

# Glikoenzimek az élő szervezetben és a lombikban

GYÉMÁNT Gyöngyi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, 4032 Debrecen, Egyetem tér 1, Magyarország

## 1. Bevezetés

A szénhidrátok mono-, oligo- és poliszacharidok formájában minden élő szervezetben előfordulnak és változatos biológiai funkciókat töltenek be. A régóta ismert víz- és tartalék tápanyag poliszacharidok mellett egyre nagyobb figyelmet kapnak a különböző sejtfelszíni oligoszacharidok (glikoproteinek, glikolipidek), amelyek olyan fontos biológiai folyamatokban vesznek részt, mint a jelátvitel, sejtadhézió, megtermékenyítés és az immunválasz. Biológiai axióma, hogy az élő szervezetben lejátszódó kémiai folyamatokat enzimek katalizálják, így a szénhidrátok szintézise, átalakítása és lebontása számos szénhidrátot ható enzim (glikoenzim) jelenlétét igényli a sejtekben. Először az emberi szervezet, majd egy növény és egy mikroorganizmus néhány fontosabb glikoenzimének szerepéről, ezután (a lombik fogalmát kicsit tágabban értelmezve) az ipari enzimek felhasználásáról, és végül saját *in vitro* vizsgálatainkról adok rövid összefoglalót.

## 2. Glikoenzimek az élő szervezetben

Az enzimek legáltalánosabb csoportosítása az általuk katalizált reakciók típusa alapján történik, az International Union of Biochemistry and Molecular Biology Nevezéktani Bizottsága (NC-IUBMB) által (1. táblázat).

### 1. Táblázat. Glikoenzimek előfordulása a különböző enzimosztályokban

Enzimosztály	Glikoenzim példa
1. Oxido-reduktázok	glükóz-oxidáz, glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
2. Transzferázok	glikoziltranszferázok, glikogén foszforiláz, hexokináz
3. Hidrolázok	glikozidázok, amiláz, celluláz
4. Liázok	poliszacharid liázok
5. Izomerázok	trióz-foszfát izomeráz, glükóz izomeráz
6. Ligázok	ribóz-5-foszfát ammónia ligáz

Glikoenzimet valamennyi enzimosztályban találunk, egyes osztályokban külön csoportja van a glikoenzimeknek, pl. a glikoziltranszferázok és a glikozidázok, míg a ligázok osztályában egyetlen szénhidrátot ható enzim található a ribóz-5-foszfát ammónia ligáz. A glikoenzimek jelentőségének felismerése hívta életre a szénhidrátot ható enzimek adatbázisát, amiben az enzimeket szerkezeti hasonlóságok alapján csoportosítják.<sup>1</sup> A Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) adatbázisban jelenleg közel 400000 enzim található, fele a legrégebbi glikozid hidroláz (GH) családban. Az adatbázis folyamatosan bővül, legújabb enzimesaládjai a poliszacharid-liázok és a szénhidrát-

észterázok. A rendkívül nagy választékból valamennyi szervezet esetében csak néhány, vagy a kutatások, vagy az ipari felhasználás szempontjából fontos enzimet emeltem ki.

A humán enzimek között kitüntetett figyelmet kapnak a táplálék szénhidrátok emésztéséért felelős enzimek. Elsőként a nyálmirigyek által termelt humán nyál  $\alpha$ -amiláz (HSA) találkozunk a táplálékokban található emészthető poliszachariddal, a keményítővel. A HSA többfunkciós fehérjeként képes a fogak felszínéhez, és a szájban található baktériumokhoz, például a *streptococcusokhoz*, kötődni.<sup>2</sup> Ilyen módon alkotórésze a plakknak, ami egy baktériumokat védő biofilm. Az  $\alpha$ -amiláz ilyen kötött formában is aktív, hidrolizálja a keményítőt, és mivel a baktériumok a hidrolízis termékeket használják szénforrásként, az enzim részese a fogszuvasodás folyamatának is. A keményítő emésztésért főként a vékonybélben működő, hasnyálmirigy által termelt  $\alpha$ -amiláz felelős. Ez az enzim szerkezeti szempontból nagyon hasonló a nyál amilázhoz, szekvencia azonossága 97%.<sup>3</sup> Ennek köszönhetően a könnyebben hozzáférhető nyál eredetű enzimet általánosan használják a humán  $\alpha$ -amilázok modelljeként.

A vékonybélben a keményítő hidrolízisének kívül a diszacharidok hidrolízise is megtörténik, amit különböző diszacharidázok, mint a szaharáz, laktáz és maltáz katalizálnak. A szénhidrátok felszívódása monoszacharidok formájában történik, és a véráram szállítja őket a szövetekhez. A glükóz a sejtekben vagy energiatermelésre fordítódik a glikolízis folyamatában, vagy glikogén formájában tárolódik főleg a májsejtekben és az izmokban. A glikogén szintézise és lebontása ellentétesen szabályozott enzimekkel, a glikogén szintáz és a glikogén foszforiláz (GP) katalízisével valósul meg. A glikogén foszforiláz dimer enzim, inaktív, foszforilálatlan GP<sub>b</sub> és aktív, foszforilált GP<sub>a</sub> formában fordul elő. Az enzim a szubsztrátkötő helyen kívül allosztérikus és koenzimkötő helyet is tartalmaz. Az izom GP enzim feladata a glükóz-1-foszfát felszabadítása a glikogén lánc nem redukáló végeiről, glikolízissel történő energiatermeléshez. A máj GP enzim termelte glükóz-1-foszfát viszont izomerizáció, majd foszfátázzal történő hidrolízis után a vér glükózszintjének biztosítását szolgálja. A GP enzim működése így összefüggésbe hozható a cukorbetegség terápiájával.

A növényi glikoenzimek közül, ipari jelentőségük miatt, a két fő növényi szénhidrát a cellulóz és a keményítő lebontásában szerepet játszó enzimeket ismertetem. A cellulóz lebontásában, a növényekben, és a cellulózt táptalajként felhasználó mikroorganizmusokban több hidroláz enzim játszik szerepet a celluláz enzimszisztéma tagjaként. Ezek között találunk a glikozidos kötést a

\* Tel.: 52 512900/22485; fax: 52 518660; e-mail: gyemant@science.unideb.hu

cellulóz lánc belsejében, főként a rendezetlen régióban hasító *endo* enzimeket, és a redukáló vagy nem redukáló végről mono-, vagy diszacharidokat hasító *exo* enzimeket is. A celluláz enzimek fontos szerepet töltenek be a cellulóz alapú bioetanol-gyártás folyamatában. A növényekben tartalék tápanyagként felhalmozott keményítő mobilizálását növényi amilázok végzik. Az árpa csírázásakor  $\alpha$ -amiláz termelődik, ami a humán amilázhoz hasonlóan *endo* hatásmóddal hidrolizálja a keményítő láncokat. A csírázó árpa a maláta, melynek sörgyártásban való felhasználása az ókori Egyiptomig vezethető vissza.<sup>4</sup> Napjainkban a nehezen szabályozható és reprodukálható csíráztatással történő enzimtermelés helyett mikrobiális enzimeket használnak adalékként a sörgyártás során.<sup>5</sup>

A mikroorganizmusok is használnak glikoenzimeket, és több faj extracellulárisan is termel poliszacharid hidrolázokat. Ezek közül több ipari jelentőséggel bír, mint például a *Bacillus licheniformis* mezofil baktérium által termelt hőstabil  $\alpha$ -amiláz (BLA), a keményítő ipar egyik fő enzime.

## 2. Táblázat. Glikoenzimek és termékeik ipari alkalmazása

Enzim	Szubsztrát	Termék	Alkalmazás
Amilázok	Keményítő, amilóz	Oligoszacharidok, glükóz	Keményítőipar, mosószer ipar
Pullulanáz	Amilopektin	Amilóz	Keményítőipar
Glükóz izomeráz	Glükóz	Fruktóz	Élelmiszeripar
Glükóz oxidáz	Glükóz	Glükonolakton	Élelmiszeripar
Cellulázok	Cellulóz	Oligoszacharidok, glükóz	Papíripar, bioetanol, textilipar
Hemicelluláz	Xilánok	Oligoszacharidok, xilóz	Élelmiszeripar
Pektináz	Pektin	Pektin oligomerek	Élelmiszeripar

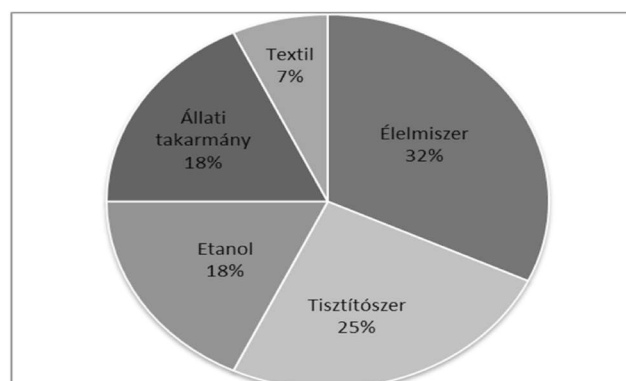
A különböző iparágak részesedését az enzim felhasználásban az 1. ábra kördiagramja mutatja.<sup>8</sup> Látható, hogy az élelmiszeripar a teljes felhasználás harmadát fedi le. Az élelmiszeripar enzimeket és enzimes technológiával előállított szénhidrátokat is használ. Az ipari kenyérgyártási technológiák  $\alpha$ -amiláz enzimet írnak elő adalékként a tésztához. Az  $\alpha$ -amiláz elősegíti az élesztő működéséhez szükséges cukor keletkezését, így lazább szerkezetű lesz a kenyér, a keletkező oligoszacharidok pedig ropogósabb és barnább héjat eredményeznek. A celluláz és pektináz enzimek a gyümölcslé előállításban játszanak fontos szerepet. Segítségükkel a gyümölcsökből több és tisztább lé nyerhető ki. A tisztítószerke előállításával foglalkozó iparágak a teljes enzim felhasználás negyedét veszik igénybe. A mosó- és mosogatószerke egyaránt tartalmaznak magas hőmérsékleten és lúgos körülmények között aktív glikoenzimeket. Az amilázok a keményítő tartalmú szennyeződések el távolítását segítik, míg a cellulázok a pamut textíliákat puhábbá teszik, és színüket felfrissítik a cellulóz szálok enyhé hidrolízisével.

A gépi mosogatás során  $\alpha$ -amilázok távolítják el az edényekre ráégett, keményítő alapú szennyeződések. A cellulóz és keményítő alapú bioetanol gyártás egyaránt glikoenzimek által katalizált enzimatis hidrolízissel kezdődik. Az állati takarmányokhoz két célból adnak enzimeket. A celluláz, xilanáz, glükánáz enzimek a sejtfal alkotók lebontásával

A BLA még 95 °C hőmérsékleten is aktív, ami a harmadlagos szerkezetet stabilizáló Na-Ca-Na triádnak köszönhető.

## 3. Glikoenzimek ipari alkalmazása

Az enzimek katalizátorként való felhasználása olyan nagy forgalmú iparágakat érint, mint a mosószer-, élelmiszer-, gyógyszer-, papír- és textilipar. Az ipari enzimek forgalma az USA-ban 2010-ben meghaladta a 3,5 millió dollárt,<sup>6</sup> az a válság ellenére folyamatos, évi 5 % körüli növekvő tendenciát mutat a fejlett gazdaságokban. A fejlődő régiókban, mint Kína, India, Afrika ennél is nagyobb ütemet mérnek. A proteázok és lipázok mellett a szénhidrát hidrolizáló enzimek forgalma növekszik leggyorsabban, a szénhidrát alapú bioetanol termelés fokozódó jelentőségének köszönhetően.<sup>7</sup> A szénhidrátot ható ipari enzimek típusait és alkalmazásait a 2. táblázat foglalja össze. Egyes iparágak magát a glikoenzimet használják, mint pl. a mosószeripar az  $\alpha$ -amilázt, míg mások az enzimreakcióban átalakított terméket, ahogy pl. a keményítő hidrolízis végtermékét, a glükóz szirupot az élelmiszeripar hasznosítja.



1. Ábra. Glikoenzim alkalmazások megoszlása felhasználási terület szerinti bontásban.

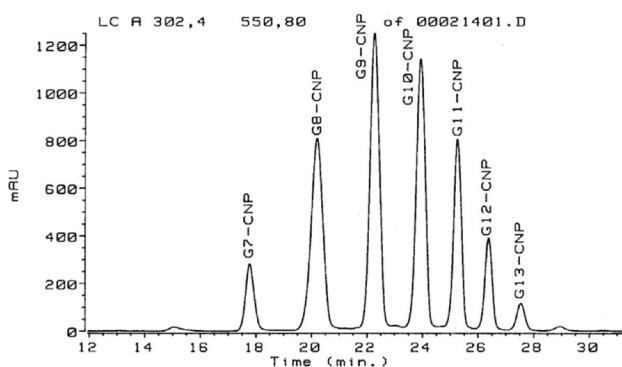
a fehérjék és a keményítő jobb hozzáférhetőségét és így emészthetőségét teszik lehetővé. A fiatalon elválasztott állatok takarmányához a még nem teljes enzimaktivitás kiegészítésére adnak  $\alpha$ -amiláz enzimet, így segítve a keményítő jobb feldolgozását, a táplálék jobb hasznosítását. A textiliparban gyorsan elterjed az új enzimek alkalmazása. Példa erre a kőmosott farmer anyagok előállítására szolgáló enzimes technológia, ami a nyolcvanas években való megjelenése után pár év alatt kiszorította az addig alkalmazott mechanikus koptatást. A módszer úgy működik, hogy a celluláz enzim lehasítja azokat a felületi cellulóz

láncokat, amelyeket az indigó festék kékre színezt. Az így oldatba kerülő festék lemosható a textilről, és előtűnik a „kopotott” cellulóz szálak eredeti fehér színe.<sup>9</sup>

## 4. Glikoenzimek *in vitro* vizsgálata

### 4.1. Kemo-enzimatikus szintézisek

Az enzimek által katalizált szintézisek számos előnnyel járnak a kémiai szintézishez képest. Sztereo- és regioselektív, enyhe körülmények között végbemenő reakciók, melyek segítségével kereskedelmi forgalomban nem kapható szubsztrátokat, inhibitorokat állítottunk elő. A reakciókhoz transzferáz (glikogén foszforiláz b, GPb) és hidroláz ( $\alpha$ -amiláz) enzimeket alkalmaztunk katalizátorként. Mivel ezek az enzimek megfordítható reakciókat katalizálnak, alkalmas kísérleti körülmények között szintézisekre is felhasználhatók. Így állítottunk elő az  $\alpha$ -amiláz enzimek vizsgálatához szükséges, anomer pozícióban kromofor csoportot tartalmazó maltooligomer szubsztrát sorozatot. A kiindulási vegyület a ciklodextrinből kémiai szintézissel előállított 2-klór-4-nitrofenil- $\beta$ -maltoheptaóz volt, aminek nem-redukáló végére glükóz-1-foszfátról kapcsoltunk glükóz molekulákat GPb katalízissel.<sup>10</sup> A transzfer reakcióban keletkezett hosszabb termékeket HPLC módszerrel választottuk el (2. ábra).

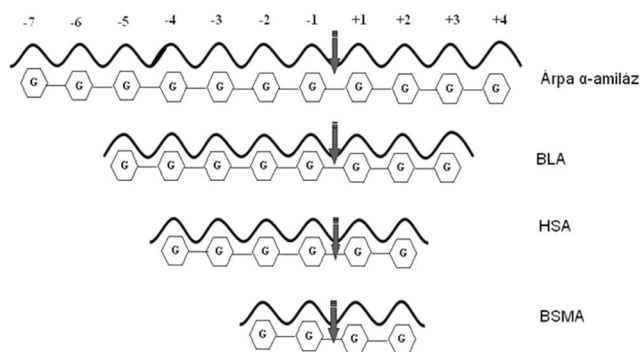


2. Ábra. GPb katalizált reakcióban előállított amiláz szubsztrátok HPLC elválasztása.

Ugyanez az enzim foszfát jelenlétében, a fiziológias folyamatnak megfelelő reakcióban glükóz egységeket hasít, így megkaptuk a 3-13 glükóz egységet tartalmazó szubsztrátokat a tervezett bontási kép vizsgálatokhoz.<sup>11</sup> Az  $\alpha$ -amiláz enzimek szubsztrátkötőhelye nagy változatosságot mutat a különböző eredetű enzimeknél. A *Bacillus stearothermophilus* maltogén amiláza (BSMA) maltózt hasít oligoszacharid szubsztrátokról, de a maltózt transzglikozilezési reakcióban megfelelő akceptor molekulára is át tudja helyezni. Ez lehetővé tette akarbóz donor és glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin akceptor felhasználásával HSA inhibitor szintézisét.<sup>12</sup> Az enzimek tulajdonságai mutációval megváltoztathatók. Árpa eredetű  $\alpha$ -amiláz enzim aktív hely közelében történő V47F mutációja a hidrolitikus aktivitást csökkentette, így lehetővé vált a transzfer reakció előtérbe kerülése. A mutáns enzim segítségével különböző hosszúságú fluoreszcens  $\alpha$ -amiláz szubsztrátokat állítottunk elő.<sup>13</sup>

### 4.2. Alhelytérkép meghatározások

Az utóbbi években a szénhidrátbontó enzimek tulajdonságait az alhely modell alapján értelmezik,<sup>14</sup> ami szerint az  $\alpha$ -amilázok szubsztrátkötőhelye egymást követő alhelyekből épül fel. Minden egyes alhely komplementer a szubsztrát glükóz egységével, és azzal kölcsönhatást létesít. Azt az eljárást, amely során meghatározzuk az alhelyek számát és kötési energiáit, alhelytérképezésnek nevezik. A kromofor csoportot tartalmazó oligoszacharid sorozat birtokában számos, különböző eredetű amiláz enzim bontási képét határoztuk meg. A szubsztrátok hidrolízistermékeinek HPLC analízise a kötéshasítási frekvencia értékeket eredményezte, amiből az alhelyek kötési energiái számíthatók. Megállapítható az enzimek szubsztrátkötő alhelyeinek száma és a hasító hely pozíciója. Elsőként közöltük néhány emlős eredetű (HSA és mutánsai,<sup>15-17</sup> sertés pankréasz amiláz<sup>18</sup>), növényi eredetű (árpa  $\alpha$ -amiláz és mutánsai,<sup>19-22</sup> édesburgonya  $\beta$ -amiláz<sup>23</sup>) és bakteriális eredetű (BSMA, BLA<sup>24-26</sup>) amiláz alhely térképét. A vizsgált enzimek közül a leghosszabb szubsztrátkötő helye az árpa eredetű  $\alpha$ -amiláznak van, hét glikon és négy aglikon kötő hellyel (3. ábra). A BLA katalizálta keményítő hidrolízis termékeloszlása, pentamer és trimer fő termékekkel, jól értelmezhető a kapott alhely szerkezettel, hasonlóan a BSMA maltóz felszabadításához.



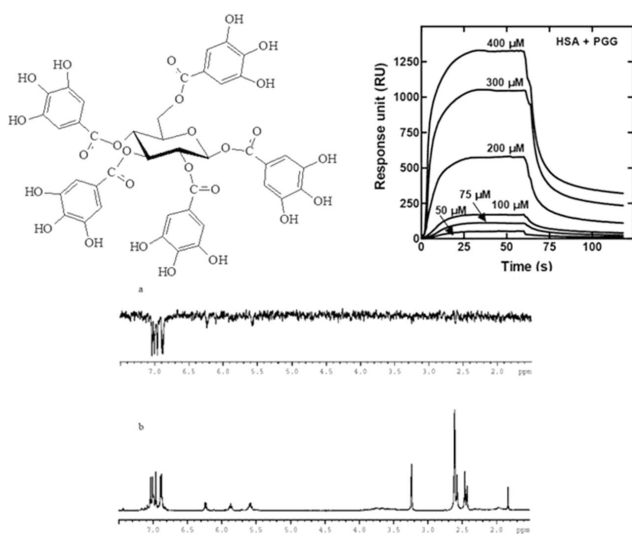
3. Ábra. Különböző eredetű  $\alpha$ -amiláz enzimek aktív helyének szerkezete.

A BLA esetében az alhely térképet különböző hőmérsékleteken is meghatároztuk. Megállapítottuk, hogy bár az egyes alhelyek energiái változnak a hőmérséklet növelés hatására bekövetkező konformáció változás miatt, az aktív hely 5+3+1 szerkezete még 100 °C hőmérsékleten is megmarad.<sup>26</sup>

### 4.3. Nyál eredetű $\alpha$ -amiláz enzim gátlásának vizsgálata

A humán amilázok gátlása több anyagcsere betegség megelőzésében és gyógyításában jelenthet megoldást. Amint azt a bevezetőben említettem, a HSA a nyál egyik fontos fehérje komponenseként alkotója a fogak felületén képződő plakknak. Gátlása csökkentheti a fogszuvasodás kockázatát, különösen a nagy  $\alpha$ -amiláz aktivitással jellemezhető pácienseknél. A pankréasz által termelt  $\alpha$ -amiláz gátlása az elhízás és a cukorbetegség megelőzésében és kezelésében is terápiás eszköz lehet. Vizsgáltuk szintetikus és természetes vegyületek inhibitor hatását. A kémiai szintézissel előállított glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin<sup>26</sup>, vagy az enzimes szintéziseknél már említett akarbóz származék<sup>27</sup> hatékony inhibitoroknak bizonyult. Számos növényi kivonatának ismert a

kedvező hatása cukorbetegség, vagy elhízás esetében. Ilyenek például a zöld és fekete tea, vagy a vörösbor, melyek tannin tartalmáról sikerült igazolni a HSA gátló hatást. A tanninok egyik csoportját a gallotanninok alkotják, amelyekben egy polialkohol jellegű központi molekula (glükóz vagy kinasav) hidroxilcsoportjait galluszsav észteresíti. Ezek a vegyületek nagy koncentrációban kicsapják a fehérjéket, de kisebb koncentrációban gátolják az enzimek működését.<sup>29,30</sup> A pentagalloil-glükóz, mint tannin modellvegyület esetében felületi plazmon rezonancia (SPR) módszerrel kimutattuk a HSA enzimhez való specifikus kötődést és STD NMR módszerrel igazoltuk, hogy a kötődés aromás aminosavakon keresztül valósul meg<sup>31</sup> (4. ábra).



4. Ábra. Pentagalloil glükóz szerkezete, HSA enzimhez való kötődésének SPR görbéi és STD NMR spektruma.

Fűszerek, mint például a fahéj és a szegfűszeg kivonatai szintén gátló hatást mutatnak. Nemrégiben sikerült kimutatni, hogy a piros gyümölcsökben előforduló színezékek, az antocianinok, amelyek aromás gyűrűket tartalmazó vegyületek glikozidjai, szintén gátolják a HSA működését. Molekula-modellezési számítások alapján például a malvidin-diglükozid, a meggy színét okozó egyik antocianin, úgy illeszkedik a HSA aktív centrumába, hogy szinte a teljes kötőhelyet átfedve alakít ki H-híd és aromás kölcsönhatásokat. A vegyület mérésünk szerint mikromólos koncentrációban gátolja a HSA enzimet. Jó gátló hatást mutattunk ki több magyarországi meggyfajta kivonatával is.

Kutatásaink folytatódnak; olyan hatékony  $\alpha$ -amiláz inhibitorok szintézisét és természetes eredetű vegyületek felkutatását tervezzük, amelyek szerepet játszhatnak a fogak védelmében és az elhízás és cukorbetegség megelőzésében.

#### Köszönetnyilvánítás

A közleményben összefoglalt saját vizsgálatokat számos kollégával együtt végeztük az elmúlt több mint 15 évben. Nevük a közleményekben megjelenik, valamennyiüknek köszönöm az eredményes munkát. Különösen Dr. Kandra Lilinek, aki az amiláz kutatásokat elindította és munkánkat tanácsaival, javaslataival azóta is segíti. A kutatásokat OTKA és TÁMOP pályázatok támogatták.

#### Hivatkozások

1. Henrissat, B.; Davies, G. J. *Curr. Op. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 637-644.
2. Bhat, M. K. *Biotechnology Advances* **2000**, *18*, 355-383.
3. Brayer, G. D.; Yaoguang, L.; Withers, S. G. *Protein Science* **1995**, *4*, 1730-1742.
4. Gaál, E. *Sör az ókori Egyiptomban és Mezopotámiában*, Gondolat: Budapest, **1988**.
5. Ghorai, S.; Banik, S.P.; Verma, D.; Chowdhury, S.; Mukherjee, S.; Khowala, S. *Food Research International* **2009**, *42*, 577-587.
6. Dewan, S.S. Enzymes in industrial applications: global markets **2011** Report BIO030F, BCC Research, Wellesley, MD.
7. Global Industrial Enzymes Market Report: **2013** Ed.; Konzept Analytics.
8. J.A. Kent (ed.), *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*, Springer Science+Business Media:New York, **2012**.
9. Damhus, T.; Kaasgaard, S.; Olsen, H. S. *Enzymes at work*, 4th ed. **2013**, Novozymes.
10. Kandra, L.; Gyémánt, G.; Lipták, A. *Carbohydr. Res.* **1999**, *315*, 180-186.
11. Kandra, L.; Gyémánt, G.; Pal, M.; Petró, M.; Remenyik, J.; Lipták, A. *Carbohydr. Res.* **2001**, *333*, 129-136.
12. Remenyik, J.; Ragunath, C.; Ramasubbu, N.; Gyémánt, G.; Lipták, A.; Kandra, L. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4895-4898.
13. Mótán, J. A.; Fazekas, E.; Mori, H.; Svensson, B.; Bagossi, P.; Kandra, L.; Gyémánt, G. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2011**, *72*, 229-237.
14. Brzozowski, A. M.; Lawson, D. M.; Turkenburg, J. P.; Bisgaard-Frantzen, H.; Svendsen, A.; Torben, V.; Borchert, T. V.; Dauter, Z.; Wilson, K. S.; Gideon, J.; Davis, G. J. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 9099-9107.
15. Kandra, L.; Gyémánt, G. *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 579-585.
16. Kandra, L.; Gyémánt, G.; Remenyik, J.; Ragunath, C.; Ramasubbu, N. *FEBS Lett.* **2003**, *544*, 194-198.
17. Ramasubbu, N.; Ragunath, C.; Mishra, P. J.; Thomas, L. M.; Gyémánt, G., Kandra, L. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 2517-2529.
18. Kandra, L.; Gyémánt, G.; Farkas, E.; Lipták, A. *Carbohydr. Res.* **1997**, *298*, 237-242.
19. Kandra, L.; Abou Hachem, M.; Gyémánt, G.; Kramhoft, B.; Svensson, B. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 5049-5053.
20. Nielsen, M.M.; Seo, E.S.; Dilokpimol, A.; Andersen, J.; Abou Hachem, M.; Naested, H.; Willemoes, M.; Bozonnet, B.; Kandra, L.; Gyémánt, G.; Haser, R.; Aghajari, N.; Svensson, B. *Biocatalysis and Biotransformation* **2008**, *26*, 59-67.
21. Nielsen, M. M.; Bozonnet, S.; Seo, E.-S.; Mótán, J. A.; Andersen, J. M.; Dilokpimol, A.; Hachem, M. A.; Gyémánt, G.; Naested, H.; Kandra, L.; Sigurskjold, B. W.; Svensson, B. *Biochemistry* **2009**, *48*, 7686-7697.
22. Mótán, J. A.; Fazekas, E.; Mori, H.; Svensson, B.; Bagossi, P.; Kandra, L.; Gyémánt, G. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2011**, *72*, 229-237.
23. Fazekas, E.; Szabó, K.; Kandra, L.; Gyémánt, G.; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2013**, *1834*, 1976-1981.
24. Kandra, L.; Gyémánt, G.; Remenyik, J.; Hovánszki, G.; Lipták, A. *FEBS Lett* **2002**, *518*, 79-82.
25. Gyémánt, G.; Hovánszki, G.; Kandra, L. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 5157-5162.
26. Kandra, L.; Remenyik, J.; Gyémánt, G.; Lipták, A. *Acta Biologica Hungarica* **2006**, *57*, 367-375.
27. Gyémánt, G.; Kandra, L.; Nagy, V.; Somsák, L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *312*, 334-339.
28. Kandra, L.; Zajác, Á.; Remenyik, J.; Gyémánt, G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *334*, 824-828.

29. Kandra, L.; Gyémánt, G.; Zajác, Á.; Batta, G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *319*, 1265-1271.
30. Zajác, Á.; Gyémánt, G.; Kandra, L. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 717-723.
31. Gyémánt, G.; Zajác, Á.; Ragunath, C.; Ramasubbu, N.; Bécsi, B.; Erdődi, F.; Batta, G.; Kandra, L. *BBA-Proteins and Proteomics* **2009**, *1794*, 291-296.

### Glycoenzymes in living organisms and in the flask

Carbohydrates and glycoconjugates are very important biomolecules playing multiple roles in all forms of life. Due to the structural diversities and the multilateral importance of carbohydrates several glycoenzymes exist in all living organisms. Classification of glycoenzymes is possible on the basis of the type of catalyzed reaction or their structural similarities (CAZy database). The function and importance of some human, plant and microbial glycoenzymes are overviewed, as well as a few important and surprising industrial applications are summarized. This paper also gives a brief summary about our *in vitro* studies in connection with three research areas: chemoenzymatic syntheses, subsite mapping and inhibition studies. A chemoenzymatic procedure was developed for the synthesis of amylase substrates in the range of DP 3 to 13. CNP- $\beta$ -maltooligosaccharide glycosides were prepared using rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase b, the reaction products were separated by an HPLC system. Transglycosylation, catalysed by *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase (BSMA), was applied for inhibitor synthesis.

Fluorescent substrates were synthesized by the V47F mutant of barley amylase for activity measurement of different  $\alpha$ -amylases. The action pattern and product specificity of amylases were studied on the CNP chromophore containing maltooligosaccharide substrate series. These results revealed, that the binding region of BLA is longer than that of mammalian  $\alpha$ -amylases (HSA and PPA) or maltogenic amylase BSMA. Barley amylase has the longest substrate binding site with eleven subsites. Human amylases of both salivary (HSA) and pancreatic (HPA) origins are targets of drug design in attempts to treat diabetes, obesity, hyperlipidemia and dental caries. We first reported the effectiveness and specificity of tannins as  $\alpha$ -amylase inhibitors. Pentagalloyl-glucose (PGG) was selected to study the inhibitory mechanism and to characterize the interaction of HSA with tannins. Surface plasmon resonance (SPR) binding experiments confirmed the direct interaction of HSA and PGG. Saturation transfer difference (STD) NMR experiments clearly demonstrated, that aromatic rings of the PGG may be involved in the interaction suggesting a possible stacking with the aromatic side chains of HSA active site.