

Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Sör- és Szeszipari Tanszék



Pectinex ultra enzimkészítmény rögzítése és rögzített β -galaktozidáz enzimének vizsgálata

TDK dolgozat

Ta Phuong Linh
II. évfolyam, MSc hallgató

Témavezetők:

Nguyen Duc Vuong PhD hallgató
Styevkó Gabriella egyetemi tanársegéd
Nguyen Duc Quang egyetemi docens

Budapest
2015

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS	1
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	2
2.1	OLIGOSZACHARIDOK.....	2
2.1.1	Élelmiszeripari felhasználás	2
2.1.2	Élettani hatás.....	3
2.1.3	Enzimes előállítás	4
2.1.3.1	Oligoszacharidok előállítása enzimes hidrolízissel	6
2.1.3.2	Oligoszacharidok előállítása enzimes transzfer reakcióval	7
2.1.3.3	Oligoszacharidok előállítása reverz hidrolízissel	10
2.2	LAKTÓZ ALAPÚ OLIGOSZACHARIDOK.....	10
2.2.1	Galakto-oligoszacharidok.....	10
2.2.2	Laktulóz.....	12
2.2.3	Laktulóz-oligoszacharidok	13
2.3	ENZIMRÖGZÍTÉS	14
2.3.1	Enzimrögzítés főbb típusai	14
2.3.2	A β -galaktozidáz enzim rögzítése	16
3	KÍSÉRLETI RÉSZ.....	19
3.1	CÉLKITŰZÉS.....	19
3.2	KÍSÉRLETI HELY	19
3.3	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	20
3.3.1	Felhasznált anyagok	20
3.3.1.1	Enzimkészítmény	20
3.3.1.2	Alkalmazott puffer.....	20
3.3.1.3	Szénhidrátok	20
3.3.2	Alkalmazott módszerek	20
3.3.2.1	Enzimrögzítési módszer	20
3.3.2.2	Fehérjetartalom meghatározás.....	21
3.3.2.3	Hidrolízis aktivitás meghatározása.....	22
3.3.2.4	A szabad és a rögzített Pectinex ultra SP-L enzimkészítmény stabilitásának vizsgálata	23
3.3.2.5	Biokonverzió megvalósítása rögzített enzimpreparátummal	24
3.3.2.6	Szénhidrátok minőségi és mennyiségi meghatározása.....	24
3.4	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	27
3.4.1	Az enzim rögzítése és hatékonyságának meghatározása.....	27
3.4.2	A rögzített enzimkészítmény oligoszacharid szintetizáló képessége különböző szubsztrátumokon	28
3.4.3	A rögzített α -glükózidáz és β -galaktozidáz hőstabilitása	29
3.4.4	A pH és a hőmérséklet hatása a rögzített β -galaktozidáz enzimre	30
3.4.5	Laktózon és laktulózon történő biokonverzió vizsgálata	32
4	ÖSSZEFOGLALÁS	36
5	FELHASZNÁLT IRODALOM	38

1 BEVEZETÉS

Az utóbbi időkben az oligoszacharidokkal kapcsolatos kutatások intenzitásának növekedése volt tapasztalható. E kutatások többek között az oligoszacharidok élettani jelentőségével, különböző mikroorganizmusokkal (főként a tejsavbaktériumokkal és bifidobaktériumokkal) való kölcsönhatásával, valamint az előállítási és alkalmazási lehetőségükkel foglalkoznak. Az oligoszacharidok előállítása iránti nagy igény annak köszönhető, hogy számos bizonyított jótékony élettani hatással bírnak, amelyek közül az egyik legfontosabb a bélbetegségek elleni védelemben való szerepük. Hatásuk abban nyilvánul meg, hogy serkentik a vastagbélben élő probiotikus baktériumok (főként *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* fajok) növekedését és aktivitását, ezáltal a vastagbél számára védelmet biztosítanak egyes bélpatogének ellen (Losada & Olleros, 2001).

Az oligoszacharidok előállítása kétféle módon valósítható meg, kémiai, illetve enzimes úton. A kémiai eljárásnak egyik hátránya a melléktermék(ek) képződése, amely lehetetlenné teszi a módszer alkalmazását gyógyszeripari vagy élelmiszeripari célra. Az enzimes előállítás a specifikusság miatt számos előnnyel rendelkezik a kémiaiával szemben. Köztük megemlítendő az enzim rögzítésének lehetősége, melynek köszönhetően stabilabbá, ellenállóbbá válhat az enzim, valamint folytonosíthatóvá tehető az oligoszacharidok szintézise. Ilyen technológia alkalmazásával költséghatékonyabb az előállításuk (Perugino *et al.*, 2004). Ma már számos oligoszacharid előállítása iparilag megvalósított, azonban vannak olyan oligoszacharidok, amelyek szintetizálhatóságáról, élettani hatásáról még kevés információ áll rendelkezésünkre. Ilyen oligoszacharidok pl. a laktulo-oligoszacharidok. A laktulóz egy fruktóz és egy galaktóz egységből álló diszacharid, amelyet a laktóz izomerizációjával állítanak elő (Amine *et al.*, 2000; Aider & Halleux, 2007). A laktulózzal már bebizonyították, hogy különösen jó növekedési faktort jelent a probiotikus baktériumok számára. Emellett leírták a székrekedés és a májeredetű agyvelő-bántalom elleni gyógyító hatását is (Crittenden & Playne, 1996). Cardelle-Corbas és munkatársai (2008) kimutatták, hogy a Pectinex ultra enzimek készítményben található β -galaktozidáz enzim is, mely galaktozil-transzferáz aktivitása révén képes oligoszacharidokat szintetizálni ezen a szubsztrátumon.

A kutatómunkámban célul tűztam ki a Pectinex ultra enzimek készítmény kovalens rögzítését, valamint a rögzített fehérjepreparátum vizsgálatát, különös tekintettel a β -galaktozidáz aktivitásra, illetve a laktulóz alapú oligoszacharid előállításra.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Oligoszacharidok

Az oligoszacharidok a természetben többnyire tejben és gabonanövényekben előforduló, kis molekulású, kb. 3-10 monoszacharid egységből álló szénhidrátok (Rivero-Urgell & Santamaria-Orleans, 2001; Koch *et al.*, 1951; Weijers *et al.*, 2008). Édesítő értékük általában 30-60 %-a a szacharózénak, de ez több tényezőtől is függ (pl. a lánchosszúságtól, a termék mono- és diszacharid komponenseinek arányától) (Crittenen & Playne, 1996; Roberfroid & Slavin, 2000). Ezen szénhidrátok vízben oldódnak, nincs kellemetlen ízük (Tokomatsu, 1994). Az oligoszacharidok kinyerhetők közvetlenül a természetes forrásokból, de akár mesterségesen is előállíthatók. Táplálkozás-élettani szempontból megkülönböztetünk emészthető és nem emészthető oligoszacharidokat. Az utóbbi esetben az emészthetlenség abból adódik, hogy az emberi szervezet nem rendelkezik olyan enzimmel/enzimekkel, amely(ek) az oligoszacharidok kötéseit hidrolizálná (Crittenden & Playne, 1996; Musatto & Mancilha, 2007). A nem emészthető oligoszacharidok lánchosszúságuk, monoszacharid összetételük, elágazási mértékük, illetve tisztaságuk szerint is eltérhetnek.

2.1.1 Élelmiszeripari felhasználás

Az utóbbi időben, bizonyos oligoszacharidokat az emberi szervezetre gyakorolt számos jótékony hatásuknak és emészthetlenségüknek köszönhetően gyakran funkcionális (elsősorban prebiotikus és szinbiotikus) élelmiszerek összetevőjeként, sokszor bifidogén szubsztrátumként tartják számon (Rivero-Urgell & Santamaria-Orleans, 2001; Roberfroid & Slavin, 2000). Ilyen funkcionális oligoszacharidok többek között az izomalto-oligoszacharidok, a szójabab eredetű oligoszacharidok, a frukto-oligoszacharidok, illetve a galakto-oligoszacharidok is (Tokomatsu, 1994), amelyek megfelelnek azon feltételeknek, hogy az emésztés során a felső béltraktusban nem bontódnak le, illetve a bifidogén baktériumok számára specifikus szubsztrátumként szolgálnak a vastagbélben. A frukto- és a galakto-oligoszacharidok egyike azon oligoszacharidoknak, amelyek „speciális gyógyászati célra alkalmas élelmiszerekként” hivatalosan is elismertek (Tokomatsu, 1994). Ezen oligoszacharidok elsősorban különböző csecsemő tápszerekben (kihasználva ezzel az anyatej eredetű oligoszacharidok jótékony hatását) (Rivero-Urgell & Santamaria-Orleans, 2001), gabonapelyhekben és egyéb liszttermékekben fordulnak elő (Nakazawa *et al.*, 2000). Mivel az oligoszacharidok általában alacsony kalóriatartalmúak (kb. 1,5-2,0 kcal/kg között változik),

így különböző diabetikus és alacsony kalóriatartalmú élelmiszerekhez is felhasználhatók (Musatto & Mancilha, 2007). Relatív alacsony édesítőértéküknek köszönhetően kiválóan alkalmasak olyan élelmiszerek összetevőjeként, amelyeknél nem megengedett a túlzott édesség. Ezenkívül alkalmasak még az élelmiszerek viszkozitásának növelésére (viszonylag nagy molekula tömegük miatt), a fagypont eltolására, a Maillard reakció által okozott barnulás szabályozására, a túlzott kiszáradás megakadályozására, illetve az alacsony vízáktivitás kialakítására is (Crittenden & Playne, 1996). Az oligoszacharidok fizikailag stabil vegyületek, ezért könnyedén hozzáadhatók különböző feldolgozott élelmiszerekhez és italokhoz (Tokomatsu, 1994).

2.1.2 Élettani hatás

Az oligoszacharidok élettani hatás szempontjából sokrétű szerepet játszanak az emberi szervezetben. Hozzájárulhatnak egyrészt az idegrendszeri fejlődéshez, ugyanis a szervezetben monoszacharidokká, többek között D-glükózokra és D-galaktózokra hidrolizálódhatnak, amelyek kedvezően hatnak az agyra (Rivero-Urgell & Santamaria-Orleans, 2001). Továbbá a nem emészthető oligoszacharidok prebiotikus hatással rendelkezhetnek. A prebiotikumok az emésztőrendszer felső szakaszában nem emésztődnek, így változatlanul eljuthatnak a vastagbélbe, ahol kémiai szerkezetüknek köszönhetően specifikus szubsztrátumként szolgálnak a probiotikus mikroorganizmusok számára (Crittenden & Playne, 1996). Ezek az oligoszacharidok ételmi rostoknak is tekinthetők (Delzenne & Roberfroid, 1994; Roberfroid & Slavin, 2000), azonban a napi szükséglet e szénhidrátoknál kisebb. A prebiotikus oligoszacharidok a vastagbélbe jutva bifidogén sajátosságuknak köszönhetően stimulálják a probiotikus baktériumok (főként *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* fajok) növekedését és metabolikus aktivitását (Losada & Olleros, 2001), előidézve a vastagbél pH-jának csökkenését (a tejsav- és ecetsavtermelés következtében), ezáltal pedig elpusztítva számos patogén baktériumot a bélflórában (Tanaka *et al.*, 1983). Mindezeknek köszönhetően kedvezően módosítják a vastagbél mikroflórájának összetételét. Az oligoszacharidok vastagbélben történő fermentálhatósága függ a polimerizációs foktól, a glikozidos kötés típusától, az elágazások mértékétől, a baktériumok közti szinergiától, az oligoszacharid-baktérium-fermentációs termék közti kapcsolattól, a fermentáció természetétől, valamint a szacharolitikus kapacitástól (Voragen, 1998).

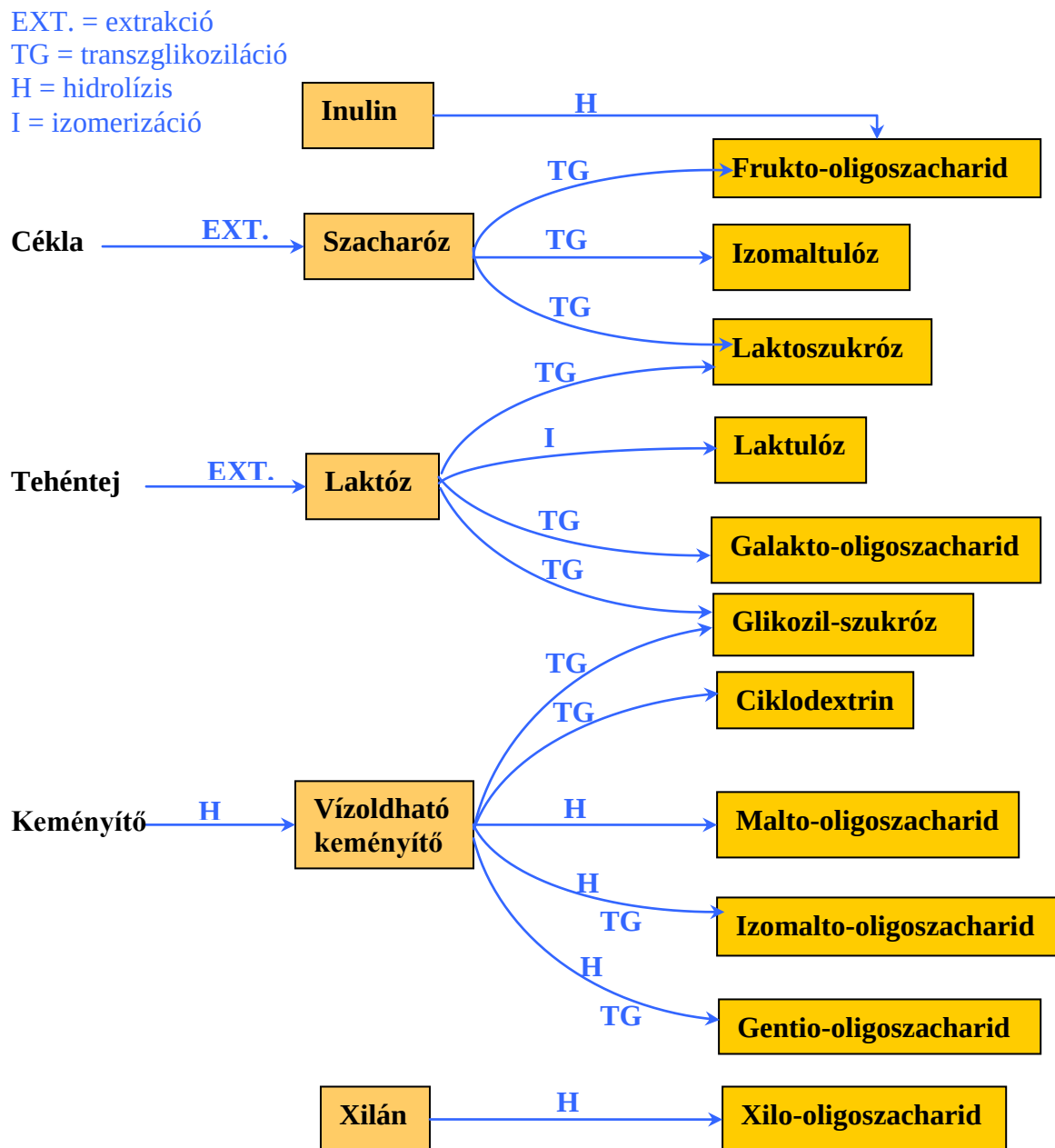
A tejsav fermentációval járó pH csökkenésnek köszönhetően ezek az oligoszacharidok képesek csökkenteni az emésztőrendszeri, a kiválasztó rendszeri és a légúti fertőzések, illetve bizonyos rákos betegségek (pl. a vastagbél - és a végbélrák) kialakulásának a kockázatát (Shimuhara, 1987; Simon & Gorbach, 1987). Az oligoszacharidok gátolhatják az immunválasz reakciók megindulását is (Mitsouka, 1990; Drasar & Hill, 1974). Fertőzés gátló hatásuk is abból adódik, hogy kompetitív receptorokkal rendelkezve meg tudják gátolni a patogének a bél hámfelületéhez történő kötődését. Tehát közvetett (a bél pH-értékének csökkentésével), illetve közvetlen (a patogének „félrevezetésével”) módon is védelmi szerepet játszanak a különböző fertőzőes betegségek ellen (Kunz & Rudloff, 1993). Mivel a szájüregben sem bontódnak le, így nem okoznak fogszuvasodást (Bloch & Thomson, 1995). Egyes kutatók szerint túlzott mennyiségben való fogyasztásuk sem ajánlott, hiszen bélpanaszokat, puffadást és akár hasmenést is okozhatnak a túlzottan nagy mennyiségű gázképződés előidézése és ozmotikus hatásuk miatt (Roberfroid & Slavin, 2000).

2.1.3 Enzimes előállítás

Hagyományosan kémiai úton történik az oligoszacharidok szintézise, de a kémiai módszerrel történő előállítás nagyon bonyolult és sok lépést igényel, mivel az oligoszacharidok, mint általában a szénhidrátok, számos hasonló reaktív hidroxil csoporttal rendelkeznek, így csak több lépésben lehet elérni a régió specifikitást (Nilsson, 1988). További hátrányként említhető, hogy az alkalmazandó vegyszerek általában drágák, alacsony a termékhozam és jelentős a melléktermék képződés, így ipari főleg élelmiszer- és gyógyszeripari célokra szánt előállításuk nehezen megvalósítható.

Manapság főként az enzimes eljárás terjedt el (Canedo *et al.*, 1999; Chitradon *et al.*, 2000; Homann & Seibel, 2009). Ez annak köszönhető, hogy az enzimes előállítás számos előnnyel rendelkezik a kémiaiával szemben. Egyrészt ezzel a módszerrel elkerülhetőek a nem kívánt melléktermékek keletkezése (pl. izomer oligoszacharidok), illetve nagy régió - és sztereospecifitás is elérhető (Moracci *et al.*, 2001; Shetty *et al.*, 2006). További fontos előnyei, hogy az enzimes előállításnál lehetőség van rögzítésre, melynek köszönhetően stabilabbá (az aktív konformáció rögzítésével), ellenállóvá válhat az enzim, valamint folytonossá tehető az oligoszacharidok szintézise. Ilyen technológia alkalmazásával költséghatékonyabb az oligoszacharidok előállítása (Perugino *et al.*, 2004), hiszen a kémiai módszerrel ellentétben, akár egy reakciólépésben is végbemehetnek (Polastro *et al.*, 1989). Az enzimrögzítés további előnyeit a 2.3. fejezetben részletezem.

A különböző oligoszacharidok enzimikus előállítása háromféle módon lehetséges, poliszacharidok hidrolízisével, reverz hidrolízissel valamint transzglikozilezéssel. Egyes oligoszacharidok enzimikus előállítására példák az 1. ábrán láthatók.



1. ábra: Néhány nem emészthető oligoszacharid enzimikus előállításának sémája
(Sako *et al.*, 1999)

2.1.3.1 Oligoszacharidok előállítása enzimes hidrolízissel

A hidrolázok azon enzimek fő csoportja, amelyek a hidrolízist katalizálják. Nomenklatúráilag ezek az EC.3. főcsoporthoz tartoznak, amely számos alcsoportot foglal magában. A hidrolázok egyik fontos jellemzője, hogy a szubsztrátumot vízfelvétel segítségével hasítják termékekre. A 2. ábrán a hidrolízis reakció általános sémáját mutatom be, melyen jól látható, hogy a víz molekula OH-csoportja a szubsztrátum Y-komponensére, míg a víz protonja az X komponensre kerül. Elméletileg a hidroxil csoport az X-komponenshez is kötődhet (Sevella, 2011; Wiseman, 1975).



2. ábra: Hidrolízis reakció képlete (Sevella, 2011)

A hidrolázok egyik jelentős képviselői a glikozidázok (EC. 3.2), melyek a poliszacharidokban lévő glikozidos kötések lebontásáért felelősek. Két típusa létezik: a glikozidos kötésekre nem specifikusok, illetve a specifikusok, melyekkel nagy régiószelektivitást tudunk elérni. Az utóbbi típushoz tartozik többek között az invertáz, az α -glükozidáz és a β -galaktozidáz.

A glikozidázokon belül megkülönböztethetünk exo- és endo-glikozidázokat is. Az exoglikozidázok a poliszacharidok (illetve az oligoszacharidok) nem-redukáló végein, míg az endoglikozidázok a láncon belül hasítják a glikozidos kötések. Az oligoszacharidok előállítására általában endo-glikozidázokat alkalmaznak.

A glikozidázok csoportosíthatók a szerint is, hogy az általuk katalizált reakció folyamán megtartják-e (megtartó glikozidázok) vagy megváltoztatják (invertáló glikozidázok) a donor molekula anomer kötésének sztereokémiáját. Invertáló enzimek közé tartozik a β -galaktozidáz és az invertáz enzim is, a megtartó enzimek pedig egy jelentős képviselője az α -amiláz. A glikozidázok specializálódhatnak homo- (csak szénhidráttartalmú), illetve heteroglikozid (nemcsak szénhidráttartalmú) láncok bontására is. Az előbbiek a holozidázok (pl. a glükozidázok) az utóbbiak pedig a heterozidázok (van Rantwijk *et al.*, 1999).

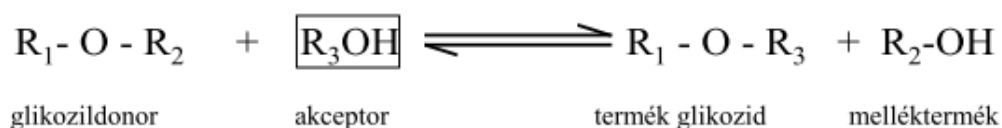
Az oligoszacharidok közül például frukto-oligoszacharidok inulinból, illetve malto-oligoszacharidok keményítőtől történő előállításában játszik jelentős szerepet a hidrolízis aktivitás, amelynek bemutatására szakirodalomban is találhatunk példákat (Kim *et al.*, 1999). Inulinból endo-inulináz enzimmel történő frukto-oligoszacharidok előállításával Kim és munkatársai foglalkoztak (1999), tanulmányuk során elért maximális termékhozam több mint 80%-os volt. A frukto-oligoszacharidok, bifidogén hatásuk révén nagy szerepet játszanak az

egészségmegőrzésében és a szénhidrátok egyike a funkcionális élelmiszerekben legelterjedtebben alkalmazott összetevőknek. Emellett édesítőszerként is alkalmasak a cukrok helyettesítésére (Chi *et al.*, 2009; Lo'pez-Molina *et al.*, 2005).

2.1.3.2 Oligoszacharidok előállítása enzimes transzfer reakcióval

A transzfer reakció során monoszacharid egységek szállítása történik donor molekuláról akceptor molekulára, mely során oligoszacharidok szintetizálódnak.

A transzglikozilezés sémáját a 3. ábra szemlélteti.



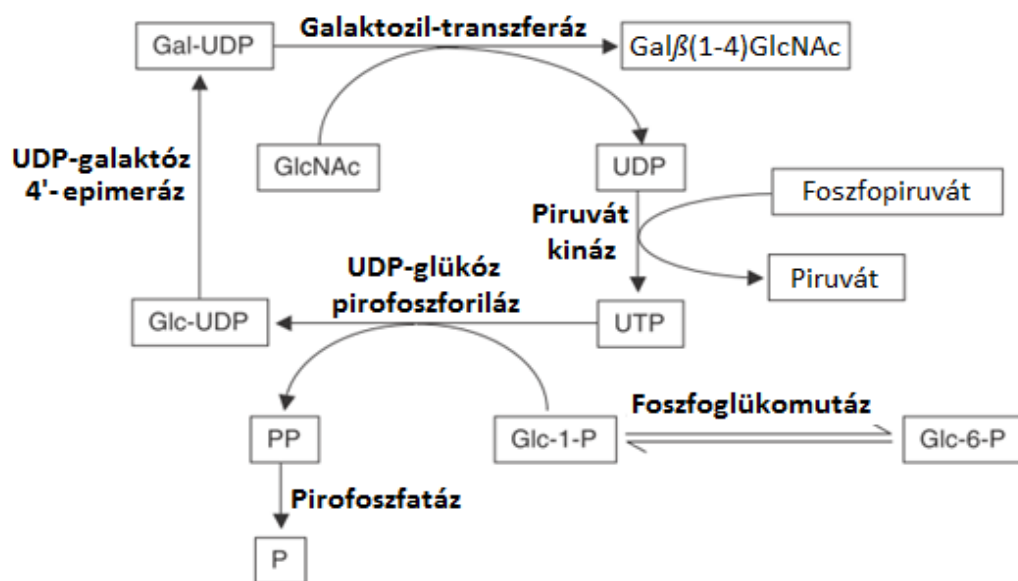
3. ábra: Transzglikozilezés általános képlete (Sevella, 2011)

A fenti reakcióban az akceptor helyén lehet alkohol, mono-, di- és poliszacharid, illetve a termék helyén lehet glikozid, mono-, di- és poliszacharid is. Mind a donorok, mind az akceptorok lehetnek helyettesített szénhidrátszármazékok. Az oligoszacharidok transzglikolízissel történő előállítása mind glikozidáz, mind glikozil-transzferáz enzimek alkalmazásával lehetséges.

Glikozil-transzferázok

A glikozil-transzferázok a monoszacharidok sztereo- és régióspecifikus átvitelét katalizálják. Ennek köszönhetően alapvető szerepet játszanak különböző oligoszacharidok, poliszacharidok és diszacharidok szintézisében. Általában a glikozidázokhoz képest a glikozil-transzferázok nagyobb régió- és sztereospecifitással rendelkeznek, ezáltal könnyebb egy kívánt oligoszacharid előállítása. Magas termékhozamuknak és a nagy akceptor specifitásuknak köszönhetően széles körben alkalmazzák oligoszacharidok szintézisére (Shetty *et al.*, 2006). A sikeres transzglikolizációról először azt feltételezték, hogy elengedhetetlen a nagy energiatartalmú foszfátkötés jelenléte. Később azonban kimutatták, hogy az enzimtől függően anélkül is végbe mehet a reakció, hogy a donor „aktiválására” lenne szükség. Ebből a szempontból az enzimsoporthat kétféle típusa létezik. Az egyik, amelyik a donor aktiválását igényli (Leloir transzferázok), a másik pedig, amelyiknek nincs szüksége ehhez a transzglikoziláció sikeres lezajlásához (non-Leloir transzferázok) (Weijers

et al., 2008; Sevelle, 2011). A glikozil-transzferázok megkülönböztethetők aszerint is, hogy milyen cukoregységeket visznek át, illetve, hogy milyen az akceptor specifitásuk (Shetty *et al.*, 2006). A glikozil-transzferázokat jelenleg 60 családba sorolják Coutinho és Henrissat (1999) által felállított szekvencia szerinti besorolás alapján. Glikozil-transzferázzal történő szintézisre például a 4. ábrán mutatok be, ahol UDP az uridin-5'-difoszfát, UTP az uridin-5'-trifoszfát, Gal-UDP az uridin-5'-difoszfát-galaktóz, Glc-UDP az uridin-5'-difoszfát-glükóz, PP a pirofoszfát, P a szabad foszfát, Glc-1-P a glükóz-1-foszfát, Glc-6-P a glükóz-6-foszfát, GlcNAc az N-acetil-glükózamin és Gal β (1-4)GlcNAc az N-acetil-laktózin.

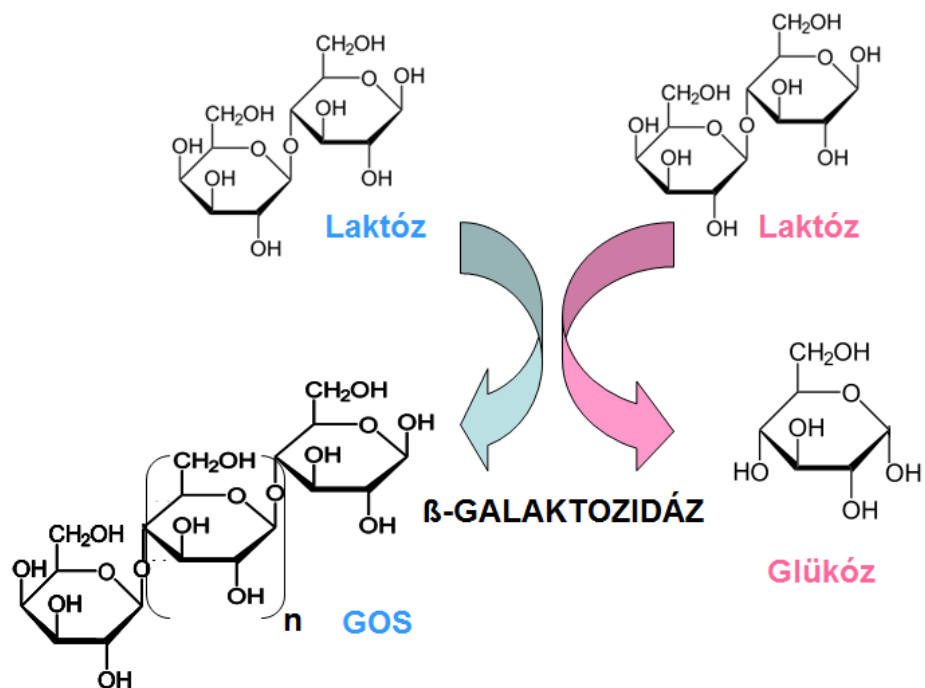


4. ábra: N-acetil-laktózin előállítása galaktozil-transzferáz enzimmel (Shetty *et al.*, 2006)

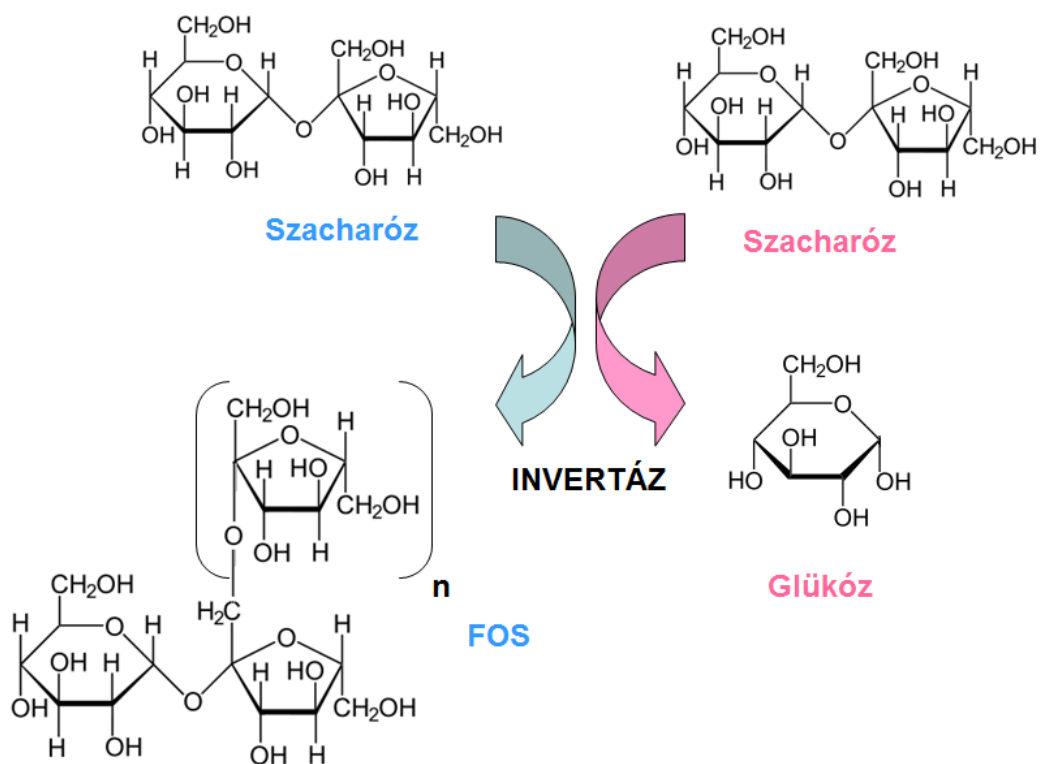
Glikozidázok

A glikozidáz enzimek alkalmazása is rendkívül népszerű oligoszacharidok szintéziséhez (annak ellenére, hogy gyakran csak alacsony régiószeliktivitást érhetünk el velük), mivel könnyedén hozzáférhetők (előfordulhatnak pl. növényi és állati sejtekben, mikroorganizmusokban és vírusokban), használatuk viszonylag gazdaságos, emellett kofaktorok nélkül is tudnak katalizálni (Shetty *et al.*, 2006).

A glikozidázok transzferáz aktivitásával történő oligoszacharid előállítására is találhatunk példákat, amelyeknek a sémái az 5. ábrán, illetve a 6. ábrán láthatók.



5. ábra: Laktózból történő galakto-oligoszacharid szintézis a β -galaktozidáz enzim transzfer aktivitásának felhasználásával



6. ábra: Szacharózból történő frukto-oligoszacharid szintézis az invertáz enzim transzfer aktivitásának felhasználásával

2.1.3.3 Oligoszacharidok előállítása reverz hidrolízissel

A reverz hidrolízis (equilibrium controlled synthesis) egyik célja a reakció egyensúlyának termékképzés felé történő eltolása, amely az enzim termodinamikailag kontrollált megfordított katalizációján alapul. A reverzió glikozidázok esetében a glikozid kötés hidrolízisének megfordításának felel meg, amely abból tevődik össze, hogy közvetlenül összekapcsolódik egy szabad monoszacharid egység és egy nukleofil reagens. Az egyensúly módosítása lehetővé teszi, hogy a glikolizáció során a glikozid kötések kialakítása kerüljön előtérbe a hidrolízissel szemben, amellyel a termékhozam növelését érhetjük el. Már különböző módszerrel kísérleteztek a reakció egyensúlyának termékképzésre irányuló eltolására (Toone *et al.*, 1989; Ichikawa *et al.*, 1992; Rastall & Bucke, 1992). Ezt például azzal érték el, hogy magas kiindulási monoszacharid koncentrációt (nagyjából 70-80%-os), ezáltal alacsony vízaktivitást alkalmaztak (Rastall & Bucke, 1992). Továbbá magas hőmérsékletet (kb. 50-60°C) használtak a reakció sebesség gyorsítására (Rastall & Bucke, 1992). Ezenkívül más kutatók a reakció folyamán keletkező oligoszacharidok elvezetésével érték el a termékhozam emelkedését (Ajisaka & Yamamoto, 2002).

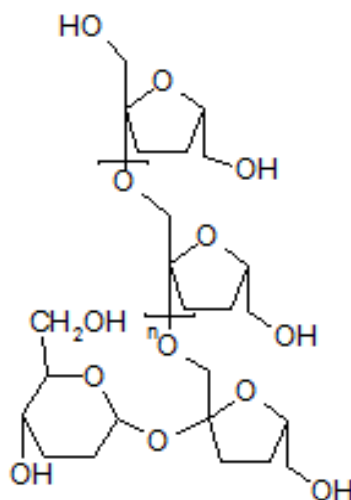
A szubsztrátum koncentráció növelésével például manno-oligoszacharidoknál tapasztaltak termékhozam növekedést α -mannozidáz enzimet alkalmazva, azonban laktulóz esetén kisebb kiindulási koncentrációval kaptak több terméket (Johansson *et al.*, 1986; 1989; Shetty *et al.*, 2006). A reverz hidrolízis egyik nagy előnye az egyszerűség, illetve az, hogy mind homo-, mind hetero-oligoszacharidok szintézise végbemehet.

2.2 Laktóz alapú oligoszacharidok

2.2.1 Galakto-oligoszacharidok

A galakto-oligoszacharidok (a legtöbb más oligoszachariddal ellentétben) állati eredetű, elsősorban tehéntejben és anyatejben előforduló oligoszacharidok (Alander *et al.*, 2001). Kémiaiilag egy laktóz (β -D-galaktopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glükóz) egységből és ehhez kapcsolódó galaktóz egységekből állnak (7. ábra). A glükóz és a galaktóz egységeket β -kötések tartják össze ((Gal)_n – Gal – Glu, ahol n=1-4), így az emberi szervezet nem képes lebontani, viszont a vastagbélbe eljutva baktériumok által erjeszthetők. Az erjesztésük két lépésben zajlik (mint a frukto-oligoszacharidok esetében). Első lépésként monomerekké hidrolizálódnak a bakteriális β -oxidázok által, majd második lépésként a felszabadított monomerek anaerob

módon fermentálódnak, miközben rövidszénláncú zsírsavak képződnek, mint az acetát, a propionát és a butirátsav, illetve egyes gázvegyületek is a H_2 , a CO_2 és a CH_4 (Bouhnik *et al.*, 1991; Roberfroid, 1997; 2000). A galakto-oligoszacharidok ajánlott napi fogyasztási mennyisége max. 20g, ez fölött hasmenéses panaszokat idézhetnek elő (Sako *et al.*, 1999).



7. ábra: Galakto-oligoszacharidok kémiai szerkezete

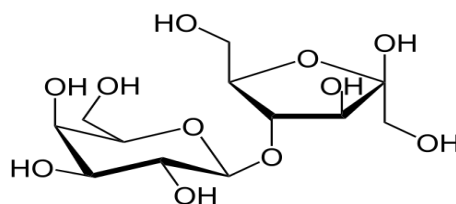
A galakto-oligoszacharidokat az iparban nagy koncentrációjú laktózból állítják elő β -galaktozidáz enzim galaktozil-transzferáz aktivitásának felhasználásával (9. ábra). A nagy koncentrációjú laktóz oldatot, mint szubsztrátumot, általában tehén eredetű tejsavóból vonják ki. A reakció főtermékeként triszacharidok (4- és 6-galaktozillaktóz) és nagyobb monoszacharid egységekkel rendelkező oligoszacharidok képződnek (Sako *et al.*, 1999; Park & Almeida, 1991).

Kiemelkedő prebiotikus sajátosságuknak köszönhetően számos jótékony hatása van az emberi szervezetre. Először is fogyasztásukkal lecsökkenthetőek a különböző hasmenéses panaszok és a székrekedés kialakulásának esélye (a vastagbél és a széklet pH-jának csökkenésével), valamint e tulajdonsága miatt megelőzhetőek a különböző rákos betegségek is. Továbbá kimutatták a koleszterinszint és vérnyomás csökkentő hatását egyaránt (Crittenden & Playne, 2009; Rivero-Urgell & Santamaria-Orleans, 2001). A galakto-oligoszacharidok különösen a *Bacteroides* és *Bifidobacterium* fajok szaporodását stimulálják (Mitsuoka, 1990). Egyes tanulmányokban kimutatták, hogy más nem emészthető oligoszacharidokhoz hasonlóan, ezen oligoszacharidok szintén elősegítik a rövidláncú zsírsavak termelődését, amelyek táplálékot jelentenek a bélsejteknek (Hidaka *et al.*, 1986; 1988; Hilliam, 1998), valamint a bifidobaktériumok szaporodásának segítségével, különböző vitaminok (B_1 , B_2 , B_6 ,

B₁₂, nikotinsav és folsav) képződését is előidézhetik (Kanbe, 1992). Továbbá fontos szerepet játszanak különböző ásványi anyagok bélben történő hasznosulásában, hiszen a fermentáció során lecsökkent pH a bélben hozzájárul bizonyos ásványi anyagok, mint a kalcium és a vas felszívódásához (Chonan *et al.*, 1995; Chonan & Watanuki, 1995). A galakto-oligoszacharidok képesek lecsökkenteni a *Clostridium perfringens* fajok jelenlétét a bélflórában, így az általuk előidézett bél „rothadásból” származó toxikus anyagcseretermékek mennyiségét is mind a vizeletben, mind a székletben, valamint képesek gátolni a nem kívánt enzimek aktivitását (Hidaka *et al.*, 1988; Rochat *et al.*, 1994). Egy tanulmány szerint a galakto-oligoszacharidok bifidogén hatása csak napi min. 10g mennyiségben történő fogyasztás esetén érvényesülhet. Ez a mennyiség pl. a xilo-oligoszacharidok, a frukto-oligoszacharidok és az izomalto-oligoszacharidok esetéhez képest sokkal nagyobb (Gibson *et al.*, 2004; Manning & Gibson, 2004; Goulas *et al.*, 2004).

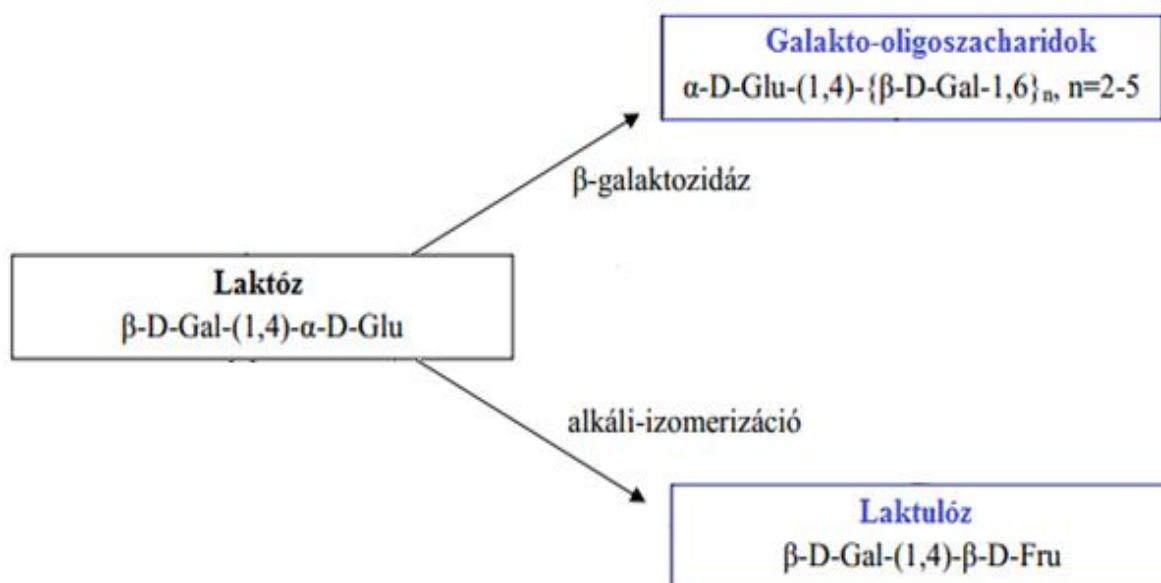
2.2.2 Laktulóz

A laktóz alapú oligoszacharidokhoz sorolható a laktulóz is. Kémiaailag a laktulóz egy β -D-galaktóz és egy β -D-fruktóz egységből álló vegyület, amelyben a két egységet 1-4 glikozidos kötés tartja össze (8. ábra). Diszacharid jellege ellenére, a laktulóz szintén az oligoszacharidokhoz sorolható, több hasonló tulajdonsága miatt (Crittenden & Playne, 1996). A laktulóz a természetben nem található meg, szintetikusán állítják elő (Amine *et al.*, 2000; Aider & Halleux, 2007).



8. ábra: A laktulóz (4-O- β -D-galaktopiranozil- β -D-fruktofuranóz) kémiai szerkezete

A laktulóz előállítás, ahogy a galakto-oligoszacharidok esetében is, laktózból történik, de ebben az esetben izomerizációs folyamatot alkalmaznak (9. ábra). Az izomerizáció végbemehet lúgos módszerrel, enzimesen illetve hőkezeléssel is (Luzzana *et al.*, 2003), ez utóbbi miatt a laktulóz a tej-hőkezelés mértékének jelzésére is alkalmas (Marconi *et al.*, 2004). Az izomerizáció során a laktóz glükóz részét fruktózzá alakítják.



9. ábra: Galakto-oligoszacharidok és a laktulóz előállítása laktózból
(Crittenden & Playne, 1996)

A laktulózzal (ahogy egyes nem emészthető oligoszacharidokról is) bebizonyították, hogy különösen jó növekedési faktort jelent a probiotikus baktériumok számára, ezért széles körben alkalmazzák prebiotikus és szinbiotikus élelmiszer összetevőjeként. Emellett igazolták a székrekedés és a májeredetű agyvelő-bántalom elleni gyógyító hatását is. Dietetika szempontjából előnyös a fogyasztása, mivel alacsony kalóriatartalommal bír (Crittenden & Playne, 1996; Delzenne, 2003). A laktóznál édesebb ízűek, sőt Parrish és munkatársai (1979) szerint bizonyos feltételek mellett a szacharóz helyettesítőjeként is alkalmasak lehetnek. Adalékanyagként való alkalmazása a legtöbb országban engedélyezett, azonban néhány országban mint pl. az Amerikai Egyesült Államokban erre a célra még nincs jóváhagyva, mivel a laktulózra gyógyászati vegyületként tekintenek.

2.2.3 Laktulóz-oligoszacharidok

Más oligoszacharidokkal ellentétben erről az oligoszacharidról még kevés tanulmány született mind előállításukkal, mind élettani hatásukkal kapcsolatban. Előállításuk a β-galaktozidáz enzim felhasználásával - galaktozil-transzfer aktivitása révén - laktulózból történik (Guerrero *et al.*, 2013). Néhány kutatás során sikeresen véghezvitték, köztük a Pectinex Ultra SP-L enzimmészítmény felhasználásával (Cardelle-Cobas *et al.*, 2008), mellyel β-D-

galaktopiranozil-(1→6)-β-D-galaktopiranozil-(1→4)-β-D-fruktopiranozt, β-D-galaktopiranozil-(1→4)-β-D-galaktopiranozil-(1→4)-β-D-fruktopiranozt és β-D-galaktopiranozil-(1→4)-β-D-fruktopiranozil-(1→1)-β-D-galaktopiranozt szintetizáltak.

A laktulóz-oligoszacharidokról szintén kimutatták, hogy alkalmasak lehetnek prebiotikus összetevőként a funkcionális élelmiszerek előállításához. Cardelle-Corbas és munkatársai (2009) tanulmányuk során különböző szénhidrátokon, köztük laktulóz- és laktulóz-oligoszacharidon vizsgálták a bifidobaktériumok szaporodását. Megfigyelték, hogy a laktulóz-oligoszacharidok bifidogén hatása kedvezőbb, mint a laktulózé. Ennek köszönhetően a laktulóz-oligoszacharidok ipari előállításának megvalósítása egyre nagyobb jelentőséget kap. A módszer kidolgozására és optimalizálására jelenleg is végeznek vizsgálatokat.

2.3 Enzimrögzítés

Az oldott (szabad) enzimek használata gyakran komoly korlátokat szab a különböző biotechnológiai folyamatok véghez vitelében. Ez arra vezethető vissza, hogy egyrészt az enzimek bizonyos rendszerből való izolálása és tisztítása többnyire bonyolult és drága folyamat, másrészt a szerkezetük komplexitása miatt instabilitásra hajlamosak, amint kinyerik a természetes lelőhelyéről, valamint élettartalmuk általában rövid idejű (Krajewska, 2004; Irazoqui *et al.*, 1998). Mindezek miatt az enzimek rögzítése ma már egyre nagyobb jelentőséggel bír mind a kutatásban, mind az ipari alkalmazásban. A rögzített enzimes technika alkalmazásával tehát elérhető az, hogy az enzim stabilabbá, ellenállóbbá váljon, illetve az enzimes szintézisek folytonosíthatók legyenek (ld. 2.1.3. fejezet). Költséghatékonyság szempontjából rendkívül jelentősek, hiszen az általában drága enzimeket többnyire újra fel lehet használni. Továbbá ily módon bármely enzim könnyebben lesz eltartható, szállítható valamint nagyobb oszlopokba vagy bioreaktorokba is könnyen átvihető (Hoschke, 2013). A sok előnnyel szemben azonban hátránya az, hogy az enzim a rögzítéssel általában valamilyen mértékben veszíthet aktivitásából (főként a negyedleges szerkezettel nem rendelkező enzimek), ugyanakkor a hő és a pH stabilitása megnőhet (Kosáry, 2013).

2.3.1 Enzimrögzítés főbb típusai

Az enzim rögzítésére eddig már számos módszert kidolgoztak. Ezek közül azonban csak néhány típus terjedt el, melyek a következők: az enzim valamilyen vízdoldhatatlan hordozóhoz történő rögzítése kovalens vagy ionos kötéssel, illetve fizikai adszorpcióval, továbbá

valamilyen polimer közegbe (pl. gélbe vagy membránba) zárása, valamint keresztkötésekkel való rögzítése az enzimek között vagy kombináltan a hordozókkal. Ezen módszerek alkalmazásából előny, illetve hátrány is származhat, amelyek az 1. táblázatban vannak feltüntetve. A módszerek közül beszélhetünk reverzibilis, illetve irreverzibilis rögzítésről is. Reverzibilis módszerek közé tartozik a legtöbb kovalens kötással (beleértve keresztkötéssel) történő rögzítés, továbbá a mikrokapszulázás és egyéb mátrixba való zárás. Irreverzibilisnek mondható például az adszorpció, az ionos, a fémes és bizonyos kovalens (diszulfidhíd) kölcsönhatással történő enzimrögzítés (Brena & Batista-Viera, 2006).

**1. táblázat: A leggyakoribb enzimrögzítési módszerek összehasonlítása
(Hoschke 2013;Internet)**

	Fizikai adszorpció	Ionos kötés	Polimerbe (gélbe) zárás/ mikrokapszulázás	Kovalens kötés	Keresztkötés
Megvalósítás	könnyű	könnyű	nehéz	nehéz	nehéz
Kötő erő	gyenge	közepes	közepes	erős	erős
Fajlagos aktivitás	közepes	közepes	kicsi	nagy	közepes
Regenerálás	lehetséges	lehetséges	lehetetlen	lehetetlen	lehetetlen
Rögzítési költség	nincs (csak hordozó)	nincs (csak hordozó)	közepes	magas	közepes
Alkalmazhatóság	általános	általános	korlátozott	általános	általános
Mikrobás fertőzés elleni védelem	nincs	nincs	van	nincs	lehetséges

Kovalens kötés

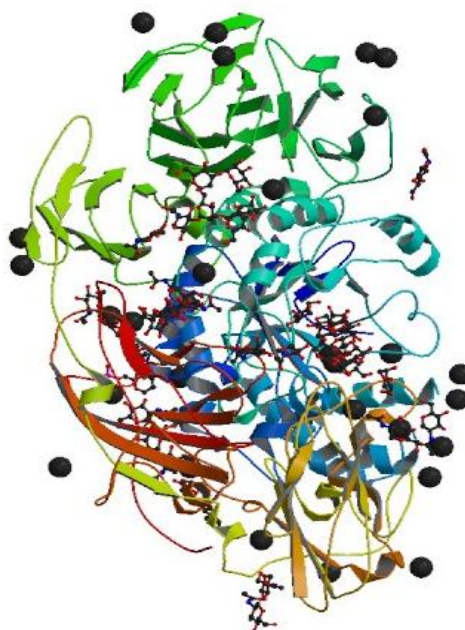
Jelenleg a legszélesebb körben alkalmazott rögzítési módszer az enzim és a hordozó molekulái között kialakított kovalens kémiai kölcsönhatás. Elengedhetetlen feltétele az enzim katalízisért nem felelős aminosav oldalláncának és az alkalmazott hordozó reaktív funkciós csoportjának jelenléte vagy kialakítása (aktiválása). A hordozó aktiválásával jól támadható, elektronban szegény nukleofil csoportok (ilyenek az amino- és hidroxil csoportok) képződnek a hordozón, amelyek már lehetővé teszik az enzim hordozóhoz való kovalens kapcsolódását.

A kovalens kötések kialakíthatóak diazotálással, amidkötés létrehozásával, illetve akilezés és arilezéssel is (Kosáry, 2013). Módszer előnye, hogy a stabil kovalens kötésnek köszönhetően az enzim nem válik ki az oldatba használatkor (Brena & Batista-Viera, 2006). Hátránya, hogy gyakran előfordulhat, hogy a katalízisért felelős aminosav oldalláncok is részt vesznek a kötésben, ami pedig az enzimaktivitás nagy veszteségét eredményezheti (Mattiasson & Kaul, 1991). Ezt általában azzal küszöbölik ki, hogy az enzim rögzítésének rendszeréhez

hozzáadnak szubsztrátumokat, hogy azok „lefoglalhassák” a katalízisben szerepet játszó oldalláncokat, ezáltal azokon nem keletkezhetnek a rögzítéshez szükséges kovalens kötések. A rögzítésben leggyakrabban résztvevő aminosav oldalláncok a lizin (ϵ -amino-csoport), a cisztein (tiol-csoport), valamint az aszparagin- és a glutaminsav (karboxil-csoport) (Kosáry, 2013; Brena & Batista-Viera, 2006).

2.3.2 A β -galaktozidáz enzim rögzítése

Az utóbbi időkben a β -galaktozidáz enzim (EC 3.2.1.23) ipari használata rendkívül jelentőssé vált elsősorban a laktózmentes tejtermékek gyártásában. Az enzim a laktóz (tejcukor) β -1,4-D-glikozidos kötését hidrolizálja, amelynek termékeként glükóz és galaktóz keletkezik (Thiem 1995; Kosaric & Asher, 1985). Ezen tulajdonságából adódóan laktáz néven is ismertek. Származhatnak állatokból, növényekből és mikroorganizmusokból is, azonban a biotechnológia terén leginkább az utóbbiak terjedtek el (Panesar, 2010). Az élesztő- és penészgomba, illetve baktérium eredetű β -galaktozidázok mindegyike alkalmas a laktóz bontására. Az élesztőkből és baktériumokból izolált enzim pH-optimuma kb. 6,0-7,5 között, a penészgombákból kinyerve pedig pH 3,0-6,0 között változik (Sevella, 2011). A 10. ábra egy *Aspergillus oryzae* eredetű β -galaktozidáz háromdimenziós szerkezetét mutatja be.



10. ábra: A β -galaktozidáz térbeli szerkezete (Maksimainen *et al.*, 2013)

A 2.2 fejezetben leírtak alapján a hidrolízis mellett a β -galaktozidáz enzim, különböző transz-galaktozilációs reakciókat is képes katalizálni (Wallenfels, 1951), mely során két galaktóz egység között új glikozidos kötést alakít ki. Ennek köszönhetően az enzim ezen aktivitásának köszönhetően lehetőség van galakto-oligoszacharidok és laktulóz-oligoszacharidok szintézisére (Panesar *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2004).

2. táblázat: Példák az eddig sikeresen elvégzett β -galaktozidáz rögzítésére és alkalmazott módszereire

	β -galaktozidáz eredete	Alkalmazott hordozó/ágens/ gél	Hivatkozás
Fizikai adszorpcióval	<i>Bullera singularis</i>	Chitopearl BCW 3510 gyöngyök	Shin <i>et al.</i> , 1998
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Glutáraldehiddel kezelt kitozán gyöngyök ("plug" reaktorban)	
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Cellulóz-zselatin	Numanoglu & Sungur, 2004
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Nylon-6	Portaccio <i>et al.</i> , 1998
Bezárasos módszerrel	<i>Aspergillus oryzae</i>	Glioxil-agaróz	Huerta <i>et al.</i> , 2011
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Kerámia membrán reaktor	Ebrahimi <i>et al.</i> , 2010
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Alginát-karragén gél gyöngyök	Mammarella & Rubiolo, 2005
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Alginát-zselatin alapú rost	Tanriseven & Dogan, 2002
		Lentikats (PVA hidrogél kapszulák)	Grosova <i>et al.</i> , 2008
Ionos kötéssel	<i>Thermus sp.</i>	Polietiléniminnel bevont Sepabeads anion cserélő gyanta	Pessela <i>et al.</i> , 2003
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Amfoter ioncserélő	Zhang & Ohasi, 1997
Mikrokap-szulázással	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Na-alginát	Zhang <i>et al.</i> 1998, Alomari <i>et al.</i> , 2011
Kereszt-kötéssel	<i>Thermus aquaticus</i> YT-1	BSA (Bovin serum albinun)	Berger <i>et al.</i> , 1995
	<i>E.coli</i>	Glutáraldehiddel és krómium (III)-acetáttal kezelt zselatin	Sungur & Akbulut, 1994
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Pamut szövet (keresztkötő reagens: glutáraldehid)	Zhou <i>et al.</i> , 2003
Kovalens kötéssel	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Glutáraldehiddel aktivált kitozán	Klein <i>et al.</i> , 2013
	<i>Talaromyces thermophilus</i>	Oldhatatlan Eupergit C	Nakkharat & Haltrich, 2006
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Mágneses Fe ₃ O ₄ kitozán nanorészecskék	Pan <i>et al.</i> , 2009
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Duolite-A568	Maugard <i>et al.</i> , 2003
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Makrosított, mikrosított és nanosított kitozánrészecskék	Bíró <i>et al.</i> , 2012
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Glutáraldehiddel aktivált grafit	Zhou & Chen, 2001

Az élelmiszeriparban azonban a legtöbb enzimhez hasonlóan a feldolgozási folyamatok során különböző külső káros hatások érhetik az enzimet, amely korlátozhatja használatukat. A probléma kiküszöbölésének egyik megoldása lehet a β -galaktozidáz rögzítése, így ennek jelentősége miatt már számos tanulmány foglalkozott ezzel a témával. Az eddig sikeresen megvalósított β -galaktozidáz rögzítéseket a 2. táblázat mutatja. Zöld szín jelöli azokat a tanulmányokat, melyek során galakto-oligoszacharidok szintézisére használták fel a rögzített β -galaktozidázt.

Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidáz enzimének rögzítése

A Pectinex Ultra SP-L enzimmészítményben található β -galaktozidáz rögzíthetőségével szintén számos kutató foglalkozott. Sikeres rögzítést ért el például Tanriseven és Aslan (2007), akik a β -galaktozidáz enzimet kovalens kötéssel Eupergit C (aktív epoxi-csoportokkal rendelkező akril-gyöngy) hordozóra rögzítették, 100%-os hatékonyságot elérve. Calandri és munkatársai (2013) a β -galaktozidáz enzimet kitisztították a Pectinex Ultra SP-L preparátumból, és szintén kovalens kötéssel rögzítették CNBr (cianogén-bromid)-dal aktivált sepharose, illetve glioxil-agaróz hordozóra. Az előbbi esetben 7-es pH-értékű Na_3PO_4 , utóbbi esetben 7 és 10-es pH értékű Na_2CO_3 puffer mellett valósult meg. A semleges pH-jú Na_2CO_3 pufferhez hozzáadtak DTT (dithiothreitol) komponenst is a rögzítés hatékonyságának növelése érdekében. A Sepharose hordozó esetében 30%-os rögzítési hatékonyságot értek el, amellyel 95%-a az enzimaktivitásnak megmaradt, míg glioxil-agaróz hordozó esetén több mint 95%-os rögzítést értek el mind 7-es, mind 10-es pH-közeget alkalmazva is, azonban az enzimaktivitás szempontjából a 10-es pH-jú puffer esetén 53%-os hatékonyságot értek el, míg 7-es pH-jú puffer esetén 61%-ot (rögzítés utáni lúgos közegben történő inkubálással).

3 KÍSÉRLETI RÉSZ

3.1 Célkitűzés

Az utóbbi időben egyre nagyobb számban végeztek kutatásokat oligoszacharidokkal kapcsolatban és azok előállítási lehetőségeiről. Ez annak köszönhető, hogy táplálkozástani és gyógyászati szempontból rendkívül értékes vegyületek, többek között prebiotikus képességük miatt. A laktulóz előállítása iparilag már megvalósított, azonban a laktulóz alapú oligoszacharidok előállításával még kevés tanulmány foglalkozott, emellett élettani tulajdonságairól is csekély információ áll rendelkezésünkre. Egyes kutatók kimutatták, hogy a laktulóz alapú oligoszacharidok bifidogén hatása a laktulóznál is kedvezőbb (Cardelle-Cobas, 2009), így a szénhidrát további tanulmányozása fontos lehet.

Kutatómunkám során célul tűztem ki az *Aspergillus aculeatus* eredetű, kereskedelembe is kapható Pectinex ultra SP-L enzimmészítmény vizsgálatát laktulóz típusú oligoszacharidok szintézisére, az alábbi részfeladatokkal:

- enzimrögzítési módszer vizsgálata és a rögzítési hatékonyság megállapítása
- a rögzített enzimmészítmény különböző oligoszacharidok szintézisére való alkalmasságának vizsgálata
- a rögzített preparátum stabilitásának vizsgálata
- a rögzített preparátum β -galaktozidáz aktivitásának pH és hőmérséklet optimum meghatározása
- a laktulóz alapú oligoszacharid szintézis vizsgálata

3.2 Kísérleti hely

Kutatásaimat a Budapesti Corvinus Egyetem Sör- és Szeszipari Tanszékének laboratóriumaiban végeztem.

3.3 Anyagok és módszerek

3.3.1 Felhasznált anyagok

3.3.1.1 Enzimb készítmény

Pectinex Ultra SP-L (Sigma-Aldrich Kft.):

A specifikációja alapján a következő enzimeket tartalmazza: pektinészteráz, pektintranszelimináz, poligalakturonáz, valamint kis mennyiségben hemicelluláz és celluláz.

3.3.1.2 Alkalmazott puffer

McIlvaine puffer (pH 4,5-7,0):

0,2 M (35,598 g/l) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,1 M (21,014 g/l) citromsav

3.3.1.3 Szénhidrátok

Természetes:

cellobióz, galaktóz, glükóz, laktóz, laktulóz, maltóz, maltulóz, mannóz, melibióz, palatinóz, szacharóz, trehalóz, turanóz.

Szintetikus:

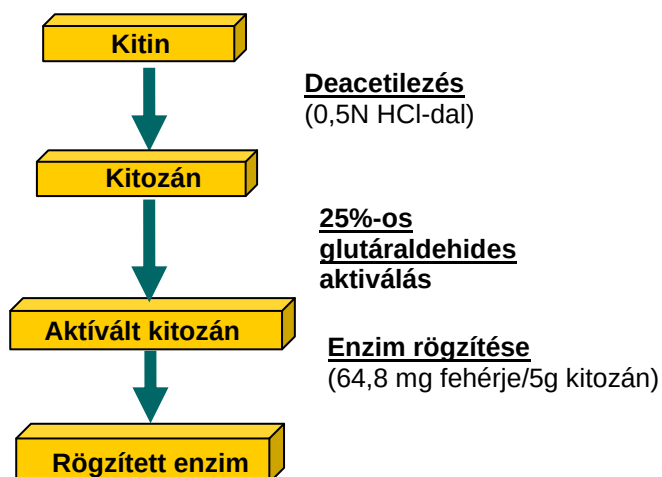
p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid, p-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid, p-nitrofenil- α -D-glükopiranozid (Sigma-Aldrich Kft.).

3.3.2 Alkalmazott módszerek

3.3.2.1 Enzimb rögzítési módszer

Az enzimb készítményt aktivált kitozánhoz kovalens kötással rögzítettem Nguyen és munkatársai (2011) által leírtak alapján. Az alkalmazott hordozó előnye, hogy természetes, nem toxikus és könnyen lebontható. A rögzítés három fő lépésből tevődik össze (11. ábra). Első lépésként kitint 10 %-os HCl-dal deacetileztem kitozánná, 3 órás kevergetést és szűrést alkalmazva (szoba hőmérsékleten). A kapott kitozánt 60 °C-on, egy éjszakán keresztül szárítottam. Ezt követően 0,1 M McIlvaine pufferrel (pH 5,5) felhígítottam, majd 25%-os glutáraldehid hozzáadásával 1 órás, 4°C-on történő kevertetést alkalmazva megfelelő karokat (ligandumokat) alakítottam ki rajta. Az aktivált kitozánt Whatman szűrőpapíron leszűrtem és

pufferrel átmostam. Az enzimrögzítést úgy valósítottam meg, hogy 5 g aktivált kitozánhoz 2,2 ml Pectinex enzimkészítményt és 50 ml puffert adtam. A rögzítési művelet 4°C-on, kevertetés mellett, egy éjszakán keresztül történt. Végül szűrővel és többszöri mosással jutottam a rögzített enzimkészítményhez. Végeztem kontrol vizsgálatot is, mely során (hordozó nélkül) 2,2 ml Pectinex enzimkészítményt 50 ml pufferrel hígítottam.



11. ábra: Enzimpreparátum rögzítésének folyamatábrája

3.3.2.2 Fehérjetartalom meghatározás

Az enzimrögzítés hatékonyságának vizsgálatára a fehérjetartalom változását is meghatároztam, amelyhez a festékmegkötődésen alapuló Bradford módszert (1976) alkalmaztam. A módszer elve a Coomassie Brilliant Blue G250 nevű kék színű festék maximális abszorbanciájának 465 nm-ről 595 nm-re való tolódása fehérjéhez történő kötődés esetén. Ennek során mind a hidrofób, mind az ionos kölcsönhatás stabilizálja a festék anionos formáját, előidézve ezzel a látható színváltozást.

A meghatározáshoz kalibrációs egyenest vettem fel, amihez hígítási sort készítettem 5 µg/ml BSA (Bovine Serum Albumin) törzsoldatból mikrotiter lemezbe bemérve. Mindegyik hígítási taghoz bemértem 200-200 µl Bradford reagenst (Coomassie Brilliant Blue G250) és körülbelül 10 percig állni hagytam a szobahőmérsékleten a megfelelő színintenzitás kialakulásához. A hígítási sor mellé a rögzítés után megmaradt permeátum és az előzőleg elkészített kontrol mintát mértem be a mikrotiter lemezbe. A kontrol minta elkészítéséhez 2,2 ml enzimkészítményt és 50 ml 5,5 pH-jú McIlvaine puffert kevertem össze. Mindegyik minta esetén három párhuzamos mérést végeztem. A bemért minták abszorbanciáját mikrotiter olvasó (Bio-Rad 550) segítségével 595 nm-n mértem meg. A fehérjetartalom

meghatározáshoz szükséges hígítási sort (kalibrációs egyenes felvételéhez) és egyéb mintákat a 3. táblázatban látható séma szerint állítottam össze.

3. táblázat: A fehérjetartalom meghatározáshoz összeállított minták

3x	Hígítási sor					
Desztillált víz (µl)	0	2	4	6	8	10
BSA (µl)	10	8	6	4	2	0

A mintában lévő fehérjemennyiség a következő képlet alapján határozható meg:

$$\text{Fehérjetartalom (mg/ml)} = \frac{(A_{\text{minta}} - A_{\text{vak}}) \cdot \text{hígítás}}{\text{kalibrációs egyenes meredeksége}}$$

A fehérjetartalom mérés az enzimrögzítés hatékonyságának megállapítása céljából történt. A kontrol minta (megfelelően hígított szabad enzimpreparátum) és a rögzítés után visszamaradt permeátum fehérjetartalmának meghatározásával kiszámolható a rögzítési hatékonyság:

$$\text{Rögzítési hatékonyság(\%)} = \frac{\text{kontrol minta fehérjetart.} - \text{permeátum fehérjetart.}}{\text{kontrol minta fehérjetart.}} \cdot 100$$

3.3.2.3 Hidrolízis aktivitás meghatározása

A rögzített és szabad enzim hidrolízis aktivitásainak meghatározása 60 °C-on és pH 5,0-n (McIlvaine pufferrel), illetve 15 mM p-nitrofenil tartalmú szintetikus szubsztrátumokon történt, amelyek a következők voltak: p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid, p-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid, p-nitrofenil- α -D-glükopiranozid. A hidroláz aktivitás megállapítása a felszabaduló p-nitrofenol mennyisége alapján történt, amely az oldatot sárgaszínűvé változtatja, ennek intenzitása arányos a felszabadult mennyiséggel. Az aktivitásméréshez előállított reakció elegyeket a 4. táblázat mutatja.

4. táblázat: Enzimaktivitás méréshez készített reakció elegyek sémája

	McIlvaine puffer (ml)	Desztillált víz (ml)	Szubsztrát (ml)	Enzim (ml) /Rögzített enzim (g)
Műszervak	0,4	0,6	-	-
Szubsztrátvak	0,4	0,1	0,5	-
Enzimvak	0,4	0,5	-	0,1
Minta	0,4	-	0,5	0,1

A reakciókat 5 percig futtattam, amiket 5 ml 0,1 M Na₂CO₃ oldattal állítottam le. A reakció elegyek abszorbanciáját 405 nm-en mértem meg mikrotiterolvasó készülék segítségével. A kapott abszorbancia értékekből az enzimaktivitásokat az alábbi képlet szerint határoztam meg:

$$\text{Aktivitás } \left(\frac{\text{IU}}{\text{ml}} \right) = \frac{(A_r - A_{EV} - A_{SV}) \cdot h \cdot V_r}{V_m \cdot t \cdot \text{kalibrációs egyenes meredeksége}}$$

ahol A_r a reakció abszorbanciája, A_{EV} az enzimvak abszorbanciája, A_{SV} a szubsztrátvak abszorbanciája, h az enzim hígítási foka, V_r a reakció térfogata (1ml), V_m a reakció indításához alkalmazott enzim mennyiség (0,1 ml), illetve t a reakció idő (5 perc) és a kalibrációs egyenes meredeksége 2,559 (Havas, 2008).

A hidrolízis aktivitás meghatározásának segítségével szintén megállapítottam a rögzítési hatékonyságot:

$$\text{Rögzítési hatékonyság (\%)} = \frac{\text{Rögzített enzim aktivitása}}{\text{Kontrol minta aktivitása}} \cdot 100$$

A pH és hőmérséklet hatását is vizsgáltam mind a szabad, mind a rögzített preparátum hidrolízis aktivitására, melyet pH 4,5-7,0 és 50-80 °C tartományban vizsgáltam. Ebben az esetben az egyes paraméterek esetében mért relatív aktivitásokat hasonlítottam össze.

$$\text{Relatív aktivitás (\%)} = \frac{\text{adott paraméteren mért aktivitás}}{\text{maximális aktivitás}} \cdot 100$$

3.3.2.4 A szabad és a rögzített Pectinex ultra SP-L enzimmészítmény hőstabilitásának vizsgálata

Az enzimmészítmény stabilitásának vizsgálatához 0,1 g rögzített enzimet (0,5 ml 5,5 pH-jú McIlvaine pufferben) és 0,1 ml szabad enzimet (szintén 5,5 pH-jú 0,4 ml McIlvaine

pufferben) több napig inkubáltam 60 °C-on, 100 rpm fordulatu rázatás mellett. A mintavétel naponta történt. Az enzimminták aktivitását szintén a korábban említett, p-nitrofenol felszabadulásán alapuló módszer szerint vizsgáltam meg. Az összehasonlításhoz a relatív aktivitás értékeket az alábbi módon határoztam meg:

$$\text{Relatív aktivitás (\%)} = \frac{\text{adott napon mért aktivitás}}{\text{kiindulási aktivitás}} \cdot 100$$

3.3.2.5 Biokonverzió megvalósítása rögzített enzimpreparátummal

Az oligoszacharidok szintézisét pH 5,0-n, 60 °C-on, 1 ml térfogatban, 15 g/100ml szubsztrátum koncentráció esetében vizsgáltam. A biokonverzióhoz felhasznált szénhidrát szubsztrátumok: cellobióz, glükóz, galaktóz, laktóz, laktulóz, maltóz, maltulóz, mannóz, melibióz, palatinóz, szacharóz, trehalóz és turanóz. A reakció indítását 0,4 g rögzített enzimkészítménnyel végeztem el. Bizonyos időközönként 50 µl mintát vettem, és 10 perces forralással állítottam le a reakciót. A rögzített enzimkészítmény oligoszacharid szintetizáló képességét vékonyréteg- kromatográfia (TLC), illetve HPLC technikával vizsgáltam.

3.3.2.6 Szénhidrátok minőségi és mennyiségi meghatározása

A biokonverzió során keletkezett termékek minőségi összetételét **TLC** módszerrel követtem nyomon.

A TLC elvégzéséhez és értékeléséhez az alábbi körülményeket használtam:

- Állófázis (adszorbens): MERCK DC-Alufolien Kieselgel 60F₂₅₄ szilikagél réteg (20x20 cm, 0,2 mm vastagságú)
- Futtatószer (eluens):
ecetsav (96%): kloroform : desztillált víz = 35 : 30 : 5 (ml) (Ugrinovits 1980)
- Mintafelvétel: A mintákból 1 µl-eket pontokban vittem fel a réteg startvonalára.
- Futtatás ideje: 90 perc
- Előhívószer: 0,3 g/100ml N-(1-naftil)-etilén-diamin-dihidroklorid, 5 V/V% H₂SO₄, 94,7 V/V% metanol (Bounias, 1980). Az előhívószerrel való festés után a lapot 10 percig szárítószekrényben szárítottam a színintenzitás növelése céljából.

A biokonverzió során képződött termékek mennyiségi vizsgálatát **HPLC** technikával végeztem el.

Berendezés (12. ábra) felépítése:

- 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.



12. ábra: Surveyor HPLC berendezés

- Izokratikus áramlás: az Aminex oszlopok eluálása desztillált vízzel vagy hígított szerves savval történik.
- Az Aminex HPX-87H típus elsősorban szénhidrátok, szerves savak, illékony zsírsavak, rövidláncú zsírsavak, alkoholok, ketonok és számos semleges anyagcsere-melléktermék kimutatására szolgál.

Futtatás paramétere:

- Futtatás ideje: 25 perc
- Mozgófázis: 0,005n H₂SO₄
- Minta felvitel mennyisége: 3-25 µl
- Detektor hőmérséklete: 45°C
- Oszlop hőmérséklete: 45°C
- Áramlási sebesség: 0,6 ml/min

3.4 Eredmények és értékelésük

3.4.1 Az enzim rögzítése és hatékonyságának meghatározása

Kutatómunkám során alkalmazott enzimkészítmény fruktozil-transzferáz és transzgalaktozidáz aktivitását már számos tanulmány bizonyította. Ezen aktivitások frukto- és galakto-oligoszacharidok előállítására adnak lehetőséget (del Val *et al.*, 2001; Hang & Woodams, 1996; Csanádi & Sisak, 2008; Montilla *et al.*, 2012; van Casteren *et al.*, 2000; Guerrero *et al.*, 2013; Cardelle-Cobas *et al.*, 2008). Korábbi tanszéki kísérletek bizonyították, hogy a készítmény α -glükózidáz és α -galaktozidáz aktivitással is rendelkezik. A munkám során Nguyen és munkatársai (2011) alapján leírtak szerint rögzítettem az enzimkészítményt és vizsgáltam a rögzült fehérjetartalmat, az α -glükózidáz és α -galaktozidáz, valamint β -galaktozidáz enzimek rögzítési hatékonyságát.

Eredményeimet az 5. táblázat mutatja.

5. táblázat: Rögzítési hatékonyság a fehérjetartalom, valamint az enzimaktivitások szerint

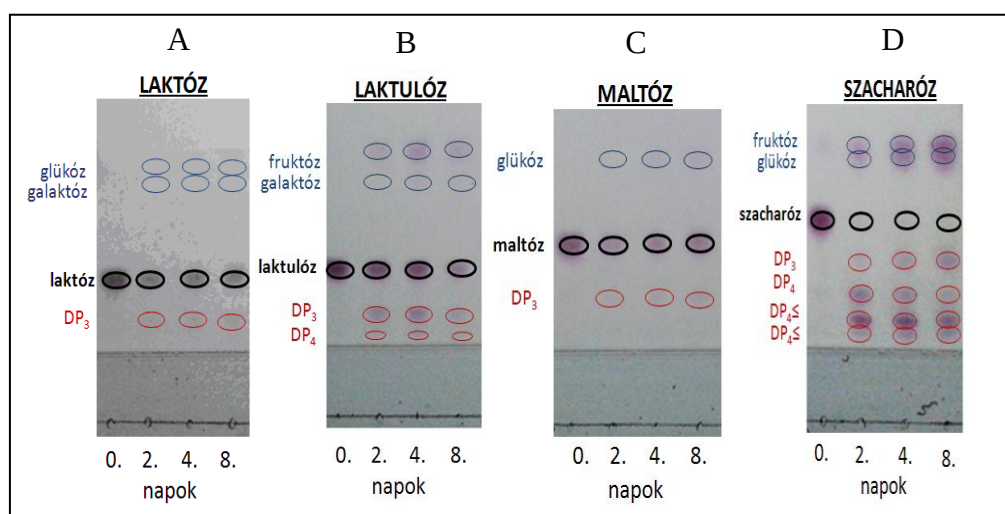
	α -glükózidáz (U)	β -galaktozidáz (U)	α -galaktozidáz (U)	fehérje (mg)
Szabad enzimkészítmény	76,42	2084	2041	64,8
Rögzített enzimkészítmény	2,1	11,24	10,84	26,27
Rögzítési hatékonyság (%)	0,53	0,54	2,76	40,5

Látható, hogy a kapott aktivitásokat tekintve az α -glükózidáznál 0,53%-os, a β -galaktozidáznál 0,54 %-os, illetve az α -galaktozidáznál 2,76 %-os rögzítési hatékonyságot értem el, míg a fehérjetartalom alapján 40,5%-ban sikerült rögzíteni a készítményt. A Pectinex ultra enzimkészítményben található enzimeket és azok rögzíthetőségét más kutatók is vizsgálták. Tanriseven és Aslan (2005; 2007) Eupergit C (aktív epoxi-csoportokkal rendelkező akril-gyöngy) hordozóra kovalens kötéssel rögzítették a preparátum fruktozil-transzferáz, illetve β -galaktozidáz enzimét. A fruktozil-transzferáz esetében optimálták az enzim-hordozó arányt, mellyel 96 %-os rögzítési hatékonyságot sikerült elérniük, a β -galaktozidáz enzim esetében pedig 100%-os hatékonyságot értek el. Ghazi és munkatársai

(2005) fruktozil-transzferáz enzimét Sepabeads EC-EP3 (aktivált epoxi-csoporttal rendelkező) adszorbensre rögzítették, mellyel 25,9 U/g aktivitást értek el. Legutóbb 2013-ban Calandri és munkatársai (2013) is rögzítették a Pectinex eredetű β -galaktozidáz enzimét, amelyhez CNBr (cianogén-bromid)-dal aktivált sepharose és glioxil-agaróz hordozót használtak fel. Az általuk elért rögzítés hatékonyság az előbbi esetben 30%-os, az utóbbi esetben 95%-os volt, miközben az enzimaktivitás rendre 95%-ban, illetve 61%-ban maradt meg. Magyar kutatók is (Csanádi & Sisak, 2008) tanulmányozták a preparátumot, és fruktozil-transzferáz enzimét rögzítették Amberlit IRA 900 anioncserélő gyantára, az általuk előállított enzimpreparátum 15,6 U/g fruktozil-transzferáz aktivitással rendelkezett.

3.4.2 A rögzített enzimkészítmény oligoszacharid szintetizáló képessége különböző szubsztrátumokon

Kutatómunkámban kíváncsi voltam arra is, hogy a rögzített készítmény milyen szubsztrátumokon képes oligoszacharidot előállítani. Korábbi tanszéki tanulmányok azt mutatták, hogy a preparátummal számos oligoszacharid szintetizálható mono- és diszacharidon. Ezek tükrében a következő szénhidrátok esetében vizsgáltam a rögzített enzimkészítményt: cellobióz, galaktóz, glükóz, laktóz, laktulóz, maltóz, maltulóz, mannóz, melibióz, palatinóz, szacharóz, trehalóz és turanóz. Az oligoszacharid képződés vizsgálatához 8 napos biokonverziót végeztem és TLC módszerrel követtem nyomon a szénhidrát összetételt. Eredményeimet a 13. ábrán mutatom be.

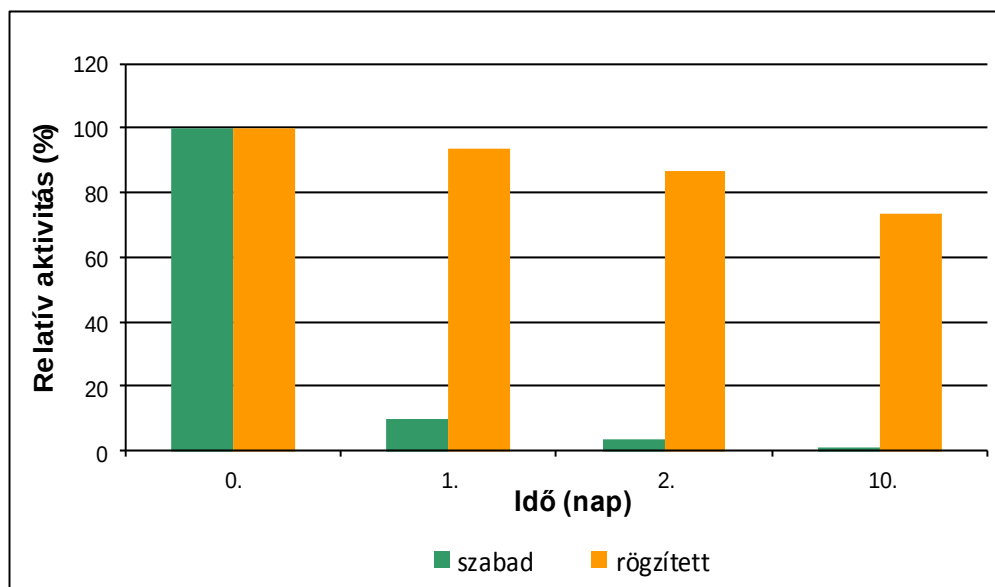


13. ábra: A rögzített enzimkészítménnyel történő oligoszacharid szintézis különböző szubsztrátumokon

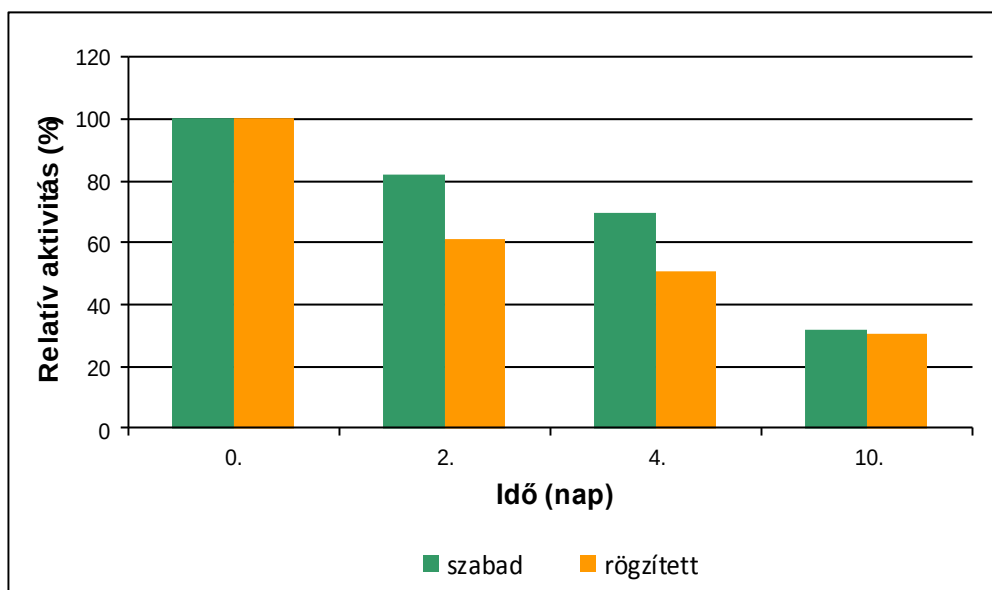
Eredményeimmel megerősítettem, hogy sikeresen rögzítettem a Pectinex ultra β -galaktozidáz enzimét. Ezt bizonyítja, hogy mind laktóz, mind laktulóz esetében történt oligoszacharid szintézis (13.A, 13.B ábra). Érdekes eredménynek mondható, hogy laktulóz esetében jobb transzfer aktivitást detektáltam. A laktóz esetében egy transzfer termék (triszacharid), míg laktulóz esetében kétféle (tri- és tetraszachrid) transzfer termék keletkezett. A 13.C ábra jól mutatja, hogy rögzített készítmény rendelkezik α -glükózidáz, illetve glükozil-transzferáz aktivitással is, ugyanis a maltóz szubsztrátumon a biokonverzió során glükózt, illetve glükó-oligoszacharidot (DP₃) detektáltam. Elmondható, hogy a szacharóz is szubsztrátuma az immobilizátumnak (13.D). Ebben az esetben a TLC módszerrel négyféle oligoszacharidot sikerült kimutatnom. A cellobióz, galaktóz, glükóz, maltulóz, mannóz, melibióz, palatinóz, trehalóz és turanóz szubsztrátumokon nem detektáltam sem hidrolízis, sem oligoszacharid termékeket.

3.4.3 A rögzített α -glükózidáz és β -galaktozidáz hőstabilitása

Tekintve, hogy kimutattam a rögzített preparátum α -glükózidáz és a β -galaktozidáz aktivitását, ezen enzimek esetében a hőstabilitást is megvizsgáltam mind szabad, mind rögzített állapotban. A hőstabilitás vizsgálatához 60°C-os vízfürdőt alkalmaztam, 100 rpm fordulatú rázatás mellett. Ezen eredményeim a 14. illetve a 15. ábrán láthatóak.



14. ábra: A rögzített és a szabad α -glükózidáz enzim hőstabilitásának összehasonlítása



15. ábra: A rögzített és a szabad β -galaktozidáz enzim hőstabilitásának összehasonlítása

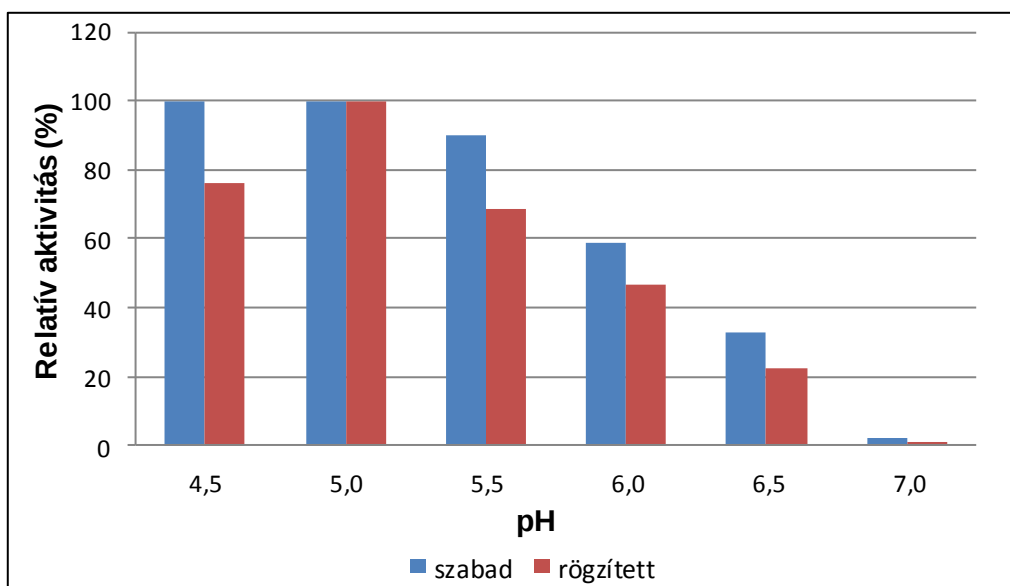
Az α -glükózidáz esetén egyértelműen látható, hogy a rögzítés hatására nőtt a stabilitása, mint szabad állapotában, hiszen már az 1. napra a szabad enzim aktivitása 10% alá csökkent, míg rögzítve az enzim aktivitása kb. 93%-ban megmaradt. Ez az aktivitás a 10. napon is csak kb. 30%-kal csökkent. A β -galaktozidáz esetében viszont az figyelhető meg, hogy az α -glükózidáz enzimmal ellentétben a szabad enzim stabilabbnak bizonyult, mint a rögzített változata. Az aktivitások különbsége azonban a szabad és a rögzített β -galaktozidáz enzim között minimális volt (10-20%) a vizsgálat 10. napján.

Egyes irodalomban ettől eltérő eredményt tapasztaltak a rögzített β -galaktozidáz enzim hőstabilitásával kapcsolatban. Többek között Hernaiz és Crout (2000), akik *Bacillus circulans* eredetű β -galaktozidázt Eupergit C hordozóra rögzítették, amelynek hatására stabilabb lett az enzim, mint szabad állapotában. Továbbá Torres és munkatársai (2003) is jelentős aktivitásnövekedést figyeltek meg, viszont ők az *Aspergillus oryzae* eredetű enzimet aktivált epoxi-amino-csoporttal rendelkező Sepabeads adszorbensre rögzítették.

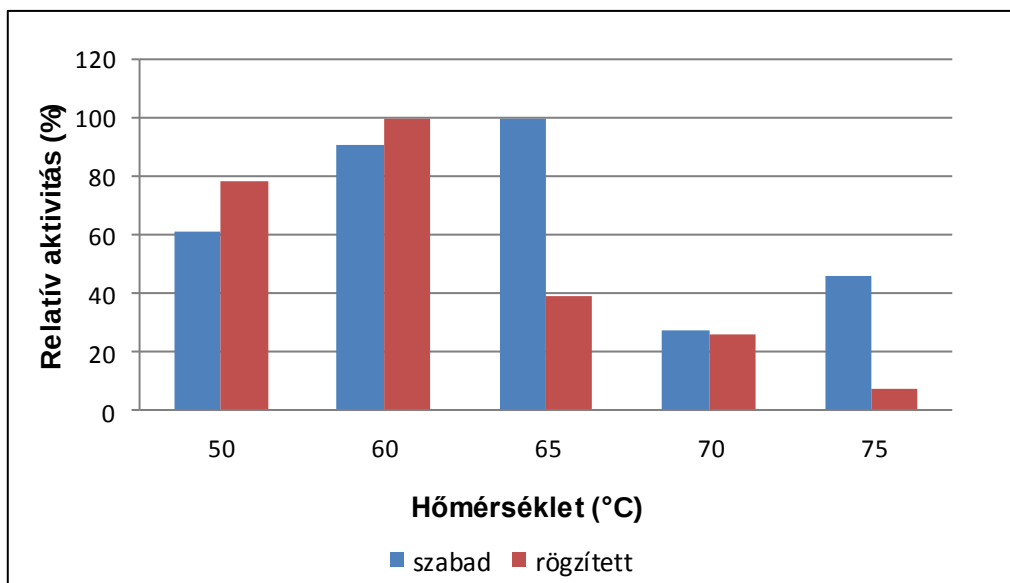
3.4.4 A pH és a hőmérséklet hatása a rögzített β -galaktozidáz enzimre

A TLC vizsgálatok eredményei alapján a Pectinex ultra β -galaktozidáz enzimét tartottam érdemesnek tovább tanulmányozni. Meghatároztam a rögzített enzim hidroláz aktivitásának pH, illetve hőmérséklet optimumát, összevetve a szabad enzim optimaival. A pH hatását pH 4,5-7,0, a hőmérséklet hatását 50-80 °C tartományban vizsgáltam.

Megállapítottam, hogy az optimális pH mind a szabad, mind a rögzített enzim esetén is 5,0 volt (16. ábra), az optimális hőmérsékletek esetében azonban eltérést tapasztaltam. A szabad enzimnek 65 °C, míg a rögzített enzimnek 60 °C volt az optimuma (17. ábra).



16. ábra: pH hatása a szabad és a rögzített β -galaktozidáz enzim aktivitására



17. ábra: Hőmérséklet hatása a szabad és a rögzített β -galaktozidáz enzim aktivitására

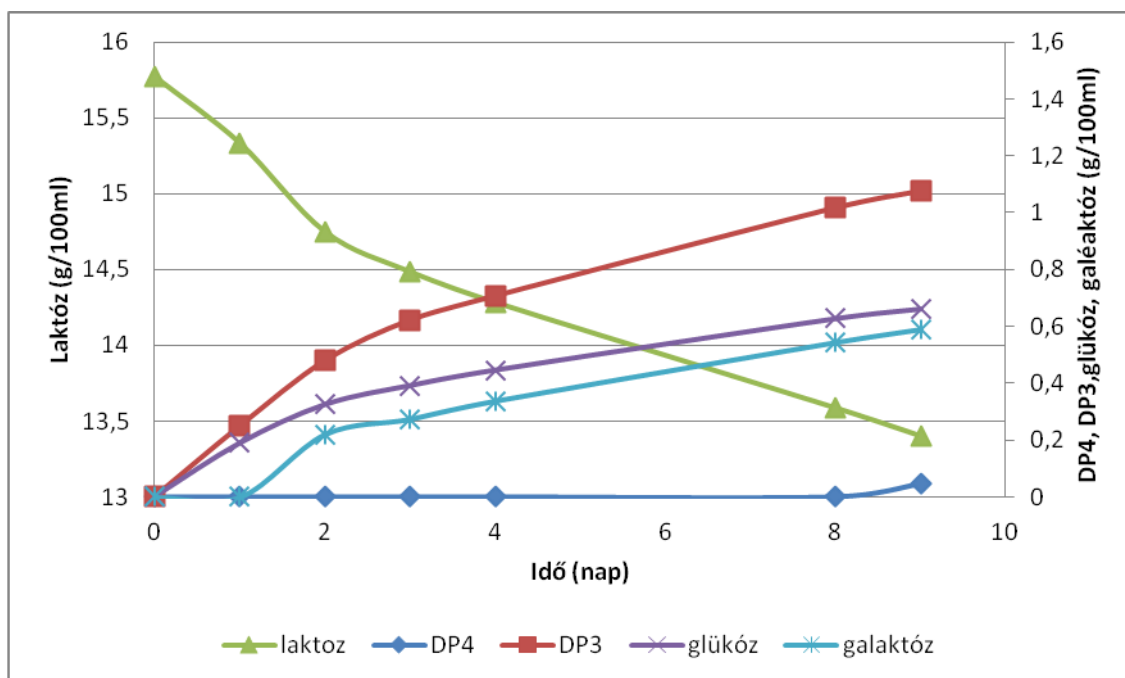
Eredményeim megegyeznek Aslan és Tanriseven (2007) eredményeivel, akik Eupergit C hordozóra kovalens kötással rögzítették a β -galaktozidáz enzimet. Ők pH 4,0–5,0 és 55–60 °C tartományban határozták meg a rögzített enzim optimális körülményeit, mely az ő esetükben megegyezett a szabad enzim esetén meghatározott optimummal. Demirel és munkatársai (2004) az enzimpreparátumot mágneses duolit-polisztiiren részecskékre rögzítették, és az általuk megállapított pH optimum pH 6,0 és a hőmérséklet optimum 65°C volt.

3.4.5 Laktózon és laktulózon történő biokonverzió vizsgálata

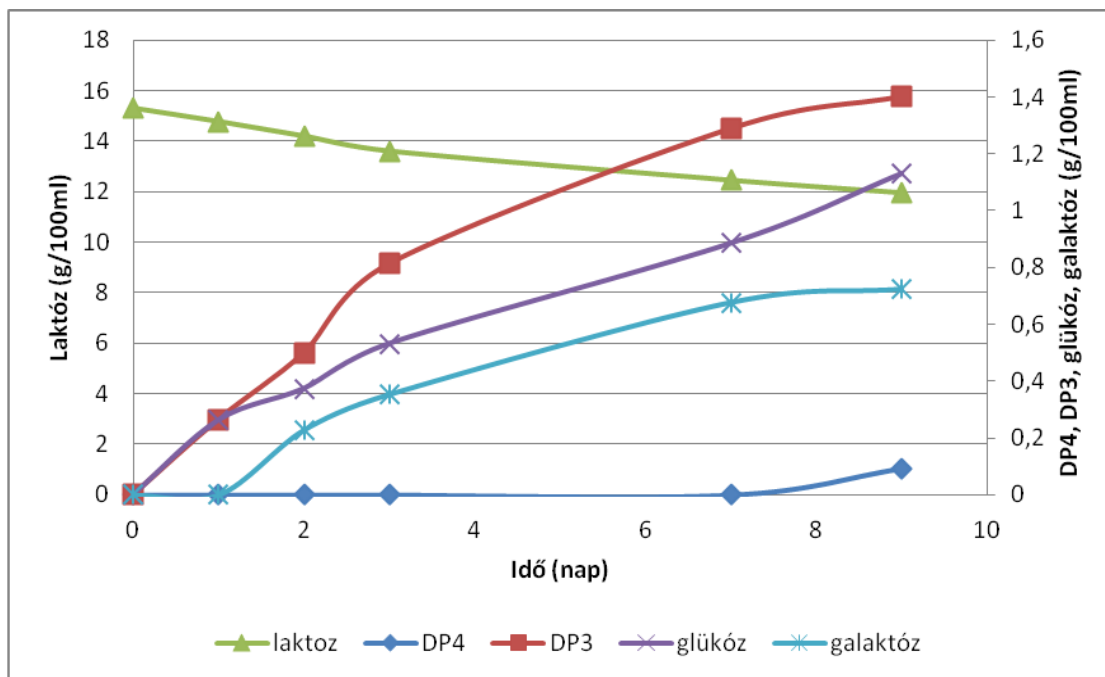
Kutatómunkám során biokonverziót is indítottam a rögzített β -galaktozidáz enzimmal laktóz és laktulóz szubsztrátumon. A képződött termék(ek) analízisére HPLC technikát alkalmaztam. A biokonverziót kétféle módon vizsgáltam, rázatott és rázatás nélküli inkubálással. A 18. és 19. ábrán a laktózon történő biokonverziók, illetve 20. és 21. ábrán a laktulózon történő biokonverziók eredményei láthatók.

Laktóz szubsztrátum

Jól látható, hogy mind rázatással, mind rázatás nélkül keletkeztek hidrolízis (glükóz és galaktóz), illetve transzfer termékek. A biokonverzió során mindkét esetben nagyobb mennyiségben keletkezett glükóz, mint galaktóz. Ezzel alátámasztottam, hogy az oligoszacharid termékek keletkezése a galaktozil transzfer aktivitásnak köszönhető. Az is megfigyelhető, hogy a transzfer reakció fő termékei a triszacharidok (DP₃), emellett kis mennyiségű tetraszacharid (DP₄) is képződött.



18. ábra: Szénhidrát összetétel változása 15 g/100ml koncentrációjú laktóz szubsztrátumon rázatás nélkül

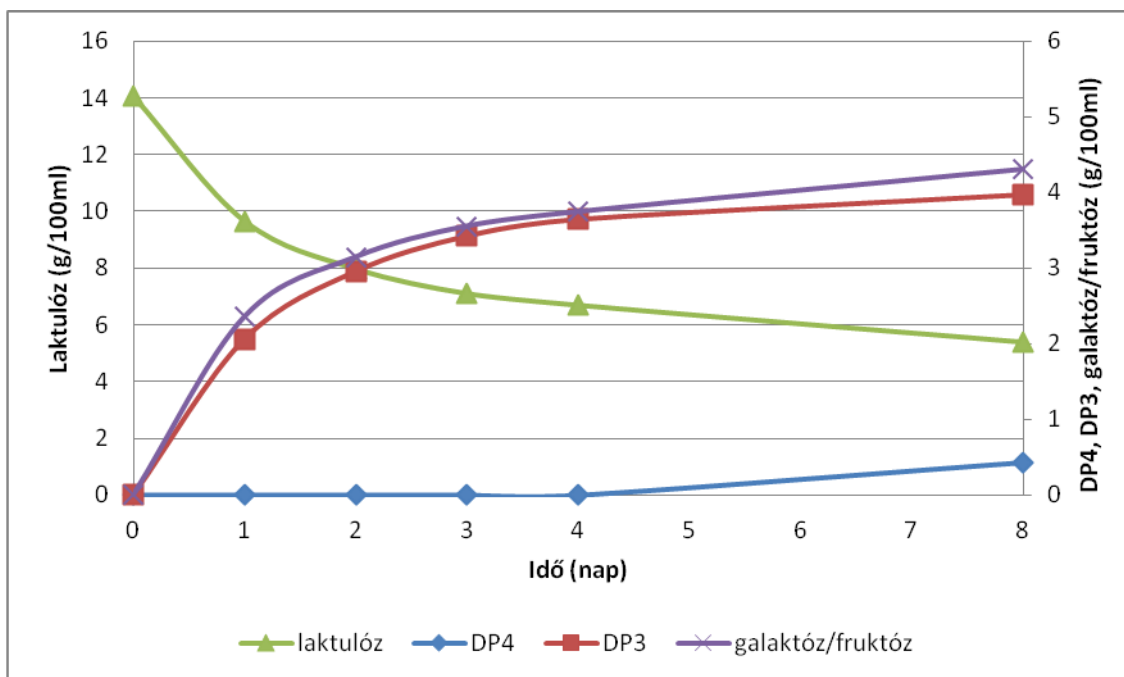


19. ábra: Szénhidrát összetétel változása 15 g/100ml koncentrációjú laktóz szubsztrátumon rázatás esetén

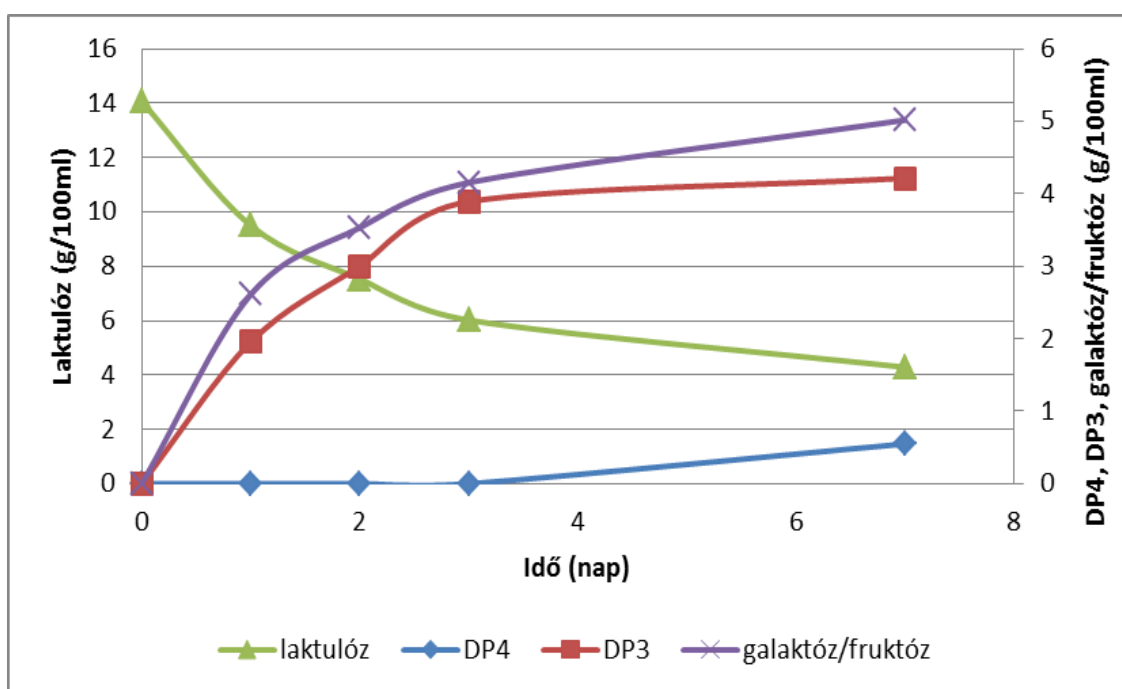
Megállapítható, hogy a rázatás hatással van az oligoszacharidok képződésére. Rázatás nélkül a 9. napon 1,07 g/100ml DP₃ és 0,046 g/100ml DP₄ (18. ábra), míg rázatás alkalmazásával ugyanennyi nap alatt 1,4 g/100ml DP₃ és 0,093 g/100ml DP₄ (19. ábra) keletkezett. Az is megfigyelhető, hogy a tetraszacharidok (DP₄) mennyisége a rázatás esetén kb. egy nappal korábban jelentek meg, mint a rázatás nélküli esetben.

Laktulóz szubsztrátum

Laktulóz-oligoszacharidok rögzített enzimmal történő előállításáról még nem jelent meg publikáció, ezért kíváncsi voltam arra, hogy az általam rögzített β -galaktozidáz enzim alkalmazható-e ezen oligoszacharidok előállítására. A laktózhhoz hasonlóan ezen a szubsztrátumon is a DP₃ oligoszacharidok képződése volt jelentős. Azt tapasztaltam, hogy a rázatás a laktulóz szubsztrátum esetén is kedvezően befolyásolta az oligoszacharid képződést. A rázatás nélküli kísérleteknél a 8. napon 3,97 g/100ml triszacharid, illetve 0,42 g/100ml tetraszacharid termék (20. ábra) keletkezett. Rázatás esetén pedig már a 7. napon 4,22 g/100ml DP₃ és 0,55 g/100ml DP₄ oligoszacharid terméket (21. ábra) sikerült elérnem. A DP₄ oligoszacharidok rázatás nélkül a laktulóz szubsztrátum esetén is később jelentek meg, mint rázatást alkalmazva.



20. ábra: Szénhidrát összetétel változása 15 g/100ml koncentrációjú laktulóz szubsztrátumon rázatás nélkül



21. ábra: Szénhidrát összetétel változása 15 g/100ml koncentrációjú laktulóz szubsztrátumon rázatás esetén

Összehasonlítva a laktózon történő oligoszacharid szintézissel a laktulózon kb. négyszer nagyobb hozamot értem el. Felvetődik a kérdés, vajon milyen változást okozott a rögzítés az enzim szerkezetében, melynek köszönhetően a laktulóz szubsztrátumon nagyobb mértékben képes oligoszacharidot szintetizálni.

Elért eredményeim alapján érdemesnek tartom a laktulóz alapú, β -galaktozidázzal történő oligoszacharid képzés további tanulmányozását.

4 ÖSSZEFOGLALÁS

Az elmúlt időszakban az oligoszacharidokkal kapcsolatos kutatások számottevő fejlődése volt megfigyelhető. Ennek oka, hogy e szénhidrátok fontos szerepet töltenek be a táplálkozásban, bizonyított jótékony élettani hatásuknak köszönhetően. Az oligoszacharidok előállítása mind kémiai, mind enzimes módszerrel lehetséges. Általában az enzimes módszert részesítik előnyben, hiszen az enzimek régió- és sztereospecifitással rendelkeznek, illetve az enzimek rögzíthetőségével költséghatékonyra tehető a termék előállítása.

Jelenleg már számos oligoszacharid enzimes előállítása iparilag megvalósított, azonban vannak olyan oligoszacharidok, amelyek előállíthatóságáról, illetve élettani hatásáról még keveset tudunk, ilyenek pl. a laktulóz alapú oligoszacharidok.

A TDK dolgozatom célja volt a Pectinex ultra kereskedelmi enzimek készítmény rögzítése és a rögzített enzim vizsgálata, különös tekintettel β -galaktozidáz aktivitásra és a laktulózra történő oligoszacharid szintézisre. A céloom elérésére a tanszéken már (inulináz enzim esetében sikeresen) alkalmazott módszert választottam, amely során az enzimfehérjét kovalens kötéssel rögzítettem kitozán hordozóhoz. A hordozó kialakításához glutáraldehidet alkalmaztam.

A vizsgálati eredményeim azt mutatták, hogy a Pectinex ultra enzimek készítmény összfehérje tartalmának 40,5 %-a rögzült a kitozán hordozóhoz. A rögzített preparátum rendelkezett α -glükózidáz, α -galaktozidáz és β -galaktozidáz aktivitással. Emellett kimutattam az immobilizátum transzferáz aktivitását több szubsztrátumon, melyek a következők voltak: laktóz, laktulóz, maltóz és szacharóz. A cellobióz, a galaktóz, a glükóz, a maltulóz, a melibióz, a mannóz, a palatinóz, a trehalóz és a turanóz viszont nem szubsztrátumai a rögzített enzimek készítménynek. Vékonyréteg kromatográfiás módszerrel megállapítottam, hogy laktózon triszacharidok, laktulózra tri- (DP_3), illetve tetraszacharidok (DP_4) szintetizálhatók a β -galaktozidáz galaktozil-transzferáz aktivitásának köszönhetően.

Megvizsgáltam a pH és a hőmérséklet β -galaktozidáz aktivitására gyakorolt hatását is és megállapítottam, hogy a rögzített preparátum pH és hőmérséklet optimuma pH 5,5 illetve 60 °C volt. Továbbá vizsgáltam a rögzített és szabad enzimek készítményben lévő α -glükózidáz és β -galaktozidáz enzimek hőstabilitását, amely során azt tapasztaltam, hogy az α -glükózidáz rögzített enzimeként a hővel szemben jóval stabilabb volt, mint szabad enzimeként, míg a β -galaktozidáz esetén hő hatására a rögzített enzim veszítette el nagyobb mértékben az aktivitását, viszont ez a stabilitás különbség minimális volt (10-20%).

A biokonverziós kísérletek (15 g/100ml szubsztrátum koncentráció mellett, 0,4 g/ml rögzített enzimet, valamint 60 °C és pH 5,0 paramétereket alkalmazva), laktóz szubsztrátum esetén 1,4 g/100ml DP₃, illetve 0,093 g/100ml DP₄, laktulóz szubsztrátumon pedig 4,22 g/100ml DP₃, illetve 0,55 g/100ml DP₄ oligoszacharid terméket eredményezett. A két biokonverziót összehasonlítva, egyértelműen megállapítható, hogy a rögzített β -galaktozidázzal laktulózon nagyobb oligoszacharid hozam érhető el.

Elért eredményeim ígéretesnek bizonyulnak és újabb ismereteket nyújtanak a Pectinex ultra enzimkészítmény katalízis tulajdonságairól, rögzíthetőségéről. Ezen ismeretek jó alapot adhatnak egy laktulóz alapú oligoszacharid szintézis kidolgozására. Továbbfejlesztés érdekében az alábbi vizsgálatokat tartom szükségesnek: biokonverzió optimalása és léptéknövelése.

5 FELHASZNÁLT IRODALOM

- Aider, M., de Halleux D. (2007): Isomerization of lactose and lactulose production: review. *Trends in Food Science & Technology*, 18 (7): 356-364
- Ajisaka, K., Yamamoto, Y.(2002): Control of regioselectivity in the enzymatic syntheses of Oligosaccharides using glycosides. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 14: 1–11
- Alander, M., Mättö, J., Kneifel, W., Johansson, M., Kögler, B., Crittenden, R., ... Saarela, M. (2001): Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 11 (10): 817-825
- Amine A., Moscone D., Bernardo, R. A., Marconi E., Palleschi G. (2000): A new enzymatic spectrophotometric assay for the determination of lactulose in milk. *Analytica Chimica Acta.*, 406 (2): 217-224
- Aslan Y.,Tanriseven A (2007): Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce galactooligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45: 73-77
- Berger, J.L., Lee, B.H., Lacroix, C. (1995): Oligosaccharides synthesis by free and immobilized β -galactosidases from *Thermus aquaticus* YT-1. *Biotechnol. Lett.*, 17: 1077–1080
- Biró E., Gyenis J., Sisak Cs. (2012): Immobilization of β -D-galactosidase on nanostructured carriers and characterization of the obtained biocatalysts (doktori értekezés). Pannon Egyetem, Műszaki Kémiai Kutatóintézet
- Bloch, A., Thomson, C. A. (1995): Position of the American Dietetic Association: phytochemicals and functional foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 95: (4): 493-496
- Bouhnik, Y., Flourié, B., D'Agay-Abensour, L., Pochart, P., Gramet, G., Durand, M., Rambaud, J. C. (1997): Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. *The Journal of nutrition*, 127 (3): 444-448
- 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 (2): 291-295

- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72 (1): 248-254
- Brena, B. M., Batista-Viera, F. (2006): Immobilization of enzymes. In: Immobilization of enzymes and cells. *Humana Press*, 15-30
- Calandri, C., Marques, D. P., Mateo, C., Carrascosa, A. V., Guisán, J. M. (2013): Purification, immobilization, stabilization and characterization of commercial extract with β -galactosidase activity. *J. Biocatal Biotransformation*, 2: 1. doi: 10.4172/2324.9099
- 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
- Cardelle-Cobas, A., Martínez-Villaluenga, C., Villamiel, M., Olano, A., Corzo, N. (2008): Synthesis of oligosaccharides derived from lactulose and Pectinex Ultra SP-L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (9): 3328-3333
- Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., Yue, L. (2009): Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82 (2): 211-220
- 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
- Chonan, O., Watanuki, M. (1995): Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 41 (1): 95-104
- Chonan, O., Matsumoto, K., Watanuki, M. (1995): Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption and preventing bone loss in ovariectomized rats. *Biosciences Biotechnology and Biochemistry*, 59 (2): 236-239
- Coutinho, P. M., Henrissat, B. (1999): Life with no sugars. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1 (2): 307-308
- 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. In: Handbook of Probiotics and Prebiotics. ISBN 978-0-470-13544-0
- Csanádi Zs., Sisak Cs. (2008): Production of short chain fructooligosaccharides. *Hungarian Journal of Industrial Chemistry*, 36 (1-2): 23-26

- Del-Val, M. I., Hill, Jr C. G., Jimenez-Barbero, J., Otero, C. (2001): Selective enzymatic synthesis of 6'-galactosyl lactose by Pecitnex ultra SP in water. *Biotechnology Letters*, 23: 1921-1924
- Delzenne, N. M. (2003): Oligosaccharides: state of the art. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62 (01): 177-182.
- Delzenne, N. M., Roberfroid, M. R. (1994): Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. *LWT-Food Science and Technology*, 27 (1): 1-6
- Demirel, D., Özdural, A. R., Mutlu, M. (2004): Preparation and characterization of magnetic duolite-polystyrene composite particles for enzyme immobilization. *Journal of Food Engineering*, 62 (3): 203-208
- Drasar, B. S., Hill, M. J. (1974): Human intestinal flora. Academic Press (London) Ltd., 24/28 Oval Road, London, NW1
- Ebrahimi, M., Placido, L., Engel, L., Ashaghi, K. S., Czermak, P. (2010): A novel ceramic membrane reactor system for the continuous enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Desalination*, 250 (3): 1105-1108
- Ghazi, I., Segura, D., Gómez, A., Fernández-Arrojo, L., Alcalde, M., Yates, M., Royas-Cervantes M. L., Plou F.J., Ballesteros, A. (2005): Immobilisation of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 35(1): 19-27
- Gibson, G. R. (2004): Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition Supplements*, 1(2): 25-31
- Goulas, A. K., Fisher, D. A., Grimble, G. K., Grandison, A. S., Rastall, R. A. (2004): Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextransucrase and dextranase. *Enzyme and Microbial Technology*, 35 (4): 327-338
- Grosova, Z., Rosenberg, M., Rebros, M., Sipocz, M., Sedlackova, B. (2008): Entrapment of β -galactosidase in polyvinyl alcohol hydrogel. *Biotechnol Lett.*, 30: 763-767
- Guerrero, C., Vera, C., Illanes, A. (2013): Optimisation of synthesis of oligosaccharides derived from lactulose (fructosyl-galacto-oligosaccharides) with β -galactosidases of different origin. *Food chemistry*, 138 (4): 2225-2232
- Hang, Y. D., Woodams, E. E. (1996): Optimization of enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. *LWT- Food Science and Technology*, 29: 578-580
- Hernaiz, M. J., & Crout, D. H. (2000): Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 27 (1): 26-32.

- Hidaka, H. (1986): Effect of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora*, 5: 37-50
- Hidaka, H., Hirayama, M., Sumi, N. (1988): A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611 (Biological Chemistry). *Agricultural and Biological Chemistry*, 52 (5): 1181-1187
- Hilliam, M. (1998): The market for functional foods. *International Dairy Journal*, 8 (5-6): 349-353
- Homann, A., Seibel, J. (2009): Towards tailor-made oligosaccharides- chemoenzymatic approaches by enzyme and substrate engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83: 209-216
- Hoschke Á. (2013): Bioreaktorok és rögzített sejtek (előadás diasor). Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Sör- és Szeszípari Tanszék
- Hoschke Á. (2013): Élelmiszer enzimológia (előadás diasor). Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Sör- és Szeszípari Tanszék
- Huerta, L. M., Vera, C., Guerrero, C., Wilson, L., Illanes, A. (2011): Synthesis of galactooligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized β -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry*, 46 (1): 245-252
- Ichikawa, Y., Look, G. C., Wong, C.-H. (1992): Enzyme-catalyzed oligosaccharide synthesis. *Anal. Biochem.*, 202: 215-238
- Irazaqui, G., Villarino, A., Batista-Viera, F., Brena, B. M. (1998): Activity and stability of *Escherichia coli* β -galactosidase in cosolvent systems. *Biotechnology Techniques*, 12 (12): 885-888
- Johansson, E., Hedbys, L., Mosbach, K., Larsson, P. O., Gunnarsson, A., Svensson, S. (1989): Studies of the reversed α -mannosidase reaction in high concentrations of mannose. *Enzyme Microb. Technol.*, 11: 347-352
- Johansson, E., Hedbys, L., Larsson, P.-O., Mosbach, K., Gunnarsson, A., Svensson, S. (1986): Synthesis of mannose oligosaccharides via reversal of the α -mannosidase reaction. *Biotechnol. Lett.*, 8: 421-424
- Kanbe, M. (1992): Cancer control and fermented milk. Tokyo: Nakazawa and Hosono
- Kim, H.S., Lee, D.W., Ryu, E.J., Uhm, T.B., Yang, M.S., Kim, J.B., Chae, K.S. (1999): Expression of the INU2 gene for an endoinulinase of *Aspergillus ficuum* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett.*, 21: 621-623

- Klein, M. P., Fallavena, L. P., Schöffner, J. D. N., Ayub, M. A., Rodrigues, R. C., Ninow, J. L., Hertz, P. F. (2013): High stability of immobilized β -d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Carbohydrate polymers*, 95 (1): 465-470
- Koch, R. B., Geddes, W. F., Smith, F. (1951): The carbohydrates of gramineae. 1. The Sugars Of The Flour Of Wheat (*Triticum vulgare*). *Cereal Chemistry*, 28 (5): 424-430
- Kosaric, N., Asher, Y. J. (1985). The utilization of cheese whey and its components. *Adv. Biochem. Engg.*, 35: 25-60
- Kosáry J. (2013): Bioreaktorok és rögzített sejtek (előadás jegyzet). Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Alkalmazott Kémia Tanszék
- Krajewska, B. (2004): Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35 (2): 126-139
- Kunz, C., Rudloff, S. (1993): Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatrica*, 82 (12): 903-912
- Lee, Y.-J., Kim, C.S., Oh, D.-K. (2004): Lactulose production by β -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64: 787-793
- Lo'pez-Molina, D., Navarro-Martinez, M.D., Melgarejo, F.R., Hiner, A.N.P., Chazarra, S., Rodriguez-Lo'pez, J.N. (2005): Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Phytochem*, 66: 1476–1484
- Losada, M. A., Olleros, T. (2002): Towards a healthier diet for the colon: the influence of fructooligosaccharides and lactobacilli on intestinal health. *Nutrition Research*, 22 (1): 71-84
- Luzzana, M., Agnellini, D., Cremonesi, P., Caramenti, G., De Vita, S. (2003): Milk lactose and lactulose determination by the differential pH technique. *Le Lait*, 83 (5): 409-416
- Maksimainen, M. M., Lampio, A., Mertanen, M., Turunen, O., Rouvinen, J. (2013): The crystal structure of acidic β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60: 109-115
- Mammarella E.J., Rubiolo A.C. (2005): Study of the deactivation of β -galactosidase entrapped in alginate-carrageenan gels. *J Molec Catal B: Enzym*, 34: 7–13.
- Manning, T. S., Gibson, G. R. (2004): Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18 (2): 287-298
- Matella, N. J., Dolan, K. D., Lee, Y. S. (2006): Comparison of galactooligosaccharide production in free enzyme ultrafiltration and in immobilized enzyme systems. *Journal of Food Science*, 71 (7): C363-C368.

- Mattiasson, B., Kaul, R. (1991): Determination of coupling yields and handling of labile proteins in immobilization technology. In: Protein immobilization. Fundamentals and Applications (Taylor, R. F., ed.), *Marcel Dekker*, New York, NY: 161–179
- Maugard, T., Gaunt, D., Legoy, M. D., Besson, T. (2003): Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology Letters*, 25 (8): 623-629
- Mitsuoka, T. (1990): Tales of intestinal microflora. Tokyo: Iwanami Shoten Publisher
- Montilla, A., Ruiz-Matute, A. I., Olano Villén, A., Corzo Sánchez, N. (2012): Synthesis of prebiotic oligosaccharides derived from lactose and lactulose using immobilized beta-galactosidase from *Lactobacillus plantarum*. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL
- 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 Polymers*, 68 (3): 587-597
- Nakazawa, E., Iizumi, K., Kanno, M., (2000): Manufacture of saccharides from cereals by pretreatment with transglutaminase. *Jpn. Kokai Tokyo Koho*, 7
- Nakkharat, P., Haltrich, D. (2006): Lactose hydrolysis and formation of galactooligosaccharides by a novel immobilized beta-galactosidase from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Appl Biochem Biotechnol*, 129-132: 215–225
- Nguyen, Q. D., Rezessy-Szabó, J. M., Czukor, B., Hoschke, Á. (2011): Continuous production of oligofructose syrup from Jerusalem artichoke juice by immobilized endo-inulinase. *Process Biochemistry*, 46 (1): 298-303
- Nilsson, K. G. (1988): Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Trends in Biotechnology*, 6 (10): 256-264
- Numanoglu, Y., Sungur, S. (2004): β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system. *Proc Biochem*, 39: 703–709
- Pan, C., Hu, B., Li, W., Sun, Y.I., Ye, H., Zeng X. (2009): Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β -d-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe_3O_4 -chitosan nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B*, 61 (3-4): 208–215

- Panesar P.S., Kumari S., Panesar R. (2010): Potential applications of immobilized galactosidase in food processing industries. *Enzyme Research*, 1-16. Doi: 0.4061/2010/473137
- Park, Y. K., Almeida, M. M. (1991): Production of fructooligosaccharides from sucrose by a transfructosylase from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7 (3): 331-334
- Parrish, F. W., Talley, F. B., Ross, K. D., Clark, J., Phillips, J. G. (1979): Sweetness of lactulose relative to sucrose. *Journal of Food Science*, 44 (3): 813-815
- Perugino, G., Trincone, A., Rossi, M., Moracci, M. (2004): Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. *Trends in Biotechnology*, 22: 31-37
- Pessela, B.C.C., Mateo, C., Fuentes, M., Vian, A., Garcia, J.L., Carrascosa, A.V., Guisan, J.M., Lafuente, R.F. (2003): The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on sephabeads supports decreases product inhibition complete hydrolysis of lactose in dairy products. *Enzym Microb. Technol.*, 33: 199–205
- Polastro, E. T., Walker, A., Teeuwen, H. W. (1989): Enzymes in the fine chemicals industry: dreams and realities. *Biotechnology*, 7 (12): 1238-1241
- Portaccio, M., Stellato, S., Rossi, S., Bencivenga, U., Mohy Eldin, M. S., Gaeta, F. S., Mita, D. G. (1998): Galactose competitive inhibition of β -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) immobilized on chitosan and nylon supports. *Enzyme and Microbial Technology*, 23 (1): 101-106
- Rastall, R.A., Bucke, C. (1992): Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 10: 253–281
- Rivero-Urgell, M., Santamaria-Orleans, A. (2001): Oligosaccharides: application in infant food. *Early Human Development*, 65: S43-S52
- Roberfroid, M. B. (1997): Health benefits of non-digestible oligosaccharides. In: *Dietary Fiber in Health and Disease*. Springer US: 211-219
- Roberfroid, M. B. (2000): Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71 (6): 1682s-1687s
- Roberfroid, M., Slavin, J. (2000): Nondigestible oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*, 40 (6): 461-480
- Rochat, F., Medjoubi, N., Rumo, G., Heer, C. (1994): Effects of a fructooligosaccharide on the human intestinal microflora. In: 6ème Colloque du Club des Bactéries Lactiques. Université de Lyon I, Poster : 27-29

- Sako, T., Matsumoto, K., Tanaka, R. (1999): Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*, 9 (1): 69-80
- Sevella B. (2011): Biomérnöki műveletek és folyamatok. Budapest, Tipotex kiadó
- 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: -4200-0772-6: 473-500
- Sheu, D.C., Li, S.Y., Duan, K.J., Chen, C.W.(1998): Production of galactooligosaccharides by β -galactosidase immobilized on glutaraldehyde treated chitosan beads. *Biotechnol Techn.*, 12: 273–276
- Shimuhara, Y. (1987): The function of galactooligosaccharides and their application for food. *Food Chem.*, 6: 87-94
- Shin, H. J., Park, J. M., Yang, J. W. (1998): Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Bullera singularis* β -galactosidase immobilized in chitosan beads. *Process Biochemistry*, 33 (8): 787-792
- Simon, G. L., Gorbach, S. L. (1987): Intestinal flora and gastrointestinal function. *Physiology of the gastrointestinal tract.*, 2
- Tanaka, R., Takayama, H., Morotomi, M., Kuroshima, T., Ueyama, S., Matsumoto, K., Kuroda, A. And Mutai, M. (1983): Effects of administration of tos and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human fecal flora. *Bifidobact Microflora*, 2 (1): 17-24
- Tanriseven, A, Dogan, S. (2002): A novel method for the immobilization of β - galactosidase. *Proc Biochem*, 38: 27–30
- Tanriseven, A., Aslan, Y. (2005): Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 36 (4): 550-554
- Thiem, J. (1995): Applications of enzymes in synthetic carbohydrate chemistry. *FEMS Microbiology Reviews*, 16 (2-3): 193
- Tokomatsu, H. (1994): Health effects of oligosaccharides. *Food Technol.*, 48 (10): 61-65
- Toone, E. J., Simon, E. S., Bednarski, M. D., Whitesides, G. M. (1989): Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates. *Tetrahedron*, 45 (17): 5365-5422
- Torres, R., Mateo, C., Fernández, Lorente, G., Ortiz, C., Fuentes, M., Palomo, J. M., ... & Fernández-Lafuente, R. (2003): A Novel Heterofunctional Epoxy - Amino Sepabeads for a New Enzyme Immobilization Protocol: Immobilization-Stabilization of β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology Progress*, 19 (3): 1056-1060
- Ugrinovits, M. (1980): Sugar analysis by GC, HPLC, TLC and an enzymatic method - a comparison. *Chromatographia*, 13 (7): 386-394

- van Casteren, W. H., Eimermann, M., van den Broek, L. A., Vincken, J. P., Schols, H. A., Voragen, A. G. (2000): Purification and characterisation of a β -galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with activity towards (modified) exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B39 and B891. *Carbohydrate research*, 329 (1): 75-85
- van Rantwijk, F., Woudenberg-van Oosterom, M., Sheldon, R. A. (1999): Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 6 (6): 511-532
- Voragen, A. G. (1998): Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends in Food Science & Technology*, 9 (8): 328-335
- Wallenfels, K.(1951): Enzymatische synthese von oligosacchariden aus disacchariden. *Naturwissenschaften*, 38 (13): 306-307
- Weijers, C.A.G.M., Frassen, M.C.R., Visser, G.M. (2008): Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 26: 436-456
- Wiseman, A. (1975): Handbook of enzyme biotechnology. *Handbook of enzyme biotechnology*
- Zhang, S., Ohashi, T. (1997): Studies on the optical rotation of whey syrup prepared by immobilized beta-galactosidase. *Food Science and Technology International, Tokyo*, 3 (4): 370-372
- Zhang, S., Imada, K., Ohashi, T. (1998): Preparation of Whey Syrup by Immobilized. BETA.-Galactosidase. *Food Science and Technology International, Tokyo*, 4 (1): 36-39
- Zhou, Q.Z, Chen, X.D, Li, X. (2003): Kinetics of lactose hydrolysis by beta-galactosidase of *Kluyveromyces lactis* immobilized on cotton fabric. *Biotechnol Bioeng*, 81: 127–133
- Zhou, Q.Z.K., Chen, X.D. (2001): Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. *J Food Eng*, 48: 69–74
- Internet: "Design variables / Immomilization methods" (2014),
www.gateway.vpr.drexel.edu/files/hidden/sensr/ch4/4_2f.htm

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani a témavezetőimnek, Dr. Nguyen Duc Quang egyetemi docensnek, Styevkó Gabriella egyetemi tanársegédnek és Nguyen Duc Vuong PhD hallgatónak, akik a segítőkészségükkel, szakmai tudásukkal, valamint hasznos tanácsaikkal hozzájárultak a TDK dolgozatom elkészítéséhez.

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 a TECH_09-A3-2009-0194 és NTP-TDK-13-072 projekteknek a kutatómunkám anyagi háttérének biztosítását.