keményítő maltózzá hidrolizálása megy végbe, amely átalakul izomalto-oligoszachariddá az alfa-glükozidáz enzim transzglukozidáz aktivitása révén. Az izomalto-oligoszacharidok bifidogének és prebiotikus élelmiszer összetevőként alkalmazhatók (Mussatto & Mancilha, 2007; Crittenden & Playne, 2009).



8. ábra: Izomalto-oligoszacharidok szerkezete

2.4.9 Ciklodextrinek

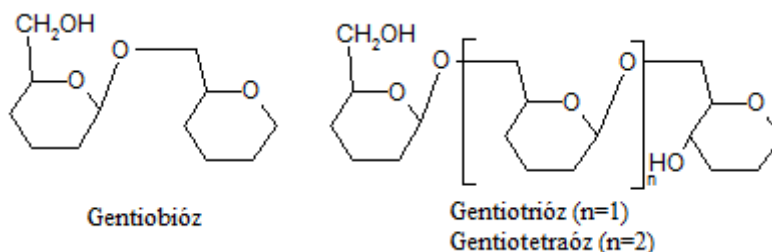
Szerkezet: $[\alpha\text{-D-Glu}(1,4)]_n$, ahol $n=6\text{-}12$ (9. ábra). Előállításuk keményítőből történik a ciklodextrin-glukanotranszferáz enzim segítségével. Az oligoszacharidok e csoportja képes különböző szerves vegyületekkel zárvány komplexeket képezni és hasznos változásokat előidézni a bezárt vegyület fizikai és kémiai tulajdonságaiban. A ciklodextrinek nem rendelkeznek bifidogén tulajdonsággal (Prapulla *et al.*, 2000; Delzenne, 2003).



9. ábra: 6 monoszacharid egységből felépülő ciklodextrin

2.4.10 Gentio-oligoszacharidok

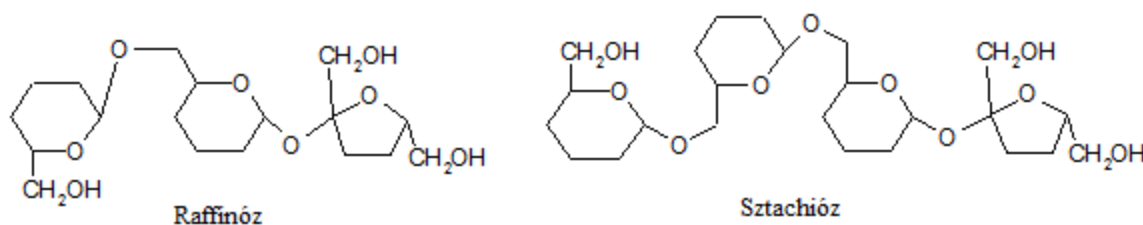
Szerkezetük: $[\beta\text{-D-Glu}(1,6)]_n$, ahol $n=2-5$ (10. ábra). Glükóz szirupból állítják elő enzimatis transzglükózilációval. E szénhidrátok elősegítik a bifidobaktériumok és a laktobacillusok növekedését (Crittenden & Playne, 1996; Oku & Nakamura, 2002).



10. ábra: Gentio-oligoszaccharidok kémiai szerkezete

2.4.11 Szójabab oligoszacharidok

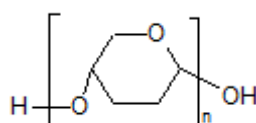
Szerkezetük: $[\alpha\text{-D-Gal}(1,6)]_n\text{-}\alpha\text{-D-Glu}(1,2)\text{-}\beta\text{-D-Fru}$, ahol $n=1-2$ (11. ábra). Közvetlenül a nyersanyagból vonják ki, a fehérjék és sók eltávolításával. Az oligoszacharidok e csoportjába tartozik a raffinóz és a sztachióz. A szójabab oligoszacharidok nem emészthetők, így elérnek a vastagbélbe és ott prebiotikumként funkcionálnak (Prapulla *et al.*, 2000; Crittenden & Playne, 2009).



11. ábra: Raffinóz és sztachióz szerkezete

2.4.12 Xilo-oligoszacharidok

Szerkezetük: $[\beta\text{-Xyl}(1,4)]_n$, ahol $n=2-9$ (12. ábra). A xilán kontrollált hidrolízisével állíthatók elő az endo-1,4- β -xilanáz enzim segítségével. A xilo-oligoszacharidok elősegítik a bifidobaktériumok növekedését a vastagbélben. Főleg prebiotikus italokban használják (Delzenne, 2003; Hirayama, 2002).



12. ábra: A xilo-oligoszacharidok szerkezete

2.5 Oligoszacharidok előállítása

2.5.1 Kémiai előállítás

A hagyományos oligoszacharid előállítás kémiai módszerekkel történik. A kémiai oligoszacharid szintézis azonban nagyon bonyolult, sok lépésből álló folyamat. Ennek oka, hogy a szénhidrátoknak számos hasonló reaktivitással rendelkező hidroxil csoportja van, így a régiószelektivitás elérése komplex feladat. Hátránya, hogy a reakció során izomer oligoszacharidok keletkeznek, drága vegyszerek szükségesek, hozama alacsony és a léptéknövelése nehezen megoldható.

Már számos biológiai jelentőséggel bíró szénhidrátot/oligoszacharidot állítottak elő kémiai szintézissel kutatási célra; pl. α -1,2-kötésű diszacharid származékokat, gliko-oligoszacharid mimetikumokat, melyek cukorszármazékokat tartalmaznak; azonban a nagyléptékű élelmiszer- illetve gyógyszer-célú előállításuk még nem kivitelezhető (Shetty *et al.*, 2006; Weijers *et al.*, 2008).

2.5.2 Enzimes előállítás

Az elmúlt években az oligoszacharidok enzimes előállítása vált számos kutató által választott módszerre (Canedo *et al.*, 2006; Chitradon *et al.*, 2000; Homann & Seibel, 2009). Az oligoszacharidok e módon történő szintézise során ugyanis kiküszöbölhetők a kémiai módszernél fellépő problémák, mint pl. az izomerek keletkezése, a reakciólépések nagy száma, a régió- és sztereospecifitás hiánya. További előnye, hogy a reakciókörülmények széles köre alkalmazható (Moracci *et al.*, 2001; Shetty *et al.*, 2006). Enzimek alkalmazásával akár egy lépéses reakcióval megoldható egyes oligoszacharidok előállítása.

Az oligoszacharid szintézist katalizáló enzimek előállítása elsősorban fermentációs úton történik. A fermentált enzimek különböző rögzítési módszerekkel újrahasznosíthatók, így gazdaságossá tehető felhasználásuk.

Az enzimek 2 fő típusát alkalmazzák oligoszacharid szintézis katalízisére: glikozil-transzferázok és glikozidázok (Palcic, 1999; Shetty *et al.*, 2006).

Az enzimes előállítás kapcsán érdemes megemlíteni egy magyar kutató nevét, Dékány Gyulát, aki nagy előrelépést tett e tudományterületen. Kidolgozott egy áttörést jelentő technológiát, mely során biokatalizátorok segítségével az anyatejben lévő létfontosságú oligoszacharidok (Human Milk Oligosaccharides, HMO) egy részét képes előállítani. 2004-

ben megalapította Glycom nevű cégét és a szintetizált HMO-k élelmiszeripari engedélyeztetése is folyamatban van.

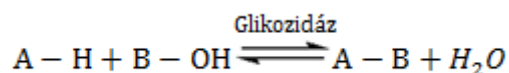
2.5.3 Glikozidázok

A glikozidázok másnéven glikozil hidrolázok (EC 3.2) az enzimek széleskörben alkalmazott csoportja, melyek a glikozidos kötések hasításáért felelősek. Mind az exo-, mind az endoglikozidázok fontos biológiai folyamatok résztvevői. A glikozidázok megtartó és invertáló tulajdonságuk alapján is megkülönböztethetők, attól függően, hogy a donor molekula anomer kötésének sztereokémiája változatlan marad ($\alpha \rightarrow \alpha$, $\beta \rightarrow \beta$) vagy invertálódik ($\alpha \rightarrow \beta$). A megtartó enzimek katalitikus mechanizmusát először Koshland (1953) írta le, mely a mai napig elfogadott.

A glikozidázok a kutatók körében rendkívül népszerűek, mivel könnyen elérhetők (vírusok, mikroorganizmusok, növényi és állati sejtek), ellenállóak különböző szerves oldószerekkel szemben, valamint a reakcióhoz nem igényelnek kofaktorokat. Hátrányuk, hogy alkalmazásukkal alacsony termékhozam érhető el. Ennek kiküszöbölésére mutáns glikozidázokat, más néven glikoszintázokat hoznak létre. További hátrányuk, hogy az általuk katalizált glikozil transzfer reakciók során régióizomerek keletkezhetnek (az akceptor molekula szerkezetétől függően), ami problémát okozhat a termék tisztításánál (Palcic, 1999; Moracci *et al.*, 2001).

2.5.3.1 Reverz hidrolízis

A glikozidázok képesek a glikozidos kötések hasítására és létrehozására is. A reverz hidrolízis egy termodinamikailag kontrollált reakció, amely a glikozid hidrolízis ellentétes irányú megfordítását jelenti. A reverz hidrolízis sémája a 13. ábrán látható, ahol A és B glikozil egységeknek felelnek meg.



13. ábra: Reverz hidrolízis reakció (Monsan & Paul, 1995)

1. táblázat: Reverz hidrolízisre használható enzimek és termékeik

(Shetty *et al.*, 2007)

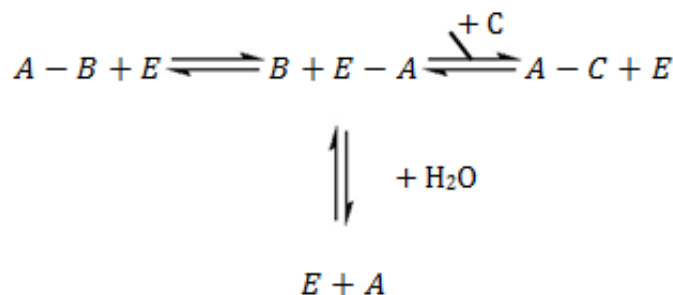
Enzim	Eredet	Termék
α -mannozidáz	mandula liszt	$\alpha(1,2)$, $\alpha(1,3)$ kötésű mannóz diszacharidok
α -mannozidáz	<i>Aspergillus niger</i>	$\alpha(1,2)$, $\alpha(1,3)$ és $\alpha(1,6)$ kötésű di- és triszacharidok
1,2- α -mannozidáz	<i>Aspergillus phoenicis</i>	$\alpha(1,2)$ kötésű mannobióz és mannotrióz
1,6- α -mannozidáz	<i>Aspergillus phoenicis</i>	$\alpha(1,6)$ kötésű mannobióz
α -glükózidáz	<i>B. stearothermophilus</i>	izomaltóz, nigeróz, maltóz és kojibóz

A célból, hogy a reakció egyensúlyát a terméképzés irányába fordítsák, különböző módszereket alkalmaznak. Az egyik legelterjedtebb módszer a hidrolízis termék (pl. monoszacharidok) koncentrációjának (70-80%-ra) növelése. A hőmérséklet növelésével (50-60 °C-ra) szintén gyorsítható a reakció végbemenetele. A módszer előnye az egyszerűség. Mind homo-, mind hetero-oligoaszacharidok szintézise lehetséges.

Reverz reakcióval már nagy hatékonysággal állítottak elő manno-oligoszacharidokat α -mannozidáz enzim segítségével. Az 1. táblázatban a reverz hidrolízisre használt enzimeket mutatom be.

2.5.3.2 Transzglykoziláció

A hidrolízis olyan transzfer reakció, amelynél a végső akceptor a víz. Ezekben a reakciókban gyakran jelenik meg egy kovalens kötésű enzim-szubsztrátum intermedier. Ez az intermedier teszi lehetővé, hogy a glikozidáz enzimeket transzfer reakciók katalízisére használják. A transzfer reakcióban az enzim egy glikozid származékról glikozil egységet szállít egy hidroxil csoportot tartalmazó akceptor molekulára. A glikozidázok által katalizált transzglykozilációt a 14. ábra mutatja be, ahol A-B a glikozid donor, E a glikozidáz és C az akceptor molekula.



14. ábra: Transzglykozilációs reakció (Monsan & Paul, 1995)

Ebben a kinetikailag kontrollált reakcióban a keletkezett A-C termék későbbi lehetséges szubsztrátuma a glikozidáz enzimnek. A végső hozam fokozható a donor-akceptor koncentráció növelésével, a vízaktivitás csökkentésével, a végső termék reakcióközegeből történő eltávolításával illetve a megfelelő akceptor molekula kiválasztásával. Továbbá megfelelő szerkezetű akceptor molekula alkalmazásával befolyásolható a keletkezett termék glikozidos kötésének típusa is.

A legtöbb esetben a glikohidrolázok által katalizált transzfer reakciót alkalmazzák oligoszacharid előállításra, mivel ennek sebessége és hozama nagyobb a reverz hidrolízishez képest. Néhány példát a hidroláz enzimek transzglykozilációs alkalmazásaira 2. táblázatban tüntetnek fel.

2. táblázat: Példák hidroláz enzimek által katalizált (transzglykozilációs) oligoszacharid szintézisre (Shetty *et al.*, 2006)

Enzim	Eredet	Donor	Akceptor	Termék
N-acetilhexoaminidáz	<i>A. oryzae</i>	p-NP-β-GluNAc	GalNAc	β-GluNAc-(1,6)-GalNAc
		p-NP-β-GalNAc	GalNAc	β-GalNAc-(1,6)-GalNAc
β-galaktozidáz	<i>B. circulans</i>	p-NP-β-Gal	β-GluNAc-(1,6)-GalNAc	β-Gal-(1,4)-β-Gal-(1,4)-β-GluNAc-(1,6)-GalNAc
β-galaktozidáz	Sertés máj	o-NP-β-Gal	p-NP-α/β-Gal/	β-Gal-(1,6)-α/β-Gal-pNP
			GluNAc/GalNAc	β-Gal-(1,6)-α/β-GalNAc-pNP
β-galaktozidáz	<i>A. oryzae</i>	o-NP-β-Gal	Xilóz	Galaktozil-xilóz
			Etilén-glikol	Galaktozil-etilén-glikol

2.5.4 Glikozil-transzferázok

A glikozil-transzferázok monoszacharidok sztereo- és régióspecifikus átvitelét katalizálják egy donor szubsztrátum molekuláról egy akceptor szubsztrátumra. *In vivo* ezek az enzimek felelősek a sejtfelszíni glikokonjugátumok szintéziséért. Jelenleg 60 családba sorolják az enzimek e csoportját Coutinho és Henrissat (1999) által felállított szekvencia szerinti besorolás alapján. Jellemzésük az átvitt monoszacharid egység illetve az akceptor specifitásuk szerint történik. A régió- és sztereospecifitásuk, a magas hozam, a nagyfokú akceptor specifitásuk miatt széleskörben alkalmazzák oligoszacharidok előállítására (Shetty *et al.*, 2006). Működésüket tekintve megkülönböztetünk (a glikozidázokhoz hasonlóan) megtartó és invertáló enzimeket.

A glikozil-transzferázok által katalizált reakciókban donor molekulák a következők lehetnek:

- aktivált szénhidrátok (nukleozidcukrok), melyeket nukleozid mono- és difoszfátok (CMP, UDP, GDP, TDP) hozzáadásával állítanak elő (Leloir transzferázok),
- cukorfoszfátok, melyeket direkt foszforilációval hoznak létre (non-Leloir transzferázok) illetve
- nem aktivált szénhidrátok (non-Leloir transzferázok), pl. szacharóz és keményítő származékai (Weijers *et al.*, 2008).

A Leloir és non-Leloir típusú glikozil-transzferázokat a következőkben mutatom be részletesen.

2.5.4.1 Non-Leloir glikoziltranszferázok

2.5.4.1.1 Foszforilázok

Azokat a non-Leloir glikozil-transzferázokat, amelyek donor molekulája foszforilált glikozil, foszforilázoknak nevezzük. Amennyiben víz nem vesz részt a reakcióban és a glikozil-foszfát kötési energiája alacsony, ez a transzfer reakció reverzibilis. A reakció végbemehet az anomer szénatom inverziójával és megtartásával is. A foszforilázok szubsztrátumai lehetnek α - és β -glikozidok, oligo- és poliszacharidok.

Eddig 14 foszforilázról számoltak be. A foszforilázok többsége a glükózil-foszforilázok családjába tartozik, amelyek a glükóz-1-foszfát, akceptor glikozidok (glikozil-glükózidázok számára) és szervesen foszfátok reverzibilis konverzióját katalizálják. A foszforilázok mindegyike nagy specifitást mutat a donor szubsztrátum tekintetében. Ennek ellenére az oligoszacharidok széles körét képesek előállítani, mivel kevésbé specifikusak az akceptor

molekulára. Egyes prokarióta eredetű glikozil-transzferázok donor molekulái lehetnek mono- és difosfolipidek (Weijers *et al.*, 2008).

2.5.4.1.2 Non-Leloir transzferázok- (nem aktivált) szacharóz szubsztrátum

A non-Leloir glikozil-transzferázok másik csoportja a szacharózt képes hasznosítani, ami egy széles körben alkalmazott (nem aktivált) szubsztrátum glikozil donáció esetében. Mivel a szacharóz esetében csak fruktóz vagy glükóz molekula átvitele lehetséges, ezért a non-Leloir transzferázok e csoportját (az átvitt monoszacharid egység alapján) glükozil-transzferázoknak (glükánszukrázoknak) vagy fruktozil-transzferázoknak nevezzük.

A glükozil-transzferázok aktív centruma nagyfokú specifitást mutat a szacharózzal szemben, ezért szacharóz analógok nem vehetnek részt szubsztrátumként a reakcióban (Weijers *et al.*, 2008). E tulajdonságuk korlátozza oligoszacharid szintézisre való alkalmazásukat. A glükozil-transzferázok által katalizált nem emészhető, prebiotikus tulajdonsággal rendelkező oligoszacharid előállítás azonban már publikálták (Plou *et al.*, 2002).

A szacharózt hasznosító non-Leloir enzimek másik típusa a fruktozil-transzferázok, amelyek a szacharóz molekula fruktozil részének átvitelét katalizálják glükóz felszabadításával. A fruktozil-transzferázok (a glükozil-transzferázokhoz képest) enyhébb szubsztrátum specifitást mutatnak (Weijers *et al.*, 2008).

2.5.4.1.3 Non-Leloir transzferázok- (nem aktivált) keményítő származék szubsztrátum

A nem aktivált keményítő származék szubsztrátum a ciklodextrin-glükano-transzferáz (CGTáz) glikozil donorja. Ez az enzim a keményítő és a dextrin α 1,4 glikozidos kötéseit hasítja, mellyel egyidejűleg a redukáló véget a nem redukáló véghez kapcsolja új glikozidos kötést létrehozva. Az így szintetizált termékek a 6, 7 vagy 8 glükóz egységből álló, α 1,4-es kötésű ciklikus oligoszacharidok, melyeket α , β vagy γ ciklodextrineknek neveznek.

A CGTázok mikrobiális eredetű (főként *Bacillus* fajok által termelt) extracelluláris enzimek. A ciklodextrin képzésben a CGTázoknak nagyobb affinitása van diszacharidokra, mint monoszacharidokra, tehát az akceptor kötőhelye legalább 2 glükopiranoz egységet képes felismerni. Különböző diszacharidok, mint az izomaltóz, gentiobióz, turanoz, maltulóz, izomaltulóz, cellobióz és a szacharóz lehetséges akceptorai az enzimnek oligoszacharid előállítása során, míg a trehalóz és a melibióz (melyeknek szintén van glükóz része) nem.

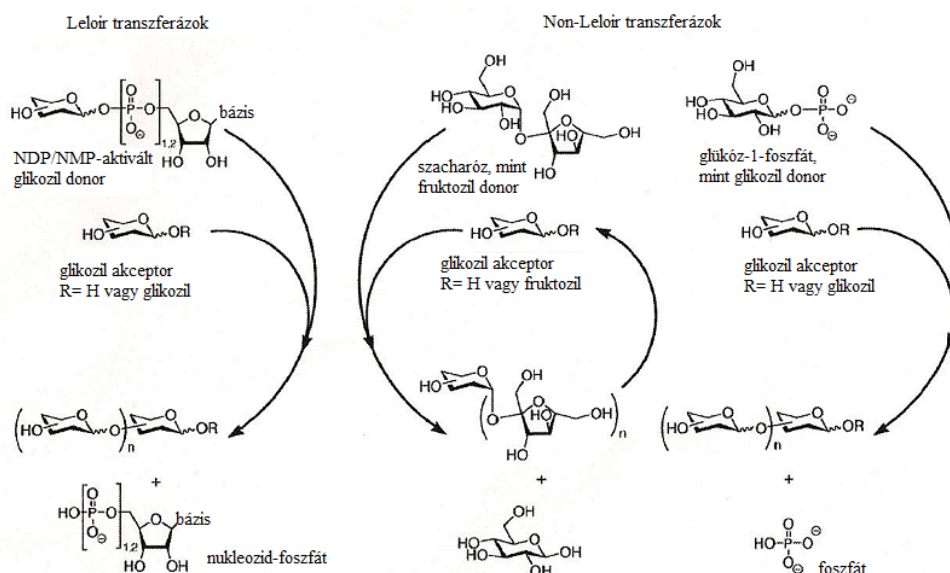
A non-Leloir enzimek nagy biotechnológiai potenciállal rendelkeznek, mivel nem igényelnek drága aktivált szubsztrátumokat. Felismerték azonban, hogy mellékreakcióként hidrolízis is felléphet, amely akadályozza az enzimek e típusának teljes kiaknázását (Weijers *et al.*, 2008).

2.5.4.2 Leloir transzferázok

A Leloir típusú glikozil transzferázok felelősek az emlős szervezetekben a legtöbb sejtfelszíni glikokonjugátum illetve a növények, gombák és baktériumok sejtfalában található poliszacharidok szintéziséért. Az általuk katalizált reakciókban nukleotidcukrok szerepelnek donor molekulaként. A Leloir transzferázok a befogadott szubsztrátum és a monoszacharid transzfer diverzitása alapján nagyon előnyösek, így ezek segítségével oligoszacharidok széles körét lehet előállítani.

A Leloir transzferázok esetében fehérje és lipid molekulák is szerepelhetnek glikozid akceptorként, ennek köszönhető a glikokonjugátumok hatalmas diverzitása a természetben (Weijers *et al.*, 2008).

A Leloir és a non-Leloir reakciókat a 15. ábrán szemléltetem.



15. ábra: A Leloir és non-Leloir glikoziltranszfer reakciók (Weijers *et al.*, 2008)

2.6 Pectinex ultra SP-L

A készítmény kereskedelmi forgalomban kapható, megfelel a FAO/WHO, JECFA és FFC által szabott követelményeknek, így az élelmiszergyártásban széles körben alkalmazzák. A készítményen forgalomba hozatal előtt steril szűrést végeznek így gyakorlatilag csíramentes. Főként gyümölcslevek gyártásánál használják léhozam növelése céljából. A specifikáció alapján a készítmény *Aspergillus aculeatus* eredetű pektin-transzeliminázt, poligalakturonázt és pektin-észterázt valamint kis mennyiségben cellulázt és hemicellulázt tartalmaz.

Az utóbbi időben számos publikáció jelent meg arról, hogy a Pectinex ultra egyéb aktivitásokkal is rendelkezik. Elsőként Hang és Woodams 1995-ban írta le, hogy az enzimekészítmény fruktozil-transzferáz enzimet is tartalmaz, majd 1996-ban vizsgálták a transzfer aktivitását és megállapították a hőmérséklet (65 °C) és pH (5,0-6,0) optimumát. Később Ghazi és munkatársai (2007) tisztították és jellemezték a készítmény fruktozil-transzferáz enzimét. Meghatározták a tisztított enzim pH és hőmérséklet optimumát, a hő- és pH-stabilitását (pH 5,0-7,0, 60 °C), a kémiai stabilitását, kinetikai jellemzőit és szubsztrátum specifitását. Magyar kutatók is alkalmazták az enzimekészítményt frukto-oligoszacharidok előállítására. Csanádi és Sisak 2006-ban sikeresen rögzítette az enzimekészítményt Amberlite IRA900 Cl anioncserélő gyantára, melyet kombináltak az adszorbeált fehérjék közötti keresztkötéssel.

A Pectinex ultra β -galaktozidáz aktivitását először Del-Val és társai publikálták 2001-ben. Ők 6'-galaktozil-laktózt szintetizáltak az enzim segítségével. Később Aslan és Tanriseven 2007-ben kovalens kötéssel rögzítette a β -galaktozidáz enzimet Eupergit C hordozóra. Megállapították, hogy rögzítés során nem változik az enzim hőmérséklet és pH-optimuma, viszont nagyobb stabilitást mutat. 2009-ben Cobas-Cardelle és munkatársai különböző szénhidrát származékokat (galaktozil-glicerolt és digalaktozil-glicerolt) szintetizáltak a készítménnyel. Fernandez-Rodriguez és társai 2011-ben megállapították, hogy az enzim által katalizált galaktozil transzfer reakcióban lehetséges szubsztrátum a laktulóz.

Kutatómunkám során a Pectinex ultra enzimekészítménnyel végeztem további kísérleteket oligoszacharid előállítása céljából.

3 KÍSÉRLETI RÉSZ

3.1 Célkitűzések

Az utóbbi években egyre nagyobb figyelmet kapnak az oligoszacharidokkal kapcsolatos kutatások, mely előnyös tulajdonságuknak és kedvező fiziológiai jellemzőiknek köszönhető. Az intenzív fejlesztések eredményeként néhány kereskedelmi oligoszacharid (frukto-oligoszacharidok, galakto-oligoszacharidok) előállítására létezik jól kidolgozott enzimes szintézis módszer. Az elmúlt időszakban azonban egy új kutatási irányzat jelent meg, az úgy nevezett „tailor-made” (előre szabott) oligoszacharidok előállítása. Ezen oligoszacharidok előállítása előre megtervezett módon történik a felhasznált enzimek sztereo-és régióspecifitásának ismeretében.

Kutató munkám során a fent említett Pectinex ultra SP-L enzimmészítményt alkalmaztam új oligoszacharidok előállítására. E kereskedelmi enzimmészítménynek a fruktozil-transzferáz illetve β -galaktozidáz aktivitását már számos tanulmány bizonyította (Hang & Woodams 1996; Tanriseven & Aslan, 2005, 2007), azonban a szubsztrátum specifitásukkal kapcsolatos ismereteink még hiányosak.

Ennek keretében TDK munkám során az alábbi feladatokat fogalmaztam meg:

- a Pectinex ultra β -fruktofuranozidáz és β -galaktozidáz aktivitásának meghatározása,
- lehetséges biszubsztrátum rendszerek vizsgálata a Pectinexben található fruktozil-transzferáz és β -galaktozidáz enzimek akceptor specifitásának megismerése céljából,
- az optimális donor:akceptor arány meghatározása,
- a kezdeti szubsztrátum koncentráció hatása az transzferáz aktivitásra, optimális szénhidrát koncentráció meghatározása

3.2 Kísérleti hely

A TDK munkám kutatásait a Budapesti Corvinus Egyetem Sör- és Szeszipari Tanszékének laboratóriumaiban végeztem.

3.3 Anyagok és módszerek

3.3.1 Felhasznált anyagok

- Enzimb készítmény: *Aspergillus aculeatus* eredetű Pectinex ultra SP-L nevű enzimb készítmény (P2611, Sigma-Aldrich)
- Alkalmazott szénhidrátok: szacharóz, laktóz, glükóz, fruktóz, galaktóz, maltóz, xilóz, mannóz (VWR)
- pH beállítása Sørensen-féle foszfát pufferrel pH5,5:
 - Törzsoldatok:
 - 1/15 M KH_2PO_4 oldat: 9,078 g/l
 - 1/15 M Na_2HPO_4 oldat: 11,876 g/l
 - pH5,5 beállításához szükséges arány:
 - 96,1 Vol% KH_2PO_4 oldat
 - 3,9 Vol% Na_2HPO_4 oldat

3.3.2 Alkalmazott módszerek

3.3.2.1 Enzimaktivitás meghatározása

A Pectinex ultra enzimb készítmény hidrolitikus aktivitásainak megállapítása a reakció során felszabaduló glükóz mennyiségének meghatározása alapján történt. A vizsgálatot 30 percen keresztül 2 ml térfogatban, 20 g/100 ml szubsztrátum koncentrációnál, pH=5,5-n hajtottam végre. A reakciót 40 µl enzim hozzáadásával indítottam el. 5 percenként 100 µl mintát vettem és 10 perces forralással állítottam le az enzimes reakciót. A β-galaktozidáz aktivitás meghatározása esetén laktózt, a β-frukto-furanozidáz esetén szacharózt használtam szubsztrátumként. A felszabaduló glükóz mennyiségét HPLC-s technikával határoztam meg.

(Egy enzim egység az az enzimmennyiség, amely percenként 1 µmol glükózt szabadít fel.)

3.3.2.2 Biokonverzió megvalósítása

Az oligoszacharid szintézist 5 ml térfogatú szubsztrátum oldatban vizsgáltam, a reakcióhoz szükséges hőmérsékletet (60 °C) vízfürdő segítségével biztosítottam, a pH=5,5-t Sørensen pufferrel állítottam be. A reakciót 0,5 U/ml β -galaktozidáz vagy 0,01 U/ml β -fruktofuranozidáz aktivitású enzim mennyiséggel indítottam. A biokonverzió során bizonyos időközönként mintát vettem, majd 10 percig forraltam a reakció leállítása céljából. A szénhidrátok mennyiségének alakulását HPLC-s technikával követtem nyomon. A szubsztrátum arány hatását 1:9-9:1 arányoknál, az összes szénhidrátkoncentráció hatását 10-70 g/100 ml tartományban vizsgáltam.

3.3.2.3 Szénhidrátok minőségi és mennyiségi meghatározása HPLC-s technikával

Készülék: (16. ábra)

- Thermo Scientific Corporation Surveyor HPLC
- Surveyor négy csatornás pumpa
- Surveyor automata mintaadagoló
- Surveyor RI detektor
- Oszlop: Aminex HPX-87H oszlop (Bio-Rad)
 - Méret: 300*7,8 mm
 - Töltet: polimer-alapú mátrix (polisztirol-divinilbenzol)
 - Elválasztás elve: a méretkizárásos- és a ligandumcsere-kromatográfia kombinációja. Oligoszacharidok elválasztása esetén a méretkizárás az elsődleges mechanizmus.
 - Izokratikus áramlás: az Aminex oszlopok eluálása desztillált vízzel vagy hígított szerves savval történik.
 - Az Aminex HPX-87H típus elsősorban szénhidrátok, szerves savak, illékony zsírsavak, rövidlancú zsírsavak, alkoholok, ketonok és számos semleges anyagcsere-melléktermék kimutatására szolgál.



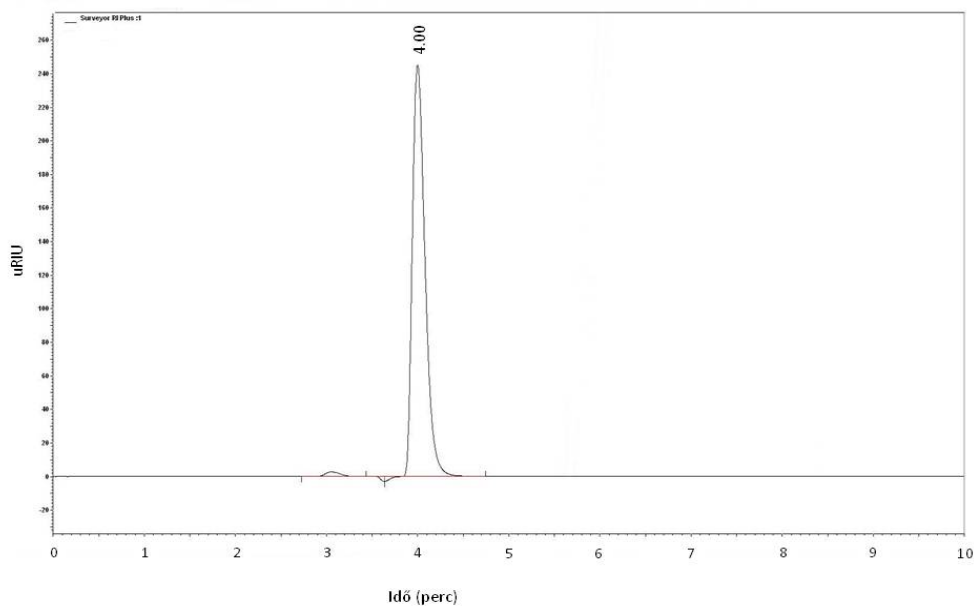
16. ábra: Surveyor HPLC berendezés

Futtatás paramétereit:

- Futtatás ideje: 20 perc
- Mozgó fázis: 0,005n H_2SO_4
- Minta mennyisége az oldat töménységétől függően 3-25 μl
- Detektor hőmérséklete: 45°C
- Oszlop hőmérséklete: 45°C
- Áramlási sebesség: 0,6 ml/min

Oligoszacharidok minőségi és mennyiségi meghatározása:

Az oligoszacharidok mennyiségi meghatározására különböző standard-eket készítettem. A triszacharidok esetén különböző koncentrációjú maltotrióz, raffinóz és meleztóz oldatokat alkalmaztam, majd a kapott kromatogram területe és a koncentráció segítségével kalibrációs egyeneseket szerkesztettem. Megállapítottam, hogy a különböző összetételű DP₃-as oligoszacharidok koncentráció-terület aránya és retenciós ideje megegyezik ($R_t=4,00$ min). Ezek alapján a módszer segítségével a reakciók során keletkezett összes DP₃ koncentrációt tudtam meghatározni. A 17. ábrán a raffinóz kromatogramja látható.



17. ábra: A raffinóz kromatogramja

3.3.2.4 TLC analízis

A szénhidrátok minőségi kimutatását vékonyréteg elválasztással is elvégeztem. Állófázisként TLC “szilika gél 60”-nal fedett alumínium lemezeket (20*20 cm) használtam (VWR). Mozgófázisként kloroform/ecetsav/víz 30/35/5 arányú elegyét alkalmaztam (Ugrinovits, 1980). A színező anyag a következő összetevőkből állt: 3 g/100 ml N-(1-naftil)-etilén-diamin-dihidroklorid, 5 (V/V)% H₂SO₄, 94,7 (V/V)% metanol (Bounias, 1980). Az elválasztáshoz a megfelelően hígított (0,1-0,5 g/100 ml koncentrációjú) mintákból 2 µl-nyi mennyiséget csepegtettem a TLC lemezre. A futtatási ideje 2 óra volt. A felhasznált szénhidrátok retenciós faktorát a 3. táblázatban mutatom be.

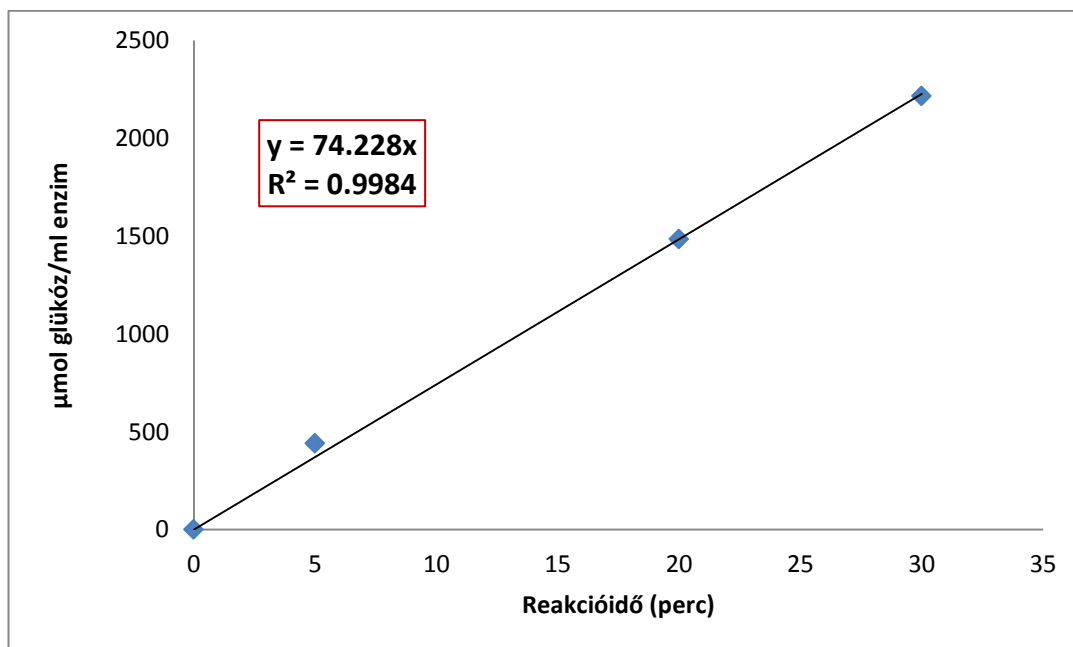
3. táblázat: Felhasznált szénhidrátok retenciós faktora

Szénhhidrát	Retenciós factor (R _f)
Fruktóz	0,39
Glükóz	0,33
Szacharóz	0,29
Maltóz	0,25
Laktóz	0,17

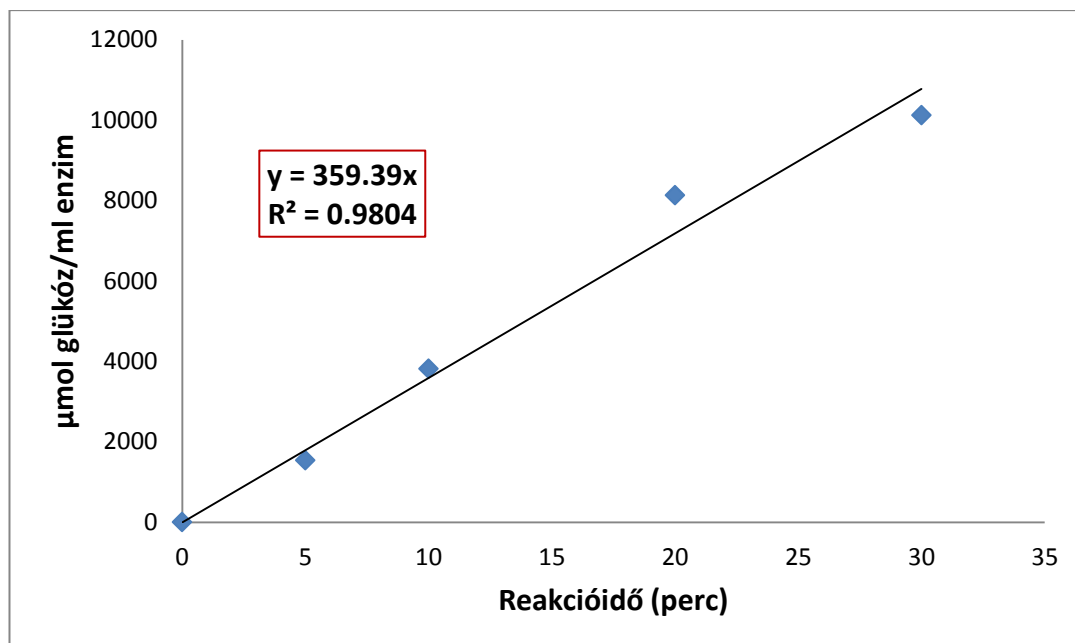
3.4 Eredmények és értékelésük

3.4.1 *Pectinex ultra* enzimmészítmény invertáz és β -galaktozidáz aktivitása

Kutatómunkám első lépéseként meghatároztam a *Pectinex ultra* invertáz illetve β -galaktozidáz aktivitását. A két hidrolitikus aktivitás vizsgálatát azonos körülmények között hajtottam végre (60 °C, pH 5,5). Az aktivitásvizsgálat paramétereit más kutatók (Hang & Woodams, 1996) által (a *Pectinex ultra* fruktozil-transzferáz enziménél) megállapított optimumra állítottam be. A hidrolízis termék koncentráció meghatározására HPLC technikát alkalmaztam. A glükóz koncentráció változását az idő függvényében a 18. és a 19. ábrákon szemléltettem. Megállapítottam, hogy 1 ml enzimmészítmény 1 perc alatt laktózból 359 μ mol, szacharózból 77 μ mol glükózt szabadít fel. E vizsgálat eredményével alátámasztottam, hogy az alkalmazott enzimmészítmény tartalmaz szacharózt illetve laktózt bontó enzimeket, így kutatásomat folytathattam e két enzim transzfer aktivitásának vizsgálatával.



18. ábra: A *Pectinex ultra* β -frukto-furanozidáz aktivitása

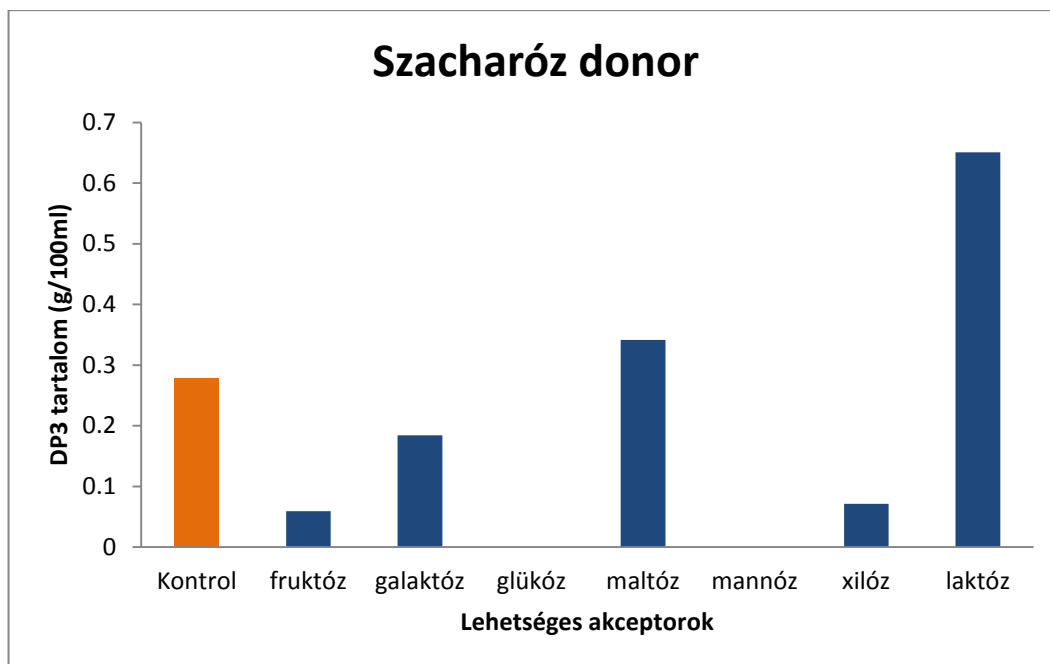


19. ábra: A Pectinex ultra β-galaktozidáz aktivitása

3.4.2 *Különböző biszubsztrát rendszerek hatása a Pectinex ultra glikozil-transzferáz aktivitására*

A Pectinex ultra transzfruktozil és transzgalaktozil aktivitását már számos tanulmány igazolta (Aslan & Tanriseven, 2005, 2007, Ghazi *et al.*, 2007 Rodriguez-fernandez *et al.*, 2011). Kísérleti munkám során azonban azt tartottam fontosnak, hogy a transzferáz aktivitásokat különböző donor és akceptor molekulák jelenlétében (maltóz, fruktóz, glükóz, mannóz, xilóz, galaktóz, szacharóz és laktóz) vizsgáljam.

A reakciót 10 g/100ml szénhidrát-koncentrációval indítottam, amelyben a donor és akceptor aránya 1:1 volt. Kontrol vizsgálatokat is végeztem, amelyhez (a transzfruktozil aktivitás esetén) szacharózt és (a transzgalaktozil aktivitás esetén) laktózt használtam szubsztrátumként. A biokonverző 4. napján kapott eredményeket az 20. és 21. ábrán mutatom be.



20. ábra: Oligoszacharid hozam szacharóz donor és különböző akceptor molekulák esetén a biokonverzió 4. napján

A 20. ábrán látható, hogy szacharóz maltózzal illetve laktózzal történő kombinálásával magasabb oligoszacharid hozamot értem el a kontrolhoz képest, amely csak szacharózt tartalmazott.

Maltóz jelenlétében 0,34 g/100ml oligoszacharid tartalmat detektáltunk, amely 22%-kal nagyobb a kontrol mintában mért DP₃ koncentrációhoz képest. Mivel ugyanazt a szénhidrát koncentrációt alkalmaztuk (és a vízáktivítást nem csökkentettük), arra tudtunk következtetni, hogy a Pectinex ultra fruktozil-transzferáz enzime képes a szacharóz molekula fruktóz részét maltóz molekulára is szállítani, így szintetizálva fruktozil-maltózt. Ghazi és munkatársai 2007-ben vizsgálták az *Aspergillus aculeatus* fruktoziltranszferáz enzimének szubsztrátum specifitását. Megállapították, hogy az enzim lehetséges szubsztrátuma a szacharóz, raffinóz, kesztóz és a nisztóz. A turanóz, cellobióz, melibióz, leukróz, metil- α -D-glükopiranoz nem szubsztrátjai az enzimnek. A lehetséges szubsztrátumai mind β -1,2-es kötésű fruktózt tartalmaznak, amely felismerő hely lehet az enzim számára. Eredményeikre alapozva, a maltóz nem lehet szubsztrátuma a Pectinex ultra transzfruktoziláz enzimének. A specifikáció alapján a készítmény főleg pektin-transzeliminázt, poligalakturonázt és pektin-észterázt, valamint kis mennyiségben cellulázt, hemicellulázt tartalmaz, így jelen lehet a készítményben β -glükozidáz is.

Kutatómunkám e szakaszában a fruktozil-transzferáz mellett a galaktozil-transzferáz aktivitást is vizsgáltam (21. ábra) különböző biszubsztrátum rendszerekben.



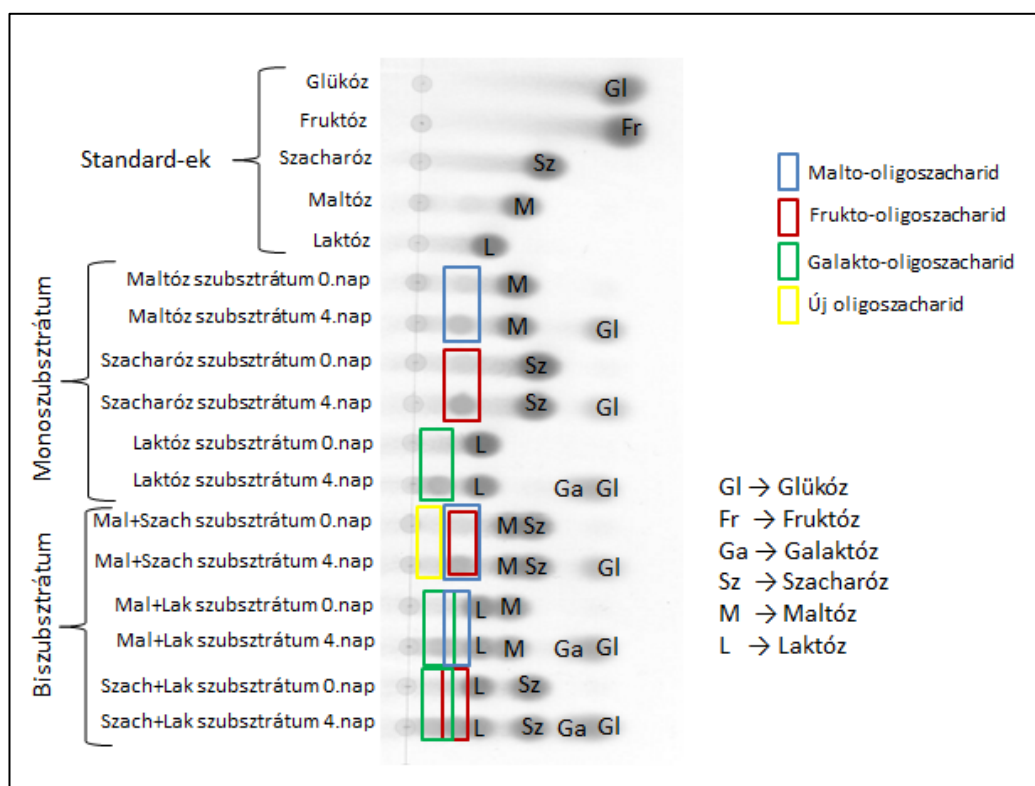
21. ábra: Oligoszacharid hozam laktóz donor és különböző akceptor molekulák esetén a biokonverzió 4. napján

Érdekes, hogy laktóz szacharóz kombinációja esetén az elért DP₃ koncentráció (0,65 g/100ml) nagyobb volt a szacharóz kontrolhoz képest (233%) (20. ábra), de kevesebb volt a laktóz kontrolhoz képest (45%) (21. ábra). Ebből arra következtetek, hogy a szacharóz kontrolhoz képest mért nagy hozam nem egy új oligoszacharid szintézisének következménye, hanem a biokenverzió során (a β -galaktozidáz enzim párhuzamos működésének köszönhetően) szintetizálódott galakto-oligoszacharidok jelenlétének tudható be.

Az enzimekésítmény transzgalaktozidáz aktivitását Rodriguez-Fernandez és munkatársai 2011-ben vizsgálták laktóz és laktulóz szubsztrátumok esetében. Megállapították, hogy a triszacharid képzés laktulóz szubsztrátummal hatékonyabb volt. Esetemben maltóz-laktóz biszubsztrátum alkalmazásával 0,85 g/100ml oligoszacharid koncentrációt értem el, amely csupán 59%-a a laktóz kontrol minta esetében kapott DP₃ tartalomnak.

A transzfer reakció jobb megértése érdekében egyes szénhidrát kombinációkkal végrehajtott biokonverziók TLC analízisét is elvégeztem, melynek eredményét a 22.

ábrán mutatom be. Jól látható, hogy az általunk alkalmazott TLC módszer alkalmas monoszacharidok, diszacharidok és oligoszacharidok elválasztására.



**22. ábra: Mono- és biszubsztrát rendszerek biokonverziójának TLC képe
0. és 4. napon**

E TLC kép is bizonyítja, hogy az enzimmészítmény rendelkezik transzfruktozil illetve transzgalaktozil aktivitással. Ezt az mutatja, hogy mind szacharóz mind laktóz szubsztrátum esetében a biokonverzió 4. napján a monoszacharidok mellett oligoszacharidok is detektálhatók. Szacharóz szubsztrátum esetén kapott oligoszacharidok retenciós faktora $R_F = 0,08$, laktóz szubsztrátum esetén szintetizált oligoszacharidok retenciója $R_F = 0,04$.

Új eredménynek tartom, hogy maltóz szubsztrátum esetén is detektáltam kismértékű oligoszacharid képzést. Véleményem szerint ez a Pectinex ultra maltáz vagy glükozidáz aktivitásának köszönhető, melyet eddig még nem bizonyítottak.

Maltóz-szacharóz biszubsztrátum esetén új oligoszacharidot mutattam ki, melynek retenciója ($R_F = 0,03$) különbözik a malto-oligoszacharidok ($R_F = 0,15$) és a frukto-oligoszacharidok ($R_F = 0,08$) retenciójától.

A HPLC-s vizsgálat alapján triszacharidokat mutattam ki így arra következtetek, hogy a maltóz a transzfruktozil reakcióban vagy a szacharóz a transzglükózil reakcióban akceptorként szerepelhet.

Canedo és munkatársai 1998-ban *Bacillus subtilis* levanszukráz enzimével maltóz és szacharóz biszubsztrátumból maltozil-fruktózt állítottak elő. Egyes kutatók (Hellmuth *et al*, 2008; Homann *et al*, 2007; Beine, 2008) *Streptococcus oralis* eredetű glükánszukráz enzimet illetve *Bacillus subtilis* és *Bacillus megaterium* eredetű levanszukráz enzimet úgynevezett “tailor-made” (előre szabott) cukor analógok előállítására használták.

Eddigi eredményeim azt mutatják, hogy a Pectinex ultra SP-L enzimból készített készítmény képes a fruktóz molekula szacharózzal maltózzal történő átvitelére a levanszukráz (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*) mechanizmusához hasonlóan, vagy képes a glükózil-transzferre a maltóz molekuláról a szacharózra, ahogy a *Streptococcus oralis* eredetű glükánszukráz.

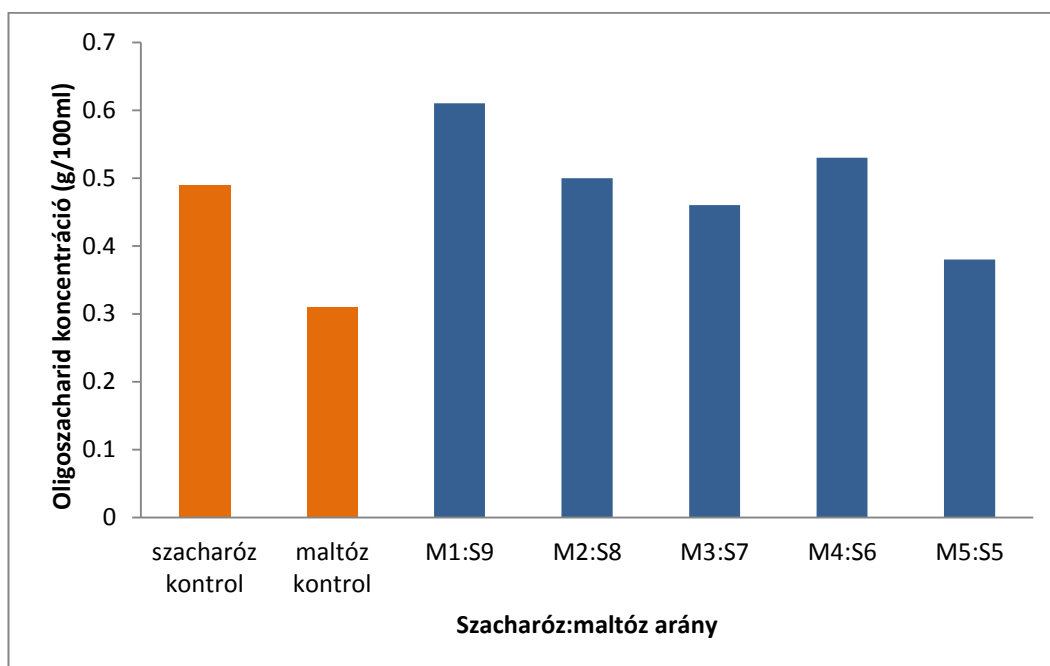
3.4.3 Szacharóz:maltóz arányának hatása a transzglükózil aktivitásra

Általánosan elfogadott tény, hogy az oligoszacharid hozam növelhető a donor:akceptor arány optimalizálásával. Az optimális arányt nagyjában meghatározza az alkalmazott enzim eredete illetve a transzfer reakcióban részt vevő donor és akceptor molekulák felépítése (Shetty *et al*, 2007).

A fent említett eredmények alapján a szacharóz és a maltóz különböző arányú kombinációinak az oligoszacharid szintézisre gyakorolt hatását vizsgáltam. A reakciót az előzőekhez hasonlóan pH5,5-n és 60 °C-on hajtottam végre, a szubsztrátum koncentrációt 20 g/100ml-re emeltem.

A kapott eredményeket a 23. ábra mutatja. Jól látható, hogy az elért oligoszacharid koncentrációk 0,31 g/100ml és 0,61 g/100 ml értékek között változtak. A legkisebb oligoszacharid tartalmat (0,31 g/100ml) maltóz monoszubsztrátum esetén kaptam, a legmagasabbat 10% maltóz és 90% szacharóz kombináció esetén. Szacharóz monoszubsztrátum esetén 0,49 g/100ml oligoszacharid koncentrációt detektáltam. Az általunk meghatározott optimális arány (M1:S9) egyezik Canedo és munkatársai (1999) által vizsgált levanszukráz enzim optimális maltóz:szacharóz arányával.

Esetünkben a 40% maltóz és 60% szacharóz tartalmú összetétel is jó eredményt mutatott (0,53 g/100ml).



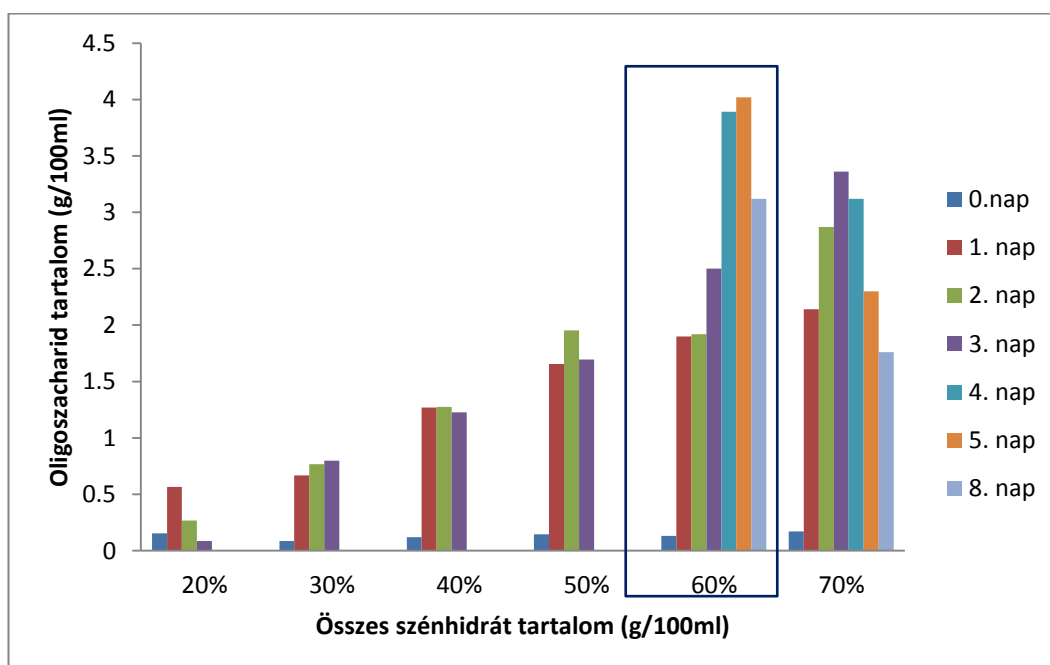
23. ábra: Oligoszacharid koncentráció a reakció 1. napján szacharóz és maltóz különböző arányú összetételénél, 20 g/100 ml összes szénhidrát koncentráció mellett (M: maltóz, S: szacharóz)

3.4.4 Szénhidrát tartalom hatása a glikozil-transzferáz aktivitásra

A szubsztrátum koncentráció az egyik legfontosabb tényezője a szintézis reakció hatékonysága szempontjából. Általában a nagy szubsztrátum koncentráció nagyobb glikozil-transzferáz aktivitást eredményez mind a reverz hidrolízis mind a transzglikolizis esetében. A nagy szubsztrátum tartalom ugyanis csökkenti a karbohidrolázok hidrolitikus hatását. Másik nagy előnye a nagy szubsztrátum koncentráció alkalmazásának, hogy védi az enzimet a hődenaturációtól (Crittenden & Playne, 1996, Shetty *et al.*, 2006).

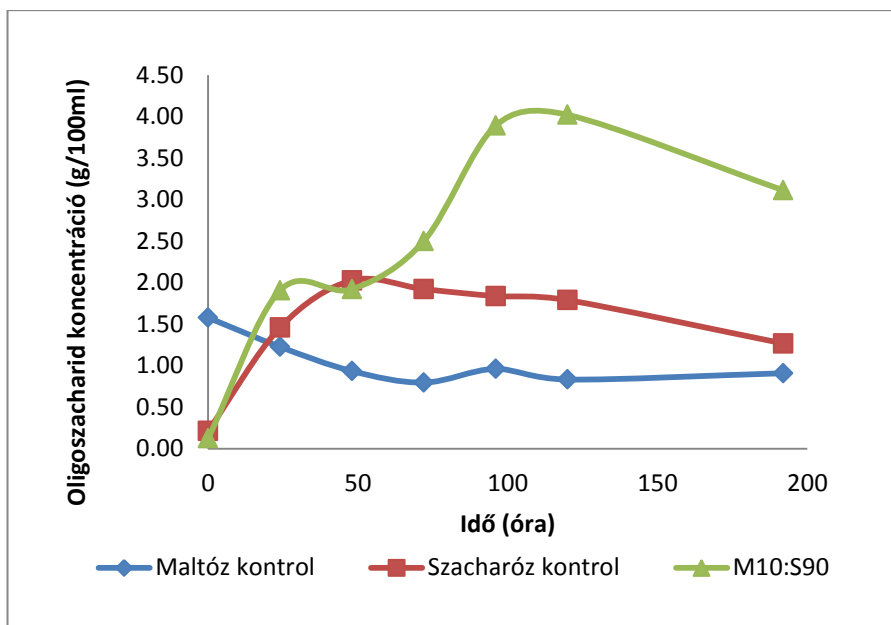
Az optimális szubsztrátum koncentráció meghatározására 20-70 g/100 ml tartományban vizsgáltam a biokonverziót. Az előző kísérletben elért eredmények alapján a maltóz:szacharóz 1:9 arányú összetételét alkalmaztam. Összehasonlítás céljából kontrol vizsgálatokat is végeztem, melyben monoszubsztrátumokat (maltózt és szacharózt) használtam kiinduló szénhidrátként.

A 24. ábrán megfigyelhető, hogy a maltóz és szacharóz együttes alkalmazása esetén az optimális szubsztrátum koncentráció 60 g/100 ml volt. Ebben az esetben 4,02 g/100 ml DP₃ képződött a szintézis reakcióban. Ezek az eredmények megegyeztek Hang és Woodams (1996) által közöltekkel. Az *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger* és *Aureobasidium pullulans* eredetű fruktozil-transzferázok optimális szubsztrátum koncentrációja szintén 55-60 g/100 ml intervallumban található. Ghazi és munkatársai (2007) tisztították a Pectinex ultra készítményben található fruktozil-transzferáz enzimet és szacharóz esetében vizsgálták a szubsztrátum koncentráció transzfer reakcióra gyakorolt hatását. Az ő esetükben szintén 60 g/100 ml körüli volt az optimum.



24. ábra: Összes szénhidráttartalom hatása az oligoszacharid szintézisre 1:9 arányú maltóz:szacharóz szubsztrátum esetén

A 25. ábrán az oligoszacharid tartalom változása látható 60 g/100 ml összes szénhidrát tartalomnál a maltóz-szacharóz 1:9 arányú keveréke és a kontrol minták esetében. Megállapítható, hogy maltóz hozzáadásával hozzávetőlegesen kétszeres DP₃-tartalmat értem el a szacharóz kontrolhoz képest.



25. ábra: Oligoszacharid tartalom alakulásának összehasonlítása 60 g/100ml összes szénhidráttartalom esetén a maltóz-szacharóz 1:9 arányú keveréke és a kontrol mintáknál

A 25. ábrán az is jól látható, hogy maltóz monszubsztrátum alkalmazásával nem figyelhető meg az oligoszacharid tartalom növekedése. A maltóz készítményben (melléktermékként) jelen lévő oligoszacharidok hidrolízise ment végbe a biokonverzió során. Ebből arra tudunk következtetni, hogy e szénhidrát koncentráció gátolja a Pectinex által katalizált glükóz-transzfert.

Véleményem szerint 60 g/100ml szénhidrát tartalom és a M1:S9 szubsztrátum arány alkalmazásával fruktozil-transzfer ment végbe, azaz a Pectinex ultra fruktozil-transzferáz enzime a szacharóz molekulákról fruktóz átvitelét katalizálta maltóz molekulákra.

4 ÖSSZEFOGLALÁS

Pectinex ultra SP-L kereskedelmi enzimmészítmény nemcsak galakturonáz, hanem invertáz és laktáz aktivitással is rendelkezik. Hidrolitikus aktivitása mellett azonban a transzferáz képességéről is megjelentek információk.

TDK kutatómunkámban az enzimmészítmény transzferáz aktivitását vizsgáltam, mely során a következő eredményeket értem el:

Megerősítettem az enzimmészítmény invertáz és laktáz aktivitását. Azt tapasztaltam, hogy a készítmény gyorsabban bontja le a laktózt, mint a szacharóz molekulát.

Megállapítottam, hogy a Pectinex ultra SP-L képes glikozil-transzfer reakciókat katalizálni különböző mono- és biszubsztrátum rendszerekben ezzel különböző oligoszacharidokat előállítva. Ez az enzimmészítmény fruktozil-transzferáz és galaktozil-transzferáz aktivitása mellett képes a maltózt hidrolizálni illetve képes glükózil-transzfer reakciót katalizálni maltóz szubsztrátum jelenlétében.

Maltóz:szacharóz biszubsztrátum esetében új típusú oligoszacharidot detektáltam, amely jól elkülöníthető volt (TLC módszerrel) az ismert frukto- és galakto-oligoszacharidoktól.

Megvizsgáltam a maltóz:szacharóz arányának hatását a glikozil-transzfer reakcióra. Megállapítottam, hogy a maltóz:szacharóz optimális aránya 1:9. Ezzel a kombinációval 0,61 g/100ml oligoszacharid koncentrációt értem el. Emellett a 4:6 arány alkalmazásával is jó oligoszacharid hozamot (0,53 g/100ml) mértem.

Kutatómunkám során fontosnak tartottam az optimális szénhidrát koncentráció meghatározását is, mely az egyik legfontosabb tényező a transzfer reakciókban. Maltóz szacharóz 1:9 arányú kombinációja esetén az optimális szubsztrátum arány 60 g/100 ml volt. Ebben az esetben 4,02 g/100 ml oligoszacharid koncentrációt értem el. Ez az érték duplája volt szacharóz kontrol mintában elért DP₃ tartalomhoz képest. E szénhidrát-koncentrációt alkalmazva maltóz esetében nem detektáltam oligoszacharid szintézist.

Eredményeim alapján arra tudok következtetni, hogy a maltóz:szacharóz 1:9 arányú kombinációjával, 60 g/100 ml kiinduló szénhidrát koncentrációt alkalmazva olyan fruktozil-transzfer reakció megy végbe, melyben a szacharóz mellett a maltóz is akzeptorként vesz részt így szintetizálva új oligoszacharidot, fruktozil-maltózt.

Elért eredményeim ígéretesnek tűnnek és utat nyithatnak új oligoszacharid szintézis technológia kidolgozására. Emellett eredményeim által mélyebb betekintés nyerhető a Pectinex ultra által katalizált transzfer reakciók jellegéről.

További célom más paraméterek vizsgálata (pl. pH, hőmérséklet, szerves oldószerek hatásának vizsgálata) a jobb oligoszacharid hozam eléréséhez, valamint a kapott oligoszacharid termékek tisztítása és szerkezetének meghatározása. Szintén céljaim között szerepel egy hatékony rögzítési technológia kidolgozása, amely segítségével folyamatos biokonverzió valósítható meg.

5 FELHASZNÁLT IRODALOM

- Antošová M., Polakovič M. (2001): Fructosyltransferases: The enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. *Chemical Papers*, 55: 350-358
- Aslan Y., Tanriseven A. (2007) Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce galactooligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45: 73-77
- Beine R., Moraru R., Nimtz M., Na'Amnieh S., Pawlowski A., Buchholz K., Seibel J. (2008): Synthesis of novel fructooligosaccharides by substrate and enzyme engineering. *Journal of Biotechnology*, 138: 33-41
- Bounias M. (1980) N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride as a new reagent for nanomole quantification of sugars on thin layer plates by a mathematical calibration process. *Analytical Biochemistry*, 106: 291-295
- Canedo M., Jimenez-Estrada M., Cassani J., López-Munguía A. (1999) Production of maltosylfructose (erlose) with levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 16: 475-485
- Caselato de Sousa V. M., dos Santos E. F., Sgarbieri V. C. (2011) The importance of prebiotics in functional foods and clinical practice. *Food and Nutrition Sciences*, 2: 133-144
- Chitradon L., Mahakhan P., Bucke C. (2000) Oligosaccharide synthesis by reversed catalysis using α -amylase from *Bacillus licheniformis*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10: 273-280
- Coutinho P. M., Henrissat B. (1999) Carbohydrate-active enzymes server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>
- Crittenden R. G., Playne M. J. (1996) Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology* 7: 353-361
- Crittenden R., Playne M. J. (2009) Prebiotics. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, ISBN 978-0-470-13544-0
- Csanádi Zs., Sisak Cs. (2006) Immobilization of Pectinex SP-L pectinase and its application to production of fructo-oligosaccharides. *Acta Alimentaria*, 35: 205-212
- Del-Val M. I., Hill Jr C. G., Jimenez-Barbero J., Otero C. (2001) Selective enzymatic synthesis of 6'-galactosyl lactose by Pectinex ultra SP in water. *Biotechnology Letters*, 23: 1921-1924

- Delzenne N. M. (2003) Oligosaccharides: state of art. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62: 177-182
- Fernandez-Rodriguez M., Cardelle –Cobas A., Villamiel M., Banga J. R. (2011) Detailed kinetic model describing new oligosaccharides synthesis using different β -galactosidases. *Journal of Biotechnology*, 153: 116-124
- Ghazi I., Fernandez-Arrajo L., Garcia-Arellano H., Ferrer M., Ballesteros A., Plou J. F. (2007) Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *Journal of Biotechnology*, 128: 204-211
- Gibson G. R., Rastall R. A. (2006) Prebiotics : development and application. ISBN-1 0: 0-470-0 2313-9
- Hang Y. D., Woodams E. E. (1995) Fructosyl-transferase activity of commercial enzyme preparations used in fruit juice processing. *Biotechnology Letters*, 17: 741-744
- Hang Y. D., Woodams E. E. (1996) Optimization of enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. *LWT- Food Science and Technology*, 29: 578-580
- Hellmuth H., Wittrock S., Kralj S., Dijkhuizen L., Hofer B., Seibel J. (2008): Engineering the glucanase GTFR enzyme reaction and glycosidic bond specificity: toward tailor-made polymer and oligosaccharide products. *Biochemistry*, 47: 6678–6684
- Hirayama M. (2002) Novel physiological functions of oligosaccharides. *Pure and Applied Chemistry*, 74: 1271-1279
- Homann A., Seibel J. (2009): Towards tailor-made oligosaccharides-chemoenzymatic approaches by enzyme and substrate engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83: 209-216
- Koshland D.E. (1953) Stereochemistry and mechanism of enzymatic reactions. *Biological Reviews*, 28: 416-436
- Loo J. V., Cummings J., Delzenne N., Englyst H., Franck A., Hopkins M., Kok N., Macfarlane G., Newton D., Quigley M., Roberfroid M., Vliet T., van den Heuvel E. (1999) Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095. *British Journal of Nutrition*, 81: 121–132
- Moracci M., Trincone A., Rossi M. (2001) Glycosynthases: new enzymes for oligosaccharide synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11: 155-163

- Mussatto S. I., Mancilha I. M. (2007) Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polimers*, 68: 587-597
- Perugino G., Trincone A., Rossi M., Moracci M. (2004) Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. *Trends in Biotechnology*, 22: 31-37
- Plou F.J., Martin M.T., Gomez de Segura A., Alcalde M., Ballestoros A. (2002) Glucosyl-transferasis acting on starch or sucrose for synthesis of oligosaccharides, *Canadien Journal of Chemistry*, 80: 743-752
- Prapulla S. G., Subhaprada V., Karanth N. G. (2000) Microbial production of oligosaccharides: A review. *Advances in Applied Microbiology*, 47: 299-343
- Qiang X., YongLie C., QianBing W. (2009) Health benefit application of functional oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 77: 435–441
- Shetty K., Paliyath G., Pometto A. L., Levin R. E. (2006) Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides: Progress and Recent Trends. *Functional Foods and Biotechnology* ISBN-10:1-4200-0772-6; 473-500
- Tanriseven A., Aslan Y. (2005) Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 550-554
- Urginovits M. (1980) Zuckeranalyse mit GC, HPLC, DC und enzymatisch- Ein Vergleich der Methoden. *Chormatographia* 13: 386-394
- Weijers C.A.G.M., Frassen M.C.R., Visser G.M. (2008) Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 26: 436-456
- Yun J. W., Jung . H., Oh J. W., Lee J. H. (1990) Semibatch production of fructo-oligosaccharides from sucrose by immobilized cells *Aerobasidium pullulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24: 299- 308

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni konzulenseimnek Dr. Nguyen Duc Quang egyetemi docensnek és Styevkó Gabriella PhD hallgatónak a TDK munkám során nyújtott segítséget.

Továbbá szeretném megköszönni a TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0005 és a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0023, valamint TECH_09-A3-2009-0194 projekteknek kutatómunkám anyagi háttérének biztosítását.