

Rögzített glikolitikus enzimek és alkalmazásuk

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Írta:

Kotormán Márta

József Attila Tudományegyetem

Biokémiai Tanszék

Szeged

1989.



TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	2
2.1. Az általunk vizsgált enzimek előfordulása és jellemzése	2
2.2. Enzim rögzítési módszerek	9
2.3. Rögzített piruvát kináz és tejsav dehidrogenáz előállítása és tulajdonságai	17
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	20
3.1. Felhasznált anyagok	20
3.2. Oldatok fehérjetartalmának meghatározása	20
3.3. Az enzimek aktivitásának mérése	21
3.4. Rögzített enzimek előállítása	23
3.5. "Flow injection analysis"	25
4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK	27
4.1. A piruvát kináz és a tejsav dehidrogenáz rögzítése	27
4.2. Oldott és rögzített piruvát kináz és tejsav dehidrogenáz katalitikus sajtságainak összehasonlító vizsgálata	30
4.3. Oldott és rögzített piruvát kináz és tejsav dehidrogenáz stabilitásának tanulmányozása	36
4.4. Rögzített enzimek alkalmazása analitikai oszlopreaktorban	46
4.5. Rögzített piruvát kináz és tejsav dehidrogenáz alkalmazása analitikai meghatározásokra	50

5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	63
5.1. Enzim rögzítési módszerek értékelése	63
5.2. Az Akrilex C 100-hoz rögzített enzimek sa- játtságainak értékelése	64
5.3. Rögzített enzimek alkalmazása	68
6. ÖSSZEFOGLALÁS	69
7. IRODALOM	71

RÖVIDÍTÉSEK

ADP:	adenozin-difoszfát
AMP:	adenozin-monofoszfát
Arg:	arginin
Asp:	aszparaginsav
ATP:	adenozin-trifoszfát
Cys:	cisztein
DEAE:	dietil-amino-etil
E:	enzim
EDTA:	etilén-diamin-tetraacetát
GAPD:	glicereinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GDP:	guanin-difoszfát
Glu:	glutaminsav
His:	hisztidin
IDP:	inozin-difoszfát
Ile:	izoleucin
K_M :	Michaelis-állandó
LDH:	laktát dehidrogenáz
Lys:	lizin
NAD:	nikotinamid-adenin-dinukleotid
PEP:	foszfoenol-piroszólósav
PK:	piruvát kináz
SDS:	nátrium-dodecil-szulfát
Ser:	szerin
Thr:	treonin
Trp:	triptofán
Tyr:	tirozin
Val:	valin

1. BEVEZETÉS

A rögzített enzimek előállítására és tanulmányozására az utóbbi két évtizedben a kutatások előterébe került. Ebben két tényezőnek volt nagy jelentősége. Az egyik, hogy a hordozóhoz kapcsolt enzimek tulajdonságainak vizsgálata, a hordozó és az enzim közötti kölcsönhatás elméleti szempontból érdekesnek bizonyult. A másik mozgató erő pedig, hogy fokozódott az igény ezeknek az enzimkészítményeknek az iparban és a biokémiai analitikában való alkalmazására, mivel számos előnnyel rendelkeznek az oldott enzimekhez képest. A reakció termékét nem szennyezi a keletkezését katalizáló enzim, hiszen a rögzített enzimek elválasztása egyszerűen megvalósítható, a termékek elkülönítése után újra felhasználhatók és folyamatos üzemmódban is alkalmazhatók. Az enzimeket nagyfokú specifitásuk miatt kiterjedten használják klinikai és élelmiszeripari analíziseknél. A rögzített enzimek alkalmazásával kínálkozik a lehetőség ezeknek a meghatározásoknak folyamatos rendszerben történő kivitelezésére.

Kísérleteink célja volt a biokémiai analitikában számos intermedier meghatározására alkalmazott piruvát kináz és tejsav dehidrogenáz rögzített formáinak előállítása és fontosabb kinetikai és stabilitási paramétereiknek a meghatározása. A jó működési stabilitással rendelkező rögzített enzimek analitikai meghatározásokra történő felhasználásának optimalizálása. Kísérleteinkben biológiai mintákból piroszőlősavat, illetve tejsavat határoztunk meg, hogy bemutassuk a rögzített enzimes rendszer gyakorlati célú felhasználását - összevetve a mérési eredményeinket a rutinszerűen alkalmazott oldott enzimes mérésekkel.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az általunk vizsgált enzimek előfordulása és jellemzése

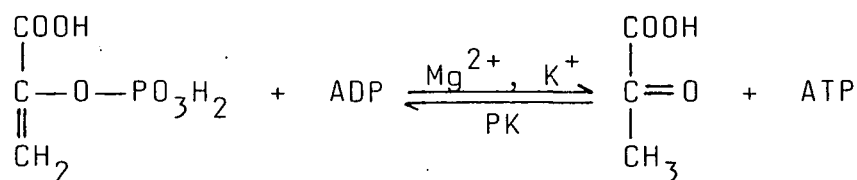
2.1.1. Piruvát kináz

A piruvát kináz igen elterjedt enzim az élőlényekben. Kimutatták 11 féle állati szövetben, egysejtűekben, élesztőkben, 6 faj vörösvérsejtjében és a növények szárában is /1/. Kristályos formában Bücher és Pfleiderer /2/ izolálta először patkányizomból. Nyúl-, macskavázizomból, galambszívből is előállítható, élesztőből is ismert az izolálás.

A piruvát kináz /ATP:piruvát 2-O-foszfotranszferáz, EC 2.7.1.40./ foszfátcsoport átvitelét katalizálja foszfoenol-piroszőlősavról ADP-re, így kulcsfontosságú enzime a glikolízisnek, amelynek elsődleges feladata anaerob körülmények között az energia felszabadítása és kémiai kötés formájában /ATP-ben/ való konzerválása.

A reakció egyenlete:

/a/



$$\Delta G^0 = 7,6 \text{ kcal/mol}$$

A reakciót korábban irreverzibilisnek vélték, Krimsky /3/ azonban kimutatta, hogy megfordítható. Az egyensúlyi konstans: 3×10^4 a piruvát és az ATP képződés irányában. A reakció során a foszfátcsoport átvitele E-ADP-PEP terner komplexben valósul meg. Nem keletkezik foszfoenzim, mint más kinázoknál.

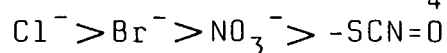
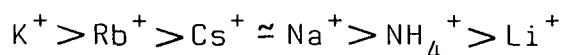
Piroszőlősav helyett más α -ketosavakat is tanulmányoztak, hogy

képesek-e az ATP terminális foszfát akceptoraként viselkedni

- azonban negatív eredménnyel. A foszfoenol-piroszőlősavon kívül más α -ketosav nem szubsztrátja az enzimnek. ADP helyett GDP-t vagy IDP-t használva a reakció 60% ill. 75% hatékonysággal folyik, ADP-vel 100%-ot kapunk. 2-dezoxi-ADP 11% aktivitást eredményez, ami arra enged következtetni, hogy a 2-hidroxci csoportnak jelentősége van a reakcióban.

A piruvát kináz működéséhez Mg^{2+} ionok jelenlétére van szükség, mint általában a kináz-reakciókban. Pontosán még nem tisztázott a Mg^{2+} ionok szerepe, de feltehető, hogy jelenlétükben az adenin nukleotidok Mg-só formában vannak jelen, ill. így vesznek részt a reakcióban. 10 mM-ig nincs gátló hatása a Mg^{2+} ionoknak a reakcióra. Kevés adat áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy vajon a Mg^{2+} ionok helyettesíthetők-e más fémionokkal. Eritrocitákból izolált enzimre nézve ismert a következő: ha 5 mM Mg^{2+} helyett 5 mM Mn^{2+} ill. 5 mM Co^{2+} ionokat alkalmaztak 48%-ra ill. 24%-ra csökkent az aktivitás, ugyanakkor azt is kimutatták, hogy a Zn^{2+} ill. Sr^{2+} ionok jelenléte hatástalan az ADP foszforilálási reakcióra.

A piruvát kináz teljes aktivitásához két értékű kationokon kívül egy értékűekre is szükség van. A K^+ szerepét, mint kofaktor szerepét tételezték fel. Feltehetőleg a K^+ ionok esszenciális aktivátor szerepét töltik be. Helyettesíthetők NH_4^+ vagy Rb^+ ionokkal. Magas koncentrációban azonban ezek az ionok gátolják az enzim működését, ami a nagyobb ionerősségnek tudható be. Kationok mellett anionok is befolyásolják az aktivitást /4/.



Ha optimális mennyiségben jelenlevő K^+ ionokat tartalmazó reakcióelegyhez még Na^+ vagy Li^+ ionokat adunk, gátlás tapasztalható. A Li^+ kétszer olyan gátló hatású, mint az Na^+ ion ugyanabban a koncentrációban. Ha K^+ ion nincs jelen, akkor az Na^+ enyhén aktivítást fokozó az enzimre, a Li^+ azonban nem. K^+ -ra azonban szükség van, bárhonnan izoláljuk is az enzimet, növényből, gerinces vagy gerinctelen állatból, ill. élesztőből. A gerinctelenekből / pl. Anodonta/ izolált enzim sokkal kevesebb K^+ iont igényel működéséhez, mint az emlős izomból származó, mivel az intracelluláris ionkoncentráció ott alacsonyabb, mint az emlősöknél. K^+ ionokkal részben fel lehet függeszteni azt a gátlást, amit a Ca^{2+} ionok okoznak. A Ca^{2+} és a K^+ ilyen kölcsönhatására kevés példát találhatunk. "Biológiai antagonizmus" áll fenn köztük. Az ionok szerepéről és hatásmechanizmusáról valójában keveset tudunk. Elképzelhető, hogy az aktiváló ill. a gátló kationok kapcsolódnak az enzim negatívan töltött aminosav oldalláncaihoz /5/.

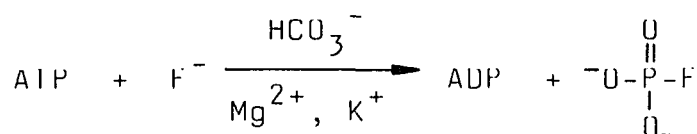
K^+ ionok esetében a Michaelis-konstans értéke független a foszfoenol-piroszőlősav koncentrációtól, ill. a PEP-re meghatározott K_M független a K^+ koncentrációtól. Ez azt jelenti, hogy a két komponens egymástól függetlenül kapcsolódik az enzimhez. Közvetlen a foszfátcsoport transzportja a donor és az akceptor között. Valószínű, hogy az enzim felületén egy helyre kötődik az ATP és az ADP és egy másik helyre a piroszőlősav és a foszfoenol-piroszőlősav.

A piruvát kináz piridoxál foszfáttal reverzibilisen gátolható. Az aktív centrumban lévő lizil oldalláncnak a nukleotid megkötésében van szerepe. Az ATP nagy koncentrációban gátolja az enzimet. /6/.

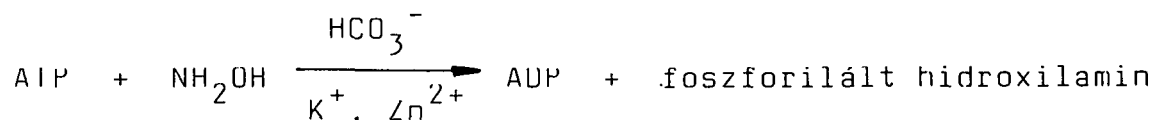
A piruvát kináz a már említett /a/ reakción kívül a következő-

ket is képes katalizálni:

b. fluorokináz reakció:



c. hidroxilamin-kináz reakció:



A fluorokináz reakció nukleotid specifitása megegyezik a piruvát kinázéval /a/. A fluorokináz aktivitást Mg^{2+} ionok jelenléte fokozza, viszont meglepő módon Zn^{2+} vagy Co^{2+} ionok jelenlétére van szükség a hidroxilamin-kináz reakcióban a Mg^{2+} ionok helyett. A fluorokináz reakcióban a Mn^{2+} ionok majdnem olyan hatásosak, mint a Mg^{2+} ionok. A K^+ nemcsak a piruvát kináz, hanem a fluoro- és a hidroxilamin-kináz aktivitásokat is fokozza.

A nyúl vázizom piruvát kináz izoelektromos pontja, $\text{pH} = 5,98$. A Michaelis-konstansok értéke pedig PEP-re 7×10^{-5} M, ADP-re 5×10^{-4} M. Az enzim 4 alegységből áll /7/. A monomer enzim molekulatömege SDS gélelektroforézissel mérve 75000, a tetrameré 300000 /4/. Aminosavösszetétele nem ismert. Kevés Tyr és Trp található benne. Ureás kezelés után két alegységre disszociál /2/.

2.1.2. L-tejsav dehidrogenáz

Az L-tejsav dehidrogenáz /L-laktát: NAD oxidoreduktáz, EC 1.1.1.27./ a piruvát laktáttá történő átalakulását katalizálja. A reakció reverzibilis. Kis sebességgel γ -diketo savak redukcióját is katalizálja, az átalakítás mértéke egy tizede a piruvát redukciónak. NAD helyett kis sebességgel NADP-vel is működik /8/. Széles szubsztrát specifitással rendelkezik α -ketosavakra és α -hidroxisavakra nézve. A K_M piruvátra a legkisebb, a C atomok számának növelésével C_5 -ig nő, C_5 - C_9 között pedig nem változik. A V_{max} C_2 - C_4 esetében közel azonos, a szénatomszámot C_9 -ig növelve - csökken.

Emlőszövetekben a vázizom /M/, szívizom /H/ és a herékben található /X/ izoenzimek fordulnak elő. A szövetekben ötféle hibridforma / M_4 , M_3H , M_2H_2 , MH_3 , H_4 / található. Izomban, májban az M típusú forma dominál a tetramerben, szívben, vesében pedig a H forma. Nyúl vázizom enzimnél Bush és Nair /9/ kimutatta, hogy a magas piruvát koncentráció gátló hatású a reakcióra. Az anionok jelentősen befolyásolják az enzimaktivitást, sőt a különböző pufferekben mért Michaelis-konstans is jelentős eltérést mutatott /10/. Az egyes izoenzimek közül a különböző szénláncú analógokat az egyik izoenzim elfogadja, a másik nem. Az X_4 izoenzimnek az α -keto-glutársav ugyanolyan jó szubsztrátja, mint a piroszőlősav. A H_4 , M_4 formánál az α -keto-glutársav vagy az oxál-ecetsav kevésbé megfelelő szubsztrát, mint a piruvát. A H_4 , M_4 , X_4 formák aminosav összetétele ismert. Ha Cys-t módosítanak, ez aktivitásvesztéshez vezet. Ha a Cys oldalláncot koenzim jelenlétében próbálták módosítani akkor az enzim aktív maradt. Az enzim nem tartalmaz

fémet, nincs benne diszulfid-híd sem. A dogfish M_4 LDH teljes aminosav szekvenciája és a három dimenziós szerkezete is ismert. 329 aminosavból áll. Az aktív centrumban His szerepét igazolták. Másodlagos szerkezetében kb. 40% az α -hélix, 23% a β -redőzött szerkezet, mely Val-t, Ile-t és Thr-t tartalmaz nagy százalékban. /A különböző fajokból izolált LDH hélix tartalma 32-46% közt változik./ Az alegység N terminális része köti a koenzimet, a dinukleotid kötő rész két mononukleotid kötő részből áll. Az alegységek N terminális részéről egy 20 aminosavat tartalmazó rész emelkedik ki. Ennek a karnak az alegységek közötti kapcsolat kialakításában van szerepe. Az Asp 168 és a His 195 a katalízis szempontjából fontosak. A koenzim adeninje hidrofób zsebben kötődik meg. A megkötődést a Tyr 85 segíti, az Asp 53 pedig orientálja az adenin gyűrűt. Ugyanilyen elhelyezkedés alakul ki a GAPD-nél az enzim és a koenzim között. Az adenin gyűrű ribózát a H-híd kötés kapcsolja a fehérjéhez. Ugyanez a kötődés figyelhető meg valamennyi bimolekuláris vagy termer komplexben, ahol ribóz van jelen. A koenzim foszfátjai H-híd kötéssel létesítenek az enzim főláncán elhelyezkedő aminosav csoportok oldalláncával /Ala 31, Val 32/. A NADH-t 400-szor jobban köti az enzim, mint a NAD-t. Ezt a fehérjeszerkezet jelenlegi ismeretei alapján nehéz magyarázni. A nikotinamid gyűrű a negatívan töltött Glu 140 és a pozitívan töltött His 138 között helyezkedik el termer komplexben. A nikotinamid önmagában nem gátolja az LDH-t, de ha AMP is jelen van, akkor igen. A szubsztrát megkötésében az Arg 171, az Arg 109, a His 195 és a Ser 238 vesz részt H-híd kötés kialakításával a His oldalláncok módosítása után az enzim a NAD-t és a NADH-t meg tudja kötni, de termer kom-

plex nem alakul ki. A Tyr oldallánc módosítása is gátolja az enzimet. Feltehetőleg az aktív centrumhoz közel helyezkedik el és valószínű, hogy a katalízisben van szerepe. Az aktív centrum közelében lévő Lys 250 módosítása az oligomer forma instabilitását idézi elő. Megváltozik az enzim immunológiai tulajdonsága is.

Alacsonyabb rendű mikroorganizmusokban leírtak D-tejsavra specifikus enzimet is, mely a kísérleti eredmények szerint dimer enzim. Az LDH a NAD 4-es C atomjára cianid beépülését is katalizálja. Valamennyi izoenzim piruváttal gátolható, de különböző mértékben. Alacsonyabb pH-n kisebb piruvát koncentráció kell a gátláshoz. Az LDH nagy tejsav koncentrációkkal is gátolható. A H_4 forma könnyebben gátolható az M_4 -nél. Feltehetőleg egy abortív terner komplex keletkezik és ebből ered a gátlás. A piruvát ill. a tejsav az apoenzimhez nem kötődik, csak a koenzimet tartalmazó enzimhez /8/.

2.2 Enzim rögzítési módszerek

A rögzített enzimek fizikai kölcsönhatás révén, vagy kémiai kötéssel szilárd hordozóhoz kapcsolt ill. a hordozó által körülzárt enzimek, melyek katalitikus aktivitásuk megőrzik, ismételten és folyamatosan felhasználhatók /11/.

Az enzimek rögzítése történhet: /12-15/

- az enzim vizoldhatatlan hordozóhoz való kapcsolásával fizikai adszorpció, ionos vagy kovalens kötés révén;
- intermolekuláris keresztkötések létrehozásával az enzim-molekulák közt bi- vagy polifunkciós reagensekkel;
- az enzim szemipermeabilis gélből készült rácsba való bezárásával, szemipermeabilis membránnal való körülvételezéssel, vagy üreges szálba történő bezárásával.

Legtöbb irodalmi adatot a kovalens kötéssel történő rögzítésre közöltek. Sok próbálkozás történt a többi módszer bővítésére is. Új hordozók új lehetőségeket kínáltak /16-25/.

2.2.1. Adszorpció

A fizikai adszorpció a legkorábban alkalmazott módszer enzimek rögzítésére. Nelson és Griffin /26/ elsőként állítottak elő rögzített enzimet 1916-ban. Invertázt kötöttek aktív szénhez. Langmuir /27/ pepszint és ureázt kötött adszorpcióval. Adsorbensek lehetnek pl. aktív szén, porózus üveg, kaolinit, Al_2O_3 , szilika-gélek, keményítő, cellulóz. A módszer előnye, hogy nagyon egyszerű és nem igényel erőlyes kémiai behatásokat. Hátránya, hogy a pH, a hőmérséklet és az ionerősség változtatása a fehérje leoldódását eredményezheti. Az enzim mellett más vegyületek is adszorbeálódhatnak.

2.2.2. Ionos kötés

Legtöbbször az enzim és a hordozó között kialakult ionos kötés mellett az adszorpció is szerepet játszik a kötésben. Elsőként Mitz /28/ alkalmazta ezt a módszert rögzített enzim előállítására. Az ionos kötés kialakítása egyszerű, nem igényel erőlyes behatásokat, így általában nagy aktivitással köthetők az enzimek /11/. A módszer hátránya, hogy a pH és az ionerősség megváltoztatása az enzim leoldódását eredményezheti, mivel az ionos kötés viszonylag gyenge. Hordozóként poliszacharid származékok /DEAE-cellulóz, CM-cellulóz, DEAE-Sephadex stb./ és ioncserélő csoportokkal rendelkező szintetikus polimerek / Amberlite származékok, Dowex gyanták / alkalmazhatók.

2.2.3. Kovalens kötéssel történő rögzítés

A kovalens kötéssel való rögzítés a leggyakrabban alkalmazott módszer az enzimek rögzítésére. Elsőként az immunológusok használták /29/ 1936-ban. Azóta számos új kovalens rögzítési eljárást dolgoztak ki. A módszer előnye, hogy a hordozó és az enzim között erős kémiai kötés jön létre, így a környezeti feltételek /hőmérséklet, pH, ionerősség/ megváltoztatására sem következik be leoldódás. Hátránya, hogy viszonylag bonyolult s általában az enzim jelentős része inaktiválódik, mivel a kötésben az aktív centrum aminosav oldalláncai is részt vehetnek. A kémiai módosulás eredményeként számolni kell az enzim térszerkezetének, a szubstrát hozzáférhetőségének megváltozásával. A kovalensen kötött enzimek katalitikus és stabilitási tulajdonságai lényegesen eltérhetnek az oldott enzimétől. Célszerű olyan hordozókat /dextránt,

szintetikus polimereket, fénoxidokat/ választani, melyek az aktivitás szempontjából fontos aminosav oldalláncokkal nem reagálnak. Ha az aktív centrumban lévő csoportokat kémiaiilag reverzibilisen módosítjuk, ill. szubsztrát vagy koenzim van jelen, csökkenthető az aktivitás veszteség /30-31/.

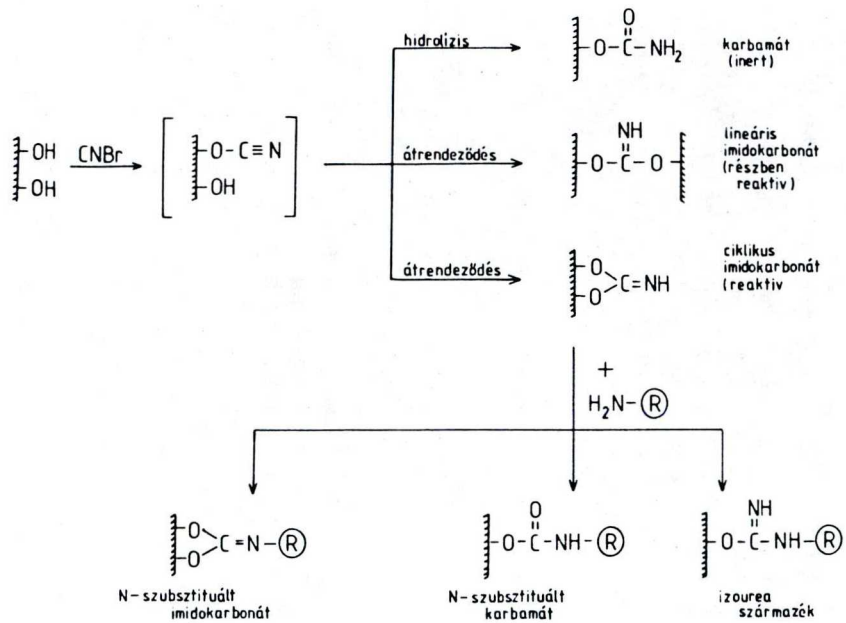
A kovalens kötésre leggyakrabban használt reakciók:

- acilálás
- arilezés és alkilálás
- brómcianós reakció
- karbamoilálás és tiokarbamoilálás
- glutáraldehides kapcsolás
- diazotálási reakciók
- tiol-diszulfid átalakulás
- polimer aldehidekkel való reakció
- kondenzációs reakciók

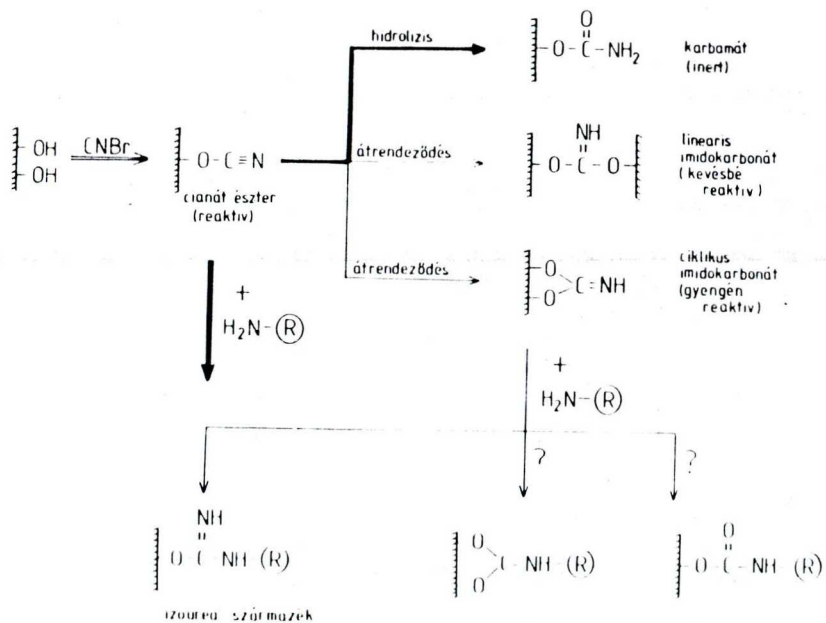
A továbbiakban az általunk is használt eljárásokat ismertetjük.

2.2.3.1. Rögzítés brómcianóval aktivált poliszacharidokhoz

Axén és Porath /32-35/ módszerével lehetőség nyílt makromolekulák szilárd hordozóhoz való kovalens kötésére. Sephadex géleket aktiváltak cian halogénekkal, majd glicil-leucin dipeptidet kötöttek hozzá. Az aktiválás és a bekötődés pH=10-12 között volt optimális. A módszer előnye, hogy az aktivált gél megvásárolható, s a kötés nem igényel erőlyes reakciókörülményeket. Az 1. ábrán az aktiválás és a kötés mechanizmusát tüntettük fel poli-glükóz hordozók esetén /35/. Az agaróz gélek nem tartalmaznak vicinális hidroxil csoportot. Az aktiválás a 2. ábrán feltüntetett séma szerint megy végbe. A kérdőjeles változat csak feltételezett de még nem bizonyított lehetőség.



1. ábra: Poli-glükóz gélek aktiválása BrCN -al és az enzim kötődése

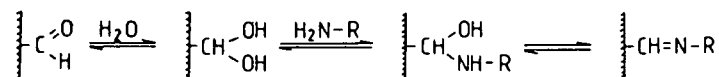


2. ábra: Agaróz gélek aktiválása BrCN -al és az enzim kötődése

Az agaróz géleknél /Sepharese/ a fehérje kb. 80%-a a stabil cianát észterrel reagál, a dextrán típusú géleknél /Sephadex/ viszont a cianát észter csak nyomnyi mennyiségben fordul elő /37, 38/.

2.2.3.2. Rögzítés aldehid funkciós csoportot tartalmazó hordozóhoz

Aldehid funkciós csoportot tartalmazó hordozók kialakítására számos próbálkozás történt. Epton és munkatársai /39/ poliakril-amino-acetaldehydet állítottak elő. Brown és Racois /40-42/ allil alkohol és vanillin kopolimerizációjával, mások /43-45/ poliszacharidok dimetil-szulfoxidos, ill. perjodátos oxidációjával próbálkoztak. Az aldehidek a fehérjék amino csoportjaival reagálnak aminol vagy Schiff-bázis /azometin, aldimin/ képzéssel /3. ábra/ /46/.



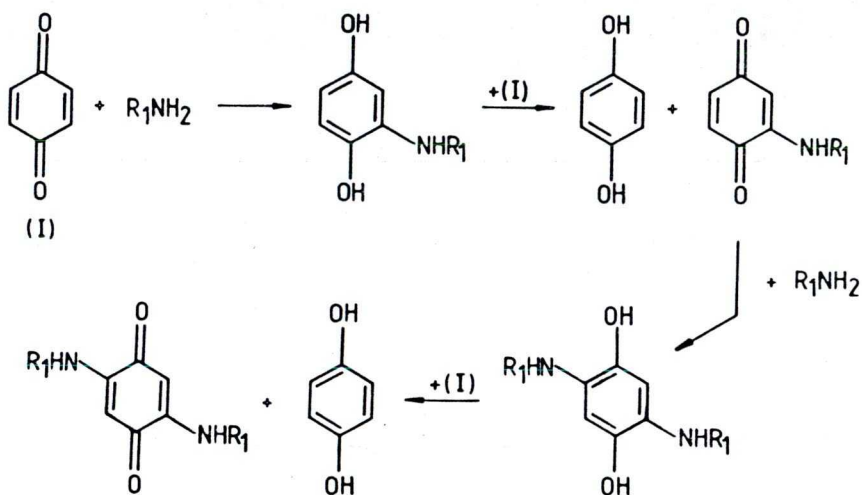
3. ábra: Fehérjék kötése aldehid funkciós csoportot tartalmazó polimerekhez

A szulfhidril és imidazol csoportok is reakcióba léphetnek, ami enzimaktivitás csökkenéssel járhat. A módszer hátránya, hogy bizonytalan a képződött kötések stabilitása. A kötés utólagos redukcióval stabilizálható, de közben csökkenhet az enzim aktivitása /47/.

2.2.3.3. Kötés poliakrilamid gélekhez p-benzokinonos aktiválással

Számos próbálkozás történt az amid-csoport aktiválására /48,49/. Brandt /50/ és Stambolieva /51/ Sepharose 4B és hidroxialkil-metakrilát géleket aktiváltak p-benzokinonnal. Poli-akrilamid típusú gélek is aktiválhatók p-benzokinonnal /52/, de a reakció mechanizmusa még nem tisztázott.

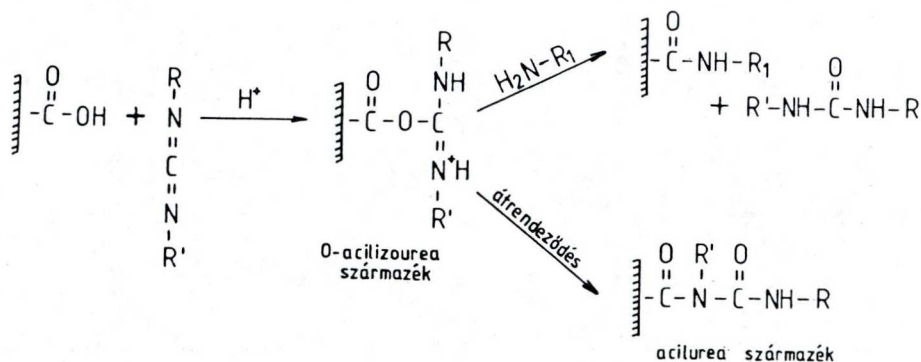
A p-benzokinon aminokkal való reakciója ismert /53/; 1,4-adíció, amely még oxidációval is együtt jár /4. ábra/



4. ábra: p-benzokinon reakciója aminokkal

2.2.3.4. Rögzítés karboxil-csoportot tartalmazó hordozóhoz

Mosbach és Mattiasson /54/ karboxil-csoportot tartalmazó gélek aktiválására vizoldékony karbodiimideket használtak. Savas pH-n /pH=4,75-5,0/ először O-acil-izourea keletkezik, majd amid kötések alakulnak ki, vagy acil-urea képződik /5. ábra/.



5. ábra: Karboxil funkciós csoportot tartalmazó gélek aktiválása és az enzim kötődése

Az aktivált karboxil csoport más nukleofil csoportokkal -OH , -SH / is reakcióba léphet. A karboxil-csoportok aktiválására leggyakrabban az 1-ciklohexil-3/2/4-N-metilmorfolinoetil-karbodiimid tozilátot és az 1-etil-3/3-dimetilaminopropil/-karbodiimidet használják /13/.

2.2.4. Rögzítés keresztkötések létrehozásával

Bi- vagy multifunkciós reagensekkel keresztkötéseket alakítunk ki az enzim molekulák között. A rögzítésre számos bi- vagy multifunkciós vegyület /diazo-benzidin és származékai, N,N'-hexametilén-bisz-jódacetamid, hexametilén izocianát stb./ felhasználható. Leggyakrabban glutáraldehidet alkalmaznak. A módszer hátránya, hogy nehezen kezelhető puha, zselatinszerű polimer keletkezik /55,12/. Ez a hátrány kiküszöbölhető hordozón adszorbeálódott enzimek keresztkötésével. Enzimaktivitás veszteséggel is számolni kell, ami inert fehérje /pl. szérum albumin/ jelenlétével csökkenthető /56/.

2.2.5. Gélbe polimerizálás

Az enzimet a polimerizáció megindulása előtt a monomer oldatába keverjük, így a képződött polimer magába zárja az enzimet. A gél pórusai a kis méretű szubsztrátok és termékek diffúzióját lehetővé teszik, de az enzimet visszatartják. A módszer előnye, hogy egyszerű és különböző gélfarmák kialakítására is lehetőség van. Leggyakrabban poli-akrilamidot alkalmaznak /57-59/. A módszer hátránya, hogy a polimerizációkor képződött szabad gyökök és a reakcióhő /60/ inaktiválhatják az enzimet, másrészt csak olyan enzimek rögzítésére alkalmazható, amelyek kis molekulásúlyú szubsztrátokra hatnak.

2.2.6. Bezárás szemipermeabilis membránnal

Az enzimek szemipermeabilis kapszulába zárására cellulóz nitrátot, polisztirol és poliamin származékokat használnak. A módszer előnye, hogy magas enzimkoncentráció érhető el. Az így rögzített enzimek felhasználhatók pl. aminosavak nagy mennyiségben való előállítására, kofaktor ciklizálására /61,62/, enzimhiányos betegségek gyógyítására /63,64/ és művese előállítására /65,66/.

2.2.7. Bezárás szálak üregeibe

Rony /67/ használt először szemipermeabilis szálakat enzimek rögzítésére. A cellulóz tri-acetát szálakba számos enzimet be lehet zárni. A szálakat úgy készítik el, hogy a glicerint is tartalmazó vizes enzimoldatot metilén kloridban oldott cellulóz tri-acetátba csepegtetik. Keveréssel emulziót készítenek, melyet toluolt tartalmazó koaguláltató fürdőbe engednek bele /11/. A szálak

nagy felületűek, folyamatos működést tesznek lehetővé. A módszer előnye, hogy az enzimet nem kell semmivel reagáltatni a rögzítéshez és nagy molekulásúlyú szubsztrátoknál is alkalmazható, ha a termék molekulásúlya kicsi /12/.

2.3. Rögzített piruvát kináz és tejsav dehidrogenáz előállítás és tulajdonságai

A piruvát kináz rögzítésére számos próbálkozás történt. Wilson és munkatársai /68/ cellulóz papírhoz kötötték külön a tejsav dehidrogenázt és külön a piruvát kinázt. Kinetikailag modellezték és analizálták az enzimszisztéma működését. A rögzített piruvát kináz Michaelis-konstansát 0,48 mM-nak találták ADP-re, 0,091 M KCl koncentráció mellett az oldott enzim esetében pedig 0,52 mM K_M értéket kaptak. A rögzített piruvát kináz jó tárolási stabilitással rendelkezett, több hónapig aktív maradt, amit a kálium ionok stabilizáló hatásával lehet magyarázni. A már használt piruvát kináz papír csíkok viszont már nem voltak ilyen jól tárolhatók.

Kay és munkatársai /69/ Whatman papír diklór- s -triazinnal aktivált szűrőpapírhoz kötötték a piruvát kinázt, más enzimekkel együtt és az így előállított készítményt reaktortöltetnek használták. Az enzimek - a piruvát kináz kivételével - több hónapig stabilak voltak.

Newirth és munkatársai /70/ diazotálással üvegre kötötték a piruvát kinázt és a tejsav dehidrogenázt. Tanulmányozták a p-amino-benzoilát-, ill. az amino-alkilát üvegre kötött, két enzimből álló rendszer analitikai meghatározásokra való alkalmazhatóságát. A

rögzített enzimekkel piruvát, ADP és foszfoenol-piroszőlősav koncentrációt határoztak meg.

Campbell és Chang /71/ mikrokapszulákba zárták a piruvát kinázt és a hexokinázt. Készítményüket ATP regenerálására használták fel.

A tejsav dehidrogenázt mind a biokémiai-, mind az orvosi analitikában elterjedten alkalmazzák, így rögzítésével is sokan próbálkoztak.

Biondi és munkatársai /72/ 1,6-6 U/g aktivitással kötötték az LDH-t és más enzimeket poli-akrilnitril hordozóhoz.

Kötötték a tejsav dehidrogenázt arilamin- ill. alkilamin-üveghez is nátrium nitrittel ill. glutáraldehiddel /73/.

Srere és munkatársai /74/ BrCN-al aktivált Sepharose 4B-hez, Sepharose G-250-hez, 1,6-diamino-hexánt tartalmazó Sepharose 4B-hez és poli-akrilamid gélbezárással koimmobilizáltak almasav dehidrogenázt, LDH-t és citrát szintetázt. A rögzített enzimrendszer 4-szer hatékonyabban működött a szabad enzimes rendszernél, amit a gélben levő magas szubsztrátkoncentrációval magyaráztak.

Anioncserélő cellulózhoz kötött LDH K_M értéke és hőstabilitása nagyobbak adódott az oldott enziménél /75/. S-triazinil DEAE cellulózhoz kötött LDH-nál is ilyen változásokat mértek /76/.

Hofstee /21/ n-oktilamin és n-butilamin Sepharose 4B-hez kötötte több enzim mellett az LDH-t is. Az enzimek ionos és hidrofób kölcsönhatás révén kötődtek, mégis huzamosabb ideig használható volt az oszlop az enzim leoldódása nélkül. 1 M KCl-al lehetett csak elválni az enzimeket.

Kovalenko és munkatársai /77/ Al_2O_3 -ra kötötték az LDH-t ad-

szorpcióval. A rögzített tejsav dehidrogenáz K_M értékét két nagyságrenddel nagyobbak találták NADH-ra nézve az oldott enziménél, ami a fehérje molekulák deformációjával magyarázható. A rögzített enzim stabilabb volt az oldottnál. Szobahőmérsékleten egy éves tárolás után is megőrizte aktivitásának 20-40%-át.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Felhasznált anyagok

A kísérleteinkben felhasznált anyagok nagy része a Reanal Finomvegyszergyár /Budapest/ terméke volt. Kivételt képeztek: a rögzítésnél használt Szilokrom aldehid /NPO Biolar, Riga, Szovjetunió/; a Sepharose 4B /Pharmacia, Uppsala, Svédország/; az N/3-dimetilaminopropil/-N'-etil-karbodiimid-hidroklorid /Merck-Schuchardt, München, NSZK/. A Reanal-tól beszerezett Akrilex P-100 szemcsemérete: 120-320 μm , az Akrilex C-100-é pedig 100-320 μm volt 6,4 m ekv./g száraz gél kötőkapacitással. A nyúl vázizom piruvát kináz 100 U/mg; a sertésizomból izolált tejsav dehidrogenáz 200 U/mg specifikus aktivitással rendelkezett.

3.2. Oldatok fehérjetartalmának meghatározása

Az enzimoldatok fehérjetartalmának mérése Lowry és munkatársai /78/, ill. Bradford /79/ módszerével történt.

A Folin-reagens lúgos közegben kék színreakciót ad a fehérjékkel, melynek fotometrálása 750 nm hullámhossznál végezhető el. Az oldatok fehérjetartalmát marha szérumalbuminból készített, ismert koncentrációjú oldatsor alapján felvett kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg. A Lowry által leírt módszerhez szükséges oldatok:

A : 2%-os Na_2CO_3 , 0,1 N NaOH-ban

B : 0,5%-os $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, 0,1%-os Na-citrátban

C : 50 ml A + 1 ml B

Közvetlenül a meghatározás előtt készítjük

D : 2 N Folin-reagens

10-100 μg fehérjéhez 2,5 ml C oldatot adunk, majd szobahőmérsékleten 10 percig inkubáljuk. Hozzáadunk 0,25 ml D oldatot, összekeverjük és 40 perc múlva fotometrálnuk.

Bradford módszere azon alapszik, hogy a Coomassie Blue brilliáns festék kék színű komplexet alkot a fehérjékkel, amely 595 nm-nél fotometriásan jól mérhető. A reagens elkészítése: 25 mg Coomassie Blue G-250-et feloldunk 12,5 ml 95%-os etanolban, hozzáadunk 85%-os foszforsavat, majd az így nyert oldatot kiegészítjük 250 ml-re deszt. vízzel. Az így nyert oldat összetétele:

Coomassie Blue 0,01%

etanol 4,75%

foszforsav 8,5%

A meghatározás menete: 2,5 ml reagenshez 50 μl /10-100 mg fehérjetartalmú/ oldatot adunk, majd 2 perc eltelte után mérjük a fényelnyelést 595 nm-nél deszt. vízzel szemben. A színintenzitás fél órán keresztül állandó marad. A oldatok fehérjetartalma marha serumalbumin oldatsorral felvett kalibrációs görbe segítségével adható meg. A rögzített fehérje mennyiségét indirekt módon határoztuk meg, a reakcióelegybe bevitt és a mosófolyadékokból visszamért fehérje mennyiségének különbségeként.

3.3. Az enzimek aktivitásának mérése

A piruvát kináz aktivitását tejsav dehidrogenáz segédenzimmel határoztuk meg, 340 nm-nél a NADH mennyiségének csökkenését követve /80/. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 87 mM trietanolamin/HCl puffer /pH=7,0/ 1,4 mM foszfoenol-piruvát, 2,5 mM MgCl_2 , 10mM KCl, 4,7 mM ADP, 0,2 mM NADH és 10 egység LDH. A reakciót 100 μl piruvát kinázzal indítottuk. Egy enzimegy-

ség /U/ az az enzim mennyisége, amely 1 μmol piruvát képződését katalizálja percenként 25 °C-on a fenti körülmények között.

A tejsav dehidrogenáz aktivitását a 340 nm-nél mért extinkció csökkenéséből határoztuk meg /81/. A reakcióelegy összetétele: 94 mM foszfát puffer /pH=7,0/, 7,6 mM nátrium-piruvát, 0,2 mM NADH. A reakciót 20 μg /0,5-1,0 U/ enzimmel indítottuk. Egy enzimegység az enzimnek az a mennyisége, amely 1 μmol tejsav piruvátból való képződését katalizálja percenként 25 °C-on a fenti körülmények között. A minta 1 cm^3 -ében lévő aktivitásegységek számát az alábbi összefüggéssel számoltuk:

$$\text{térfogati aktivitás} \left/ \frac{\text{U}}{\text{cm}^3} \right/ = \frac{\frac{\Delta E}{\Delta t} \times V_r}{E_{340, \text{NADH}} \times V_m \times l}$$

ahol: V_r : a reakcióelegy térfogata

V_m : a bemért enzimoldat térfogata

$E_{340, \text{NADH}}$: extinkciós koeficiens, $6,22 \text{ cm}^3/\mu\text{mol}$

l : a fényút hossza a küvetében /cm/

A rögzített enzimek aktivitását ugyanolyan reakcióelegyben mértük, mint az oldott enzimét. 4 ml reakcióelegyet 100-200 mg rögzített enzimmel 1-10 percig kevertettünk, majd szűrés után mértük az oldatok extinkciójának csökkenését.

3.4. Rögzített enzimek előállítása

3.4.1. Rögzítés Szilokrom aldehidhez

Ryan és Fottrell /82/ módszerét adaptáltuk. 1 g gélt pH=8,0-as deszt. vízzel átmostunk, majd 4-5 ml 800-1000 U/ml aktivitású enzimet adtunk hozzá. Ezután 4 °C-on két óra hosszat kevertettük a szuszpenziót. Az enzim és a hordozó között kialakult Schiff-bázis kötést 0,8 ml 1%-os nátrium-borohidrid oldattal redukáltuk. A nem-kötődött fehérjéket többszöri vizes mosással távolítottuk el. Átmostuk a gélt: 3 x 10 ml deszt. vízzel /pH=8,0/; 3 x 10 ml 0,1 M foszfát pufferrel, amely 0,5 M szervesetlen só / a piruvát kináznál / $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -ot, a tejsav dehidrogenáznál pedig NaCl-t/ is tartalmazott; majd végül 3 x 10 ml 0,1 M foszfát pufferrel /pH=7,0/.

3.4.2. Rögzítés Sepharose 4B gélhez

Aktiválás: 40 ml gélt 1 liter deszt. vízzel átmostunk, majd 80 ml deszt. vízben szuszpendáltunk. pH-ját 10 N NaOH-dal 11-re állítottuk, majd kis részletekben 12 g BrCN-t adtunk hozzá, miközben a pH-t 10,5-11 között tartottuk 20 °C-on termosztálás mellett. A pH változás megszűnte után a gélt 500 ml 0,1 M NaHCO_3 oldattal /pH=8,0/ mostuk át /83/.

Az enzimek kötése: 1 g BrCN-al aktivált gélt 6 ml 0,1 M NaHCO_3 oldatban /pH=8,0/ szuszpendáltunk, majd hozzáadtuk az enzimet /20-50 mg/. 24 óráig 4 °C-on kevertettük, majd átmostuk a gélt: 3 x 10 ml 0,1 M foszfát pufferrel /pH=7,6/, mely 0,1 M szervesetlen só /NaCl ill. / $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ / tartalmazott és 3 x 10 ml 0,1 M foszfát pufferrel /pH=7,6/ /84/.

3.4.3. Rögzítés Akrilex P 100-hoz

Aktiválás: 1 g gél 4 ml 0,1 M foszfát pufferben /pH=8,0/ szuszpendáltunk, majd 1 ml 0,1 M p-benzokinont adtunk hozzá 20%-os dioxánban oldva. A gél 24 óráig aktiváltuk 50 °C-on /52/. A p-benzokinon feleslegének eltávolítása végett átmostuk a gél: 3 x 10 ml 20 % dioxánt tartalmazó vízzel; 3 x 10 ml 0,1 M acetát pufferrel /pH=4,0/; 3 x 10 ml 1 M szervesetlen só tartalmazó acetát pufferrel; majd végül 0,1 M foszfát pufferrel /pH=7,5/.

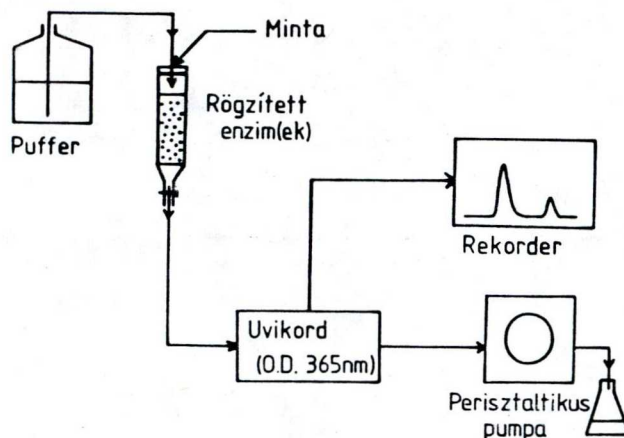
Enzimek kötése: 1 g aktivált gél 4 ml 0,1 M foszfát pufferben szuszpendáltunk, majd hozzáadtuk az enzimet. 4 °C-on 24 óráig kevertettük, majd kimostuk a gél. A mosás hasonlóan történt, mint az aktiválás után, a dioxános lépés elhagyásával.

3.4.4. Rögzítés Akrilex C 100-hoz

1 g gél 50 ml 0,1 M foszfát pufferben /pH=6,5/ duzzasztottunk. Hozzáadtunk 1 g 20 ml foszfát pufferben oldott EDC-t és 10 percig kevertettük /85,86/. A piruvát kináz kötéséhez kálium foszfát puffer használtunk, hogy a Na^+ ionok gátló hatását későbbi méréseink során elkerüljük és az aktivált gél pufferes mosásával eltávolítottuk a karbodiimid feleslegét. A rögzítésekhez dializált enzimoldatot /4-5 ml; 4000-5000 U/ használtunk. A gélszuszenziót 24 óráig kevertettük 4 °C-on, majd mostuk: 3 x 50 ml 0,1 M foszfát pufferrel /pH=7,0/, 3 x 50 ml 0,1 M NaCl-t ill. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -t tartalmazó foszfát pufferrel és ismét 3 x 50 ml 0,1 M foszfát pufferrel.

A rögzített enzimeket szuszpenzió formájában tároltuk hűtőszekrényben: a piruvát kinázt 0,1 M trietanolamin/HCl /pH=7,6/, az LDH-t pedig 0,1 M foszfát pufferben /pH=7,0/.

3.5. "Flow injection analysis"



6. ábra: "Flow injection analysis" sematikus vázlata

Az enzimreaktoros analitikai mérések elvégzéséhez a 6. ábrán bemutatott rendszert állítottuk össze. LKB 2238 Uvicord S II típusú fotométert /Bromma, Svédország/ használtunk 10 μ l-es átfolyó küvettával. A rendszerből kijövő jelet Radelkis /Budapest/ OH-814/1 rekorderrel mértük. A puffert LKB 2132 microperpex perisztaltikus pumpával áramoltattuk. Az oszlop reaktor 1-16 U aktivitású rögzített enzimet /LDH/, ill. enzimeket /PK és LDH/ tartalmazott 1-5 ml-es /0,9 x 1,6-7,9cm/ térfogatban. A meghatározásokhoz 20-100 μ l mintát vittünk a reaktorra. Az átfolyási sebesség 25-300 ml/h volt. Kísérleteinkben a reakciók során átalakult, ill. keletkezett NADH mennyiségét mértük / λ =365nm/. Minden oszlophoz készítettünk egy kalibrációt, ismert koncentrációjú NADH oldatokkal. Az átfolyási sebesség megváltoztatásakor új kalibrációs egyenest vettünk fel. A NADH oldatok koncentrációját a 340 nm-en mért extinkciójukból számoltuk. A nagyobb pontosság elérésére törekedve,

a kalibrációs egyenesek felvételénél az elektromos jelmagasság helyett a jelmagasság és a félmagasságnál mért szélesség szorzatát /egy közelítő jel alatti területet/ ábrázoltunk a NADH koncentráció függvényében. A foszfoenol-piruvát és a piruvát meghatározásánál a NADH-t főlegben alkalmaztuk. A mérések elvégzéséhez 0,05 M trietanolamin / HCl puffert /pH=7,0/ használtunk. Az átalakított szubsztrát mennyiségét az oszlopra felvitt oldat NADH tartalma és a rekorderen kapott jelnek megfelelő /a kalibrációs egyenesről leolvasott/ érték különbségeként határoztuk meg. A tejsav meghatározásánál a minta 20 mg/ml NAD-t is tartalmazott a tejsav mellett. A méréseket hidrazin/glicin pufferben /pH=9,5/ végeztük. Az átalakított tejsavat az oszlopon keletkezett NADH mennyiségének mérésével határoztuk meg.

4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

4.1. A piruvát kináz és a tejsav dehidrogenáz rögzítése

Rögzítési kísérleteink eredményeit piruvát kinázra az I, tejsav dehidrogenázra pedig a II. táblázatban foglaltuk össze. Mindkét enzimre mind a négy hordozóhoz /BrCN-al aktivált Sepharose 4B; Szilokrom aldehid; p-benzokinonnal aktivált Akrilex P 100: karbodiimiddel aktivált Akrilex C 100/ való kötéssel aktív készítményt tudtunk előállítani. A legkevesebb fehérjét az Akrilex P 100 kötötte, a legtöbbet pedig a Szilokrom aldehid. Ugyanakkor a Szilokrom aldehidhez való rögzítésnél tapasztaltuk a legnagyobb mértékű inaktiválódást is. A legnagyobb aktivitással rendelkező rögzített enzimet mind a piruvát kináznál /190 U/g száraz gél/, mind a tejsav dehidrogenáznál /90,2 U/g száraz gél/ a karbodiimiddel aktivált Akrilex C 100-hoz való kötéssel értük el. A továbbiakban ezeknek a rögzített enzimeknek a sajátosságait vizsgáltuk, összehasonlítva az oldott enzimek tulajdonságaival.

A rögzítés során az enzim és a hordozó közti kölcsönhatás eredményeként az enzim katalitikus aktivitását megőrző, új rendszer jön létre, amely az öt felépítő komponensek sajátosságainak meghatározott együttesével rendelkezik. E közben módosulhat az enzim szerkezete is, ami a tulajdonságok megváltozását vonja maga után. Ezért elméleti szempontból is fontos az oldott és a rögzített enzim jellemzőinek összehasonlító vizsgálata, másrészt ahhoz, hogy alkalmazzuk ezeket a rögzített enzimeket, ismerni kell a katalitikus tulajdonságaikat és elsősorban működési és tárolási stabilitásukat.

I. táblázat: Piruvát kináz rögzítése különböző hordozókhoz

Hordozó	Sepharose 4 B	Szilokrom aldehid	Akrilex P 100	Akrilex C 100
Rögzítésnél al- kalmazott közeg	0,1M NaHCO ₃ /pH=8,0/	deszt.víz /pH=8,0/	foszfát puffer /pH=7,0/	foszfát puffer /pH=6,5/
fehérje /mg/ Reakcióelegybe	45,9	51,7	50	108
vitt aktivi- tás /U/	1776	1998	1933	5168
fehérje /mg/	14,1	45,7	4,3	26,9
/%/	30,7	88,4	8,5	24,9
Kötődött				
aktivitás /U/	37	49,9	60,9	190
/%/	2,1	2,5	3,2	3,7
Szűrletből és mosókból visz- számért akti- vítás /%/	43,7	11,7	96,8	74,2
Aktivitás veszteség /%/	54,2	85,8	0,0	22,1

Az adatok 1 g száraz géltre vonatkoznak.

II. táblázat: Tejsav dehidrogenáz rögzítése különböző hordozókhoz

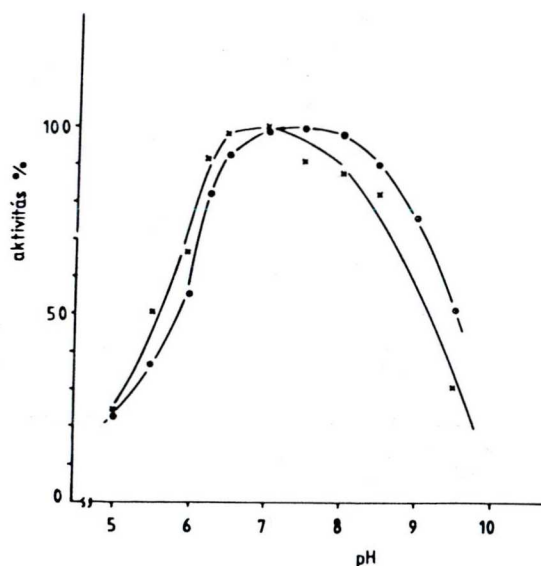
Hordozó	Sepharose 4 B	Szilokrom aldehid	Akrilex P 100	Akrilex C 100
Rögzítésnél al- kalmazott közeg	0,1M NaHCO ₃ /pH=8,0/	deszt.víz /pH=8,0/	foszfát puffer /pH=8,0/	foszfát puffer /pH=6,5/
fehérje /mg/ Reakcióelegybe	20,5	20,5	9,3	16,6
vitt aktivi- tás /U/	5460	5460	1485	4350
fehérje /mg/	11,7	20,3	7,5	16,3
/%/	57,0	99,0	80,6	98,2
Kötődött				
aktivitás /U/	18	28,3	9,8	90,2
/%/	0,33	0,51	0,65	2,07
Szűrletből és mosókból visz- számért akti- vítás /%/	39,2	0,6	33,7	2,0
Aktivitás vesztesség /%/	60,5	98,9	65,7	96,0

Az adatok 1 g száraz gélre vonatkoznak.

4.2. Oldott és rögzített piruvát kináz és tejsav dehidrogenáz katalitikus sajtságainak összehasonlító vizsgálata

4.2.1. Az enzimaktivitás pH függése

A piruvát kináz aktivitásának pH függését pH=5,0 - 9,5 között vizsgáltuk. A mérés kivitelezéséhez 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ /pH=5,0 - 8,0/, 0,1 M trietanolamin/HCl /pH=7,0 - 8,5/, valamint 0,1 M glicin/KOH /pH=8,5 - 9,5/ puffereket használtunk. A különböző pufferekben mért aktivitások azonos pH-nál is különböztek, így átfedő pH-kat használva a pH optimumnál mért aktivitáshoz viszonyítva adtuk meg a relatív aktivitásokat. Az oldott enzim optima pH=7,0-nél van, a rögzítetté pedig fél pH-val a lúgos tartomány felé tolódott el /7. ábra/ /87/.

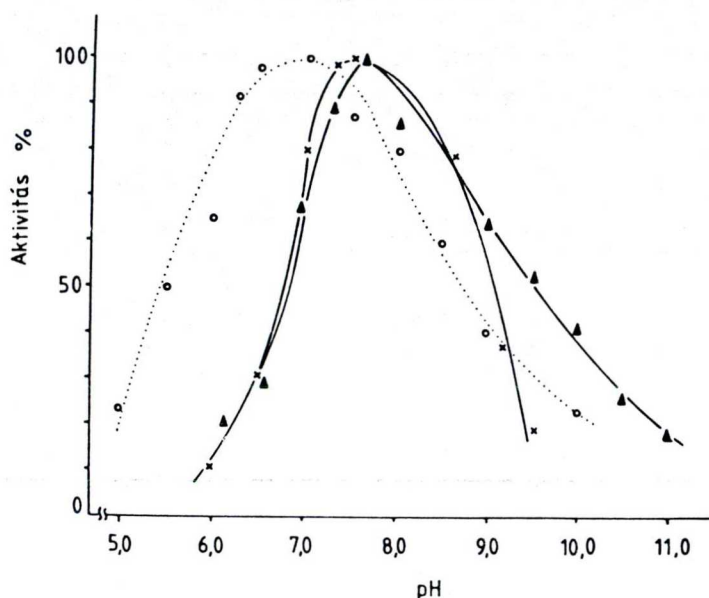


7. ábra: A piruvát kináz aktivitásának pH függése

Mind az oldott, mind a rögzített enzim esetében az elért legmagasabb aktivitást vettük 100%-nak /oldott enzim, 6,0 U/ml; rögzített enzim, 3,0 U/ml/.

-x-x-: oldott enzim; -●-●-: rögzített enzim.

A piruvát kináz aktivitásának pH függését különböző ionerősségű pufferekben is megmértük. Az ionerősséget 0,02-ről 0,2-re növelve csak kis mértékben csökkent a kötött enzim pH optimumának az oldott enzim pH optimumához viszonyított eltolódása. Kísérleti eredményeinket a 8. ábrán tüntettük fel.



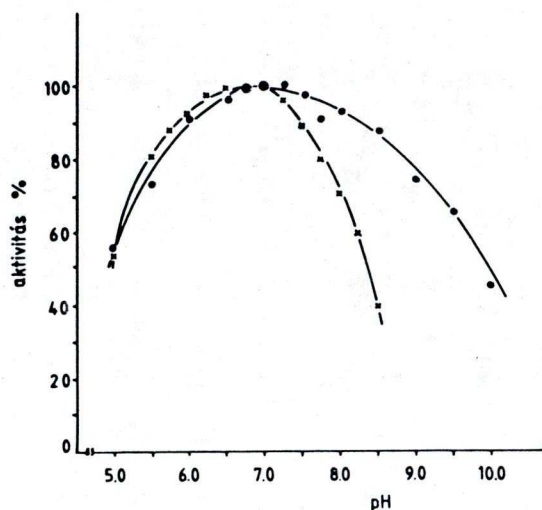
8. ábra: A rögzített piruvát kináz aktivitásának pH függése különböző ionerősségeknél

-o-o-: oldott enzim, 0,2 ionerősség

-x-x-: rögzített enzim, 0,2 ionerősség

-▲-▲-: rögzített enzim, 0,02 ionerősség

A tejsav dehidrogenáz aktivitásának pH függését pH=5,0 - 10,0 között vizsgáltuk. A méréseket 0,1 M kálium foszfát /pH=5,0 - 8,0/ és 0,1 M glicin/NaOH /pH=8,0 - 10,0/ pufferekben végeztük. Az optimum értéke oldott és rögzített enzimre egyaránt pH=7,0-nek adódott /9.ábra/. Megfigyelhető, hogy a rögzített enzim aktivitása az optimumnál magasabb pH értékeknél kevésbé csökken, mint az oldott enzimé /88/.



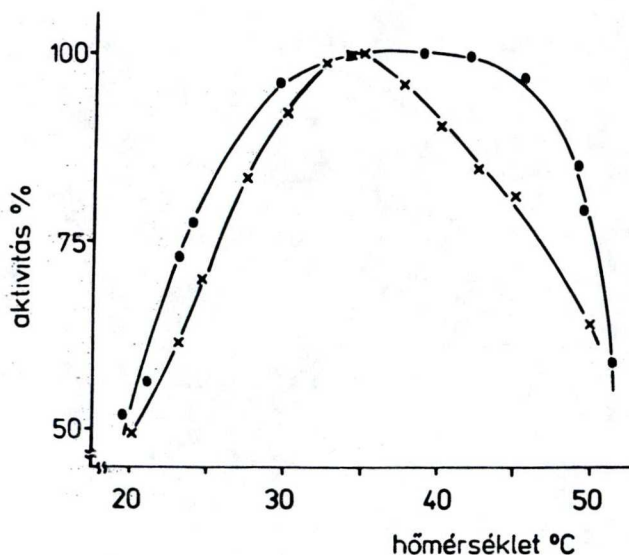
9. ábra: A tejsav dehidrogenáz aktivitásának pH függése

Mind az oldott, mind a rögzített enzim esetében az elért legmagasabb aktivitást vettük 100%-nak /oldott enzim, 3 U/ml; rögzített enzim, 1,3 U/ml/.

-x-x-: oldott enzim; -■-■-: rögzített enzim.

4.2.2. Az enzimaktivitás hőmérséklet függése

A hőmérséklet hatását a piruvát kináz aktivitására 19,5-51,5 °C hőmérséklet tartományban tanulmányoztuk. A méréseket 0,1 M trietanolamin/HCl pufferben /pH=7,6/ végeztük 5 perces reakció idővel. Az oldott enzim aktivitása a hőmérséklet emelésével először növekedett, 35 °C-on maximumot ért el, majd csökkent. A rögzített piruvát kináznál 32 °C és 43 °C között széles látszólagos hőmérsékleti optimum adódott. A relatív aktivitás kezdeti növekedése, ill. a maximum utáni csökkenése sokkal meredekebb változást mutatott, mint az oldott enzim esetében. Kísérleti eredményeinket a 10. ábrán tüntettük fel.

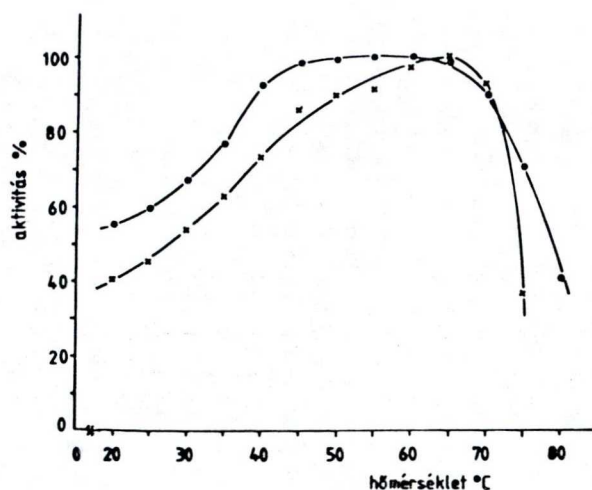


10. ábra: A piruvát kináz aktivitásának hőmérséklet függése

A mért maximális aktivitást vettük 100%-nak, ami az oldott enzimnél 5,3 U/ml, a rögzített enzimnél pedig 3,1 U/ml volt.

-x-x-: oldott enzim; -●-●-: rögzített enzim.

A tejsav dehidrogenáz aktivitásának hőmérséklet függését oldott enzimnél 20-75 °C között, rögzített enzim esetében pedig 20-80 °C hőmérsékleti tartományban mértük, 5 °C-onként. A reakció idő 5 perc volt. Kísérleteinkhez 0,1 M kálium foszfát puffert /pH=7,0/ használtunk. A rögzített tejsav dehidrogenáz látványosan hőmérsékleti optima 50 °C és 65 °C között található, az oldott enzimé pedig 65 °C körül van. Eredményeinket a 11. ábrán tüntettük fel.



11. ábra: A tejsav dehidrogenáz aktivitásának hőmérséklet függése
A mért maximális aktivitást vettük 100%-nak, ami az oldott enzimnél 10,9 U/ml, a rögzített enzimnél 2,4 U/ml volt.

-x-x-: oldott enzim; -●-●-: rögzített enzim.

4.2.3. Michaelis-állandók meghatározása

A szubsztrát koncentrációnak az oldott és a rögzített piruvát kináz aktivitására gyakorolt hatását 0,1-0,7 mM foszfoenol-piroszőlősav koncentráció tartományban vizsgáltuk 4,6 mM ADP mellett, ill. 0,2-1,5 mM ADP intervallumban 1,4 mM foszfoenol-piruvát koncentrációt alkalmazva. A mérések kivitelezése 0,1 M trietanolamin/HCl pufferben /pH=7,6/ történt 25 °C-on. A Michaelis-állandók K_M meghatározását a Michaelis-Menten egyenlet linearizált alakjának grafikus kiértékelésével végeztük el, Lineweaver-Burk féle ábrázolásban. Mérési eredményeinket a III. táblázatban foglaltuk össze.

III. táblázat: A piruvát kináz Michaelis-állandói

Szubsztrát	Michaelis-állandó K_M /mM/	
	oldott	rögzített
	enzim	
Foszfoenol-piruvát	$0,52 \pm 0,03$	$0,8 \pm 0,06$
ADP	$0,54 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,04$

A rögzített enzim K_M app értékeinek eltérése az oldott enzim K_M értékeitől nem jelentős. A mért értékek egy nagyságrenden belül vannak.

A tejsav dehidrogenáz Michaelis-állandóinak meghatározása 0,06-0,6 mM piruvát, ill. 0,02-0,1 mM NADH koncentráció tartományokban történt. A méréseket 0,1 M kálium foszfát pufferben /pH=7,0/ végeztük 25 °C-on. Az oldott és a rögzített enzimre kapott kísérleti eredményeinket a IV. táblázatban foglaltuk össze piruvát és NADH szubsztrátokra vonatkozóan. Piruvát szubsztrátra nézve a rögzített tejsav dehidrogenáz K_M app értéke gyakorlatilag megegyezett az oldott enzimre kapott K_M értékkel. NADH-ra nézve viszont a rögzített enzim K_M app értéke két nagyságrendes növekedést mutatott az oldott enzim Michaelis-állandójához viszonyítva.

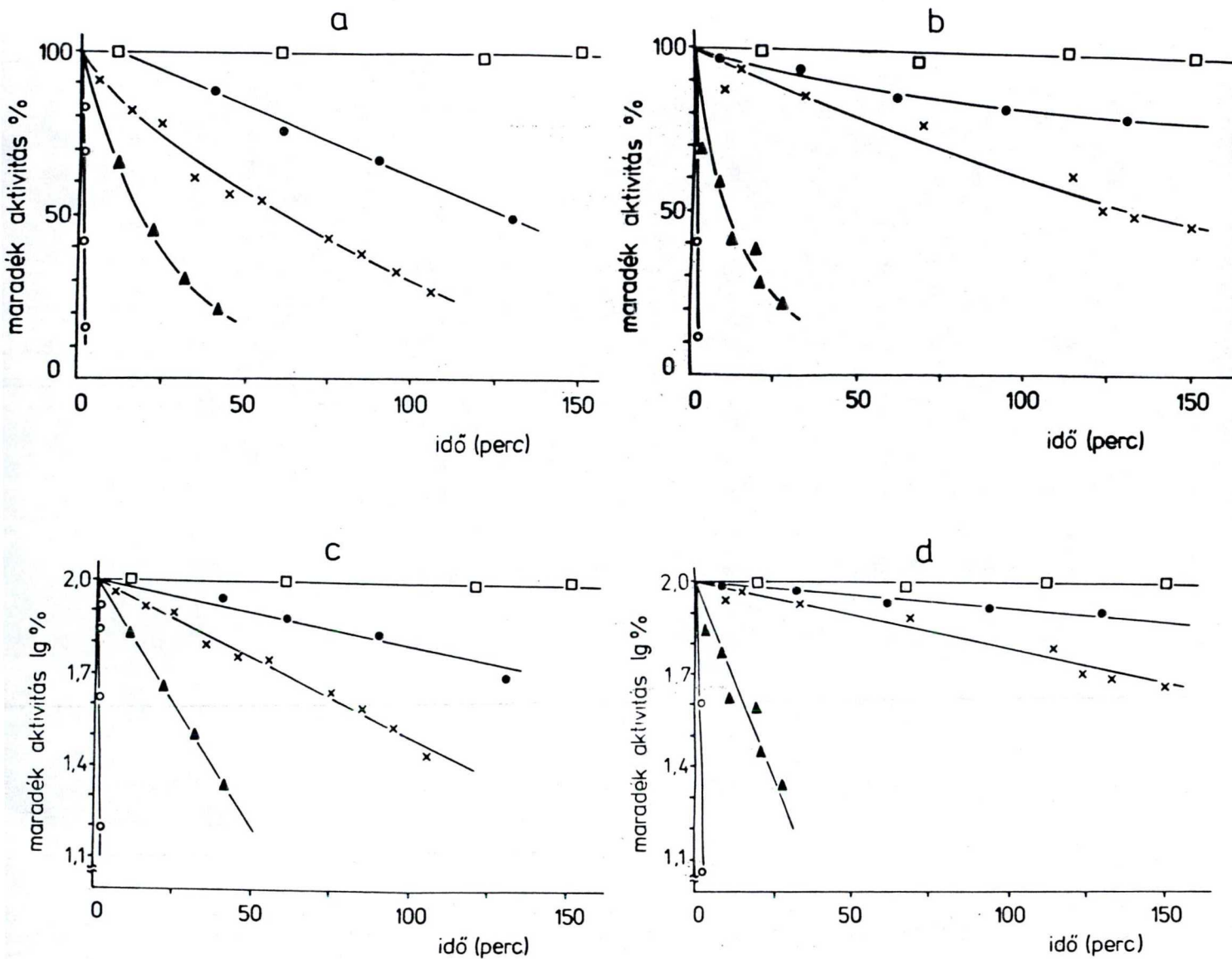
IV. táblázat a tejsav dehidrogenáz Michaelis-állandói

Szubsztrát	Michaelis-állandó $/K_M/$ $/mM/$	
	oldott	rögzített
	enzim	
Piruvát	$0,12 \pm 0,006$	$0,16 \pm 0,01$
NADH	$0,019 \pm 0,001$	$1,67 \pm 0,09$

4.3. Oldott és rögzített piruvát kináz és tejsav dehidrogenáz stabilitásának tanulmányozása

4.3.1. Hőinaktiválódás

A piruvát kináz hőinaktiválódását 45-65 °C intervallumban tanulmányoztuk. A méréseket 5 °C-onként végeztük 0,1 M trietanolamin/HCl pufferben /pH=7,0/. A rögzített piruvát kináz 50 - és 55 °C-on lényegesen stabilabbnak mutatkozott. 50 °C-on az oldott enzim maradék aktivitása 1,5 óra alatt csökkent 70%-ra, a rögzítetté pedig több mint 2,0 óra alatt. 55 °C-on az oldott enzim aktivitása egy óra elteltével csökkent a felére, a kötötté pedig két óra múlva. A mérési eredményeket a 12. ábra mutatja oldott ill. rögzített enzimre. A féllogaritmikus ábrázolás alapján megállapítható, hogy az inaktiválódás elsőrendű kinetikát követ. Az 50%-os inaktiválódáshoz tartozó időket az V. táblázatban foglaltuk össze.



12. ábra: Az oldott /a; c/ és a rögzített /b; d/ piruvát kináz hőinaktiválódása

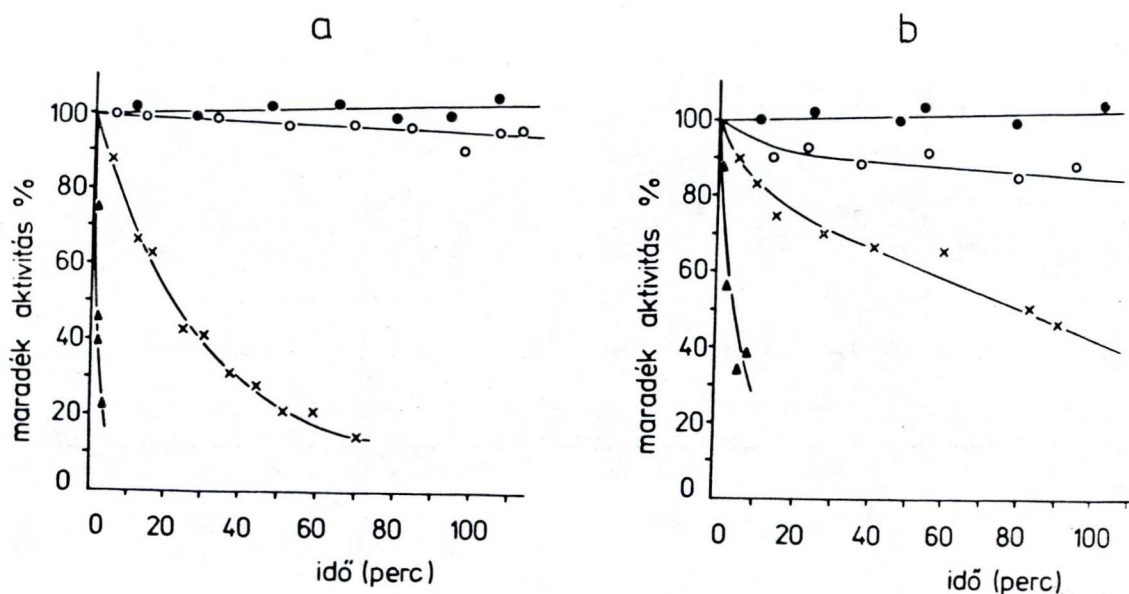
Enzim koncentrációk oldott enzimnél, 0,1 mg fehérje/ml; rögzített enzimnél, 0,4 mg száraz anyag/ml. Mind az oldott, mind pedig a rögzített enzim esetében a kezeletlen minta aktivitás értékét vettük 100%-nak, amely az oldott enzimnél 4,5 U/ml; a rögzített enzimnél pedig 2,8 U/ml volt.

-□-□-: 45 °C;
 -●-●-: 50 °C;
 -x-x-: 55 °C;
 -▲-▲-: 60 °C;
 -o-o-: 65 °C.

V. táblázat: Az oldott és a rögzített piruvát kináz hőstabilitásának összehasonlítása

Hőmérséklet /°C/	t _{1/2} /perc/	
	oldott enzim	rögzített
50	150	275
55	62	129
60	19	12
65	1,0	1,3

A tejsav dehidrogenáz hőinaktiválódását 50-65 °C között vizsgáltuk. A méréseket 0,1 M kálium foszfát pufferben /pH=7,0/ végeztük 5 °C-onként. 60-65 °C-on a rögzített enzim /13 b ábra/ nagyobb stabilitást mutatott, mint az oldott enzim /13 a ábra/. 50 °C-on az oldott és a kötött enzim egyaránt kismértékben aktiválódott a kísérlet mintegy két órás időtartama alatt. Oldott enzimnél az inaktiválódás első rendű kinetika szerint megy végbe, amire féllogaritmikus ábrázolás alapján lehetett következtetni. Az 50%-os inaktiválódáshoz tartozó időket VI. táblázatban adtuk meg.



13. ábra: Az oldott /a/ és a rögzített /b/ tejsav dehidrogenáz hőinaktiválódása

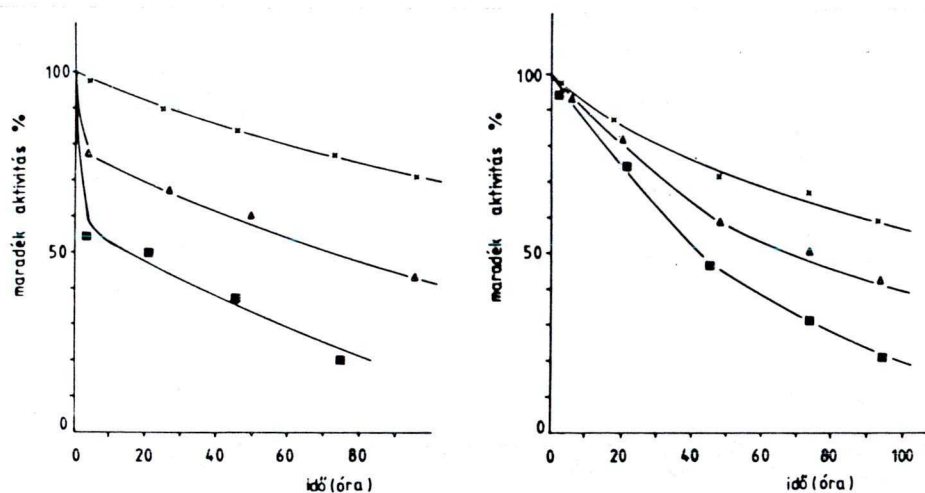
Enzim koncentrációk oldott enzimnél 0,1 mg fehérje/ml; rögzített enzimnél 0,4 mg száraz anyag/ml. Mind az oldott mind pedig a rögzített enzim esetében a kezeletlen minta aktivitás értékét vettük 100%-nak, amely az oldott enzimnél 10,0 U/ml; a rögzített enzimnél pedig 2,4 U/ml volt.
 -■-■-: 50 °C; -o-o-: 55 °C; -x-x-: 60 °C; -▲-▲-: 65 °C.

VI. táblázat: Az oldott és a rögzített tejsav dehidrogenáz hőstabilitásának összehasonlítása

Hőmérséklet /°C/	$t_{1/2}$ /perc/	
	oldott enzim	rögzített
60	22	83
65	1,5	4,5

4.3.2. pH stabilitás

A piruvát kináz hőinaktiválódásának pH függését az u.n. pH stabilitást 0,1 M trietanolamin/HCl pufferben vizsgáltuk pH=7,0-, pH=8,0-, valamint pH=9,0-nél 25 °C-on. Az aktivitás időbeni csökkenése pH=7,0-nál a leglassúbb és a pH-t 8,0-ra és 9,0-ra növelve egyre gyorsabbá válik. Az oldott enzim aktivitása hirtelen lecsökken pH=8,0-nál 3 óra alatt 77%-ra, pH=9,0-en pedig 56%-ra. A rögzített enzim kezdetben sokkal ellenállóbb. A maradék aktivitás az előbbi értékeket 27 ill. 38 óra alatt éri el. Kísérleti eredményeinket oldott piruvát kinázra a 14 a, rögzített enzimre pedig a 14 b ábrán tüntettük fel. Az 50%-os inaktiválódáshoz tartozó időket a VII. táblázatban adtuk meg.



14. ábra: Az oldott /a/ és a rögzített /b/ piruvát kináz pH stabilitása

Enzim koncentrációk oldott enzimnél 0,1 mg fehérje/ml; rögzített enzimnél 0,2 mg száraz anyag/ml. Mind az oldott, mind pedig a rögzített enzim esetében a kezdetlen minta aktivitás értékét vettük 100%-nak.

-x-x-: pH=7,0; -Δ-Δ-: pH=8,0; -■-■-: pH=9,0.

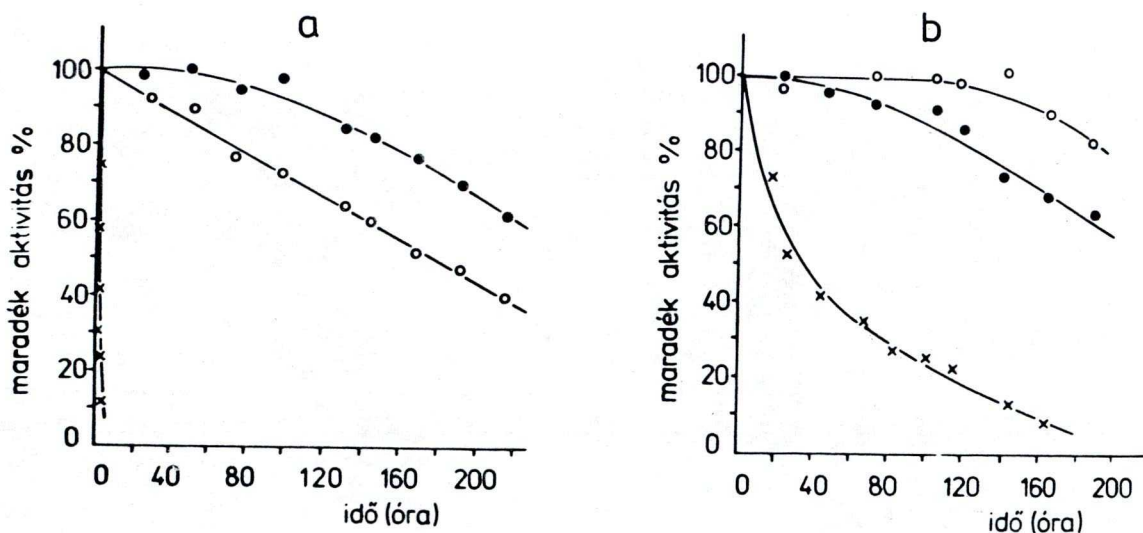
VII. táblázat: Az oldott és a rögzített piruvát kináz pH stabilitásának összehasonlítása.

pH	$t_{1/2}$ /óra/	
	oldott enzim	rögzített
8,0	70,7	66,0
9,0	13,9	41,5

A tejsav dehidrogenáz pH stabilitását 0,1 M foszfát pufferben vizsgáltuk pH=6,0-, pH=7,0-, valamint pH=8,0-nál 50 °C-on. A rögzített enzim pH=7,0- és pH=8,0-nál lényegesen stabilabb az oldottnál. pH=8,0-nál az oldott enzim egy óra alatt elvesztette aktivitásának 40%-át. Rögzített enzimnél ilyen mértékű inaktiválódást 22 óra alatt tapasztaltunk. Kísérleti eredményeinket oldott tejsav dehidrogenázra a 15. a -, rögzített enzimre pedig a 15. b ábrán tettük fel. Az 50%-os inaktiválódáshoz tartozó időket a VIII. táblázatban adtuk meg.

VIII. táblázat: Az oldott és a rögzített tejsav dehidrogenáz pH stabilitásának összehasonlítása

pH	$t_{1/2}$ /óra/	
	oldott enzim	rögzített
6,0	252	229
7,0	178	293
8,0	1	32



15. ábra: Az oldott /a/ és a rögzített /b/ tejsav dehidrogenáz pH stabilitása

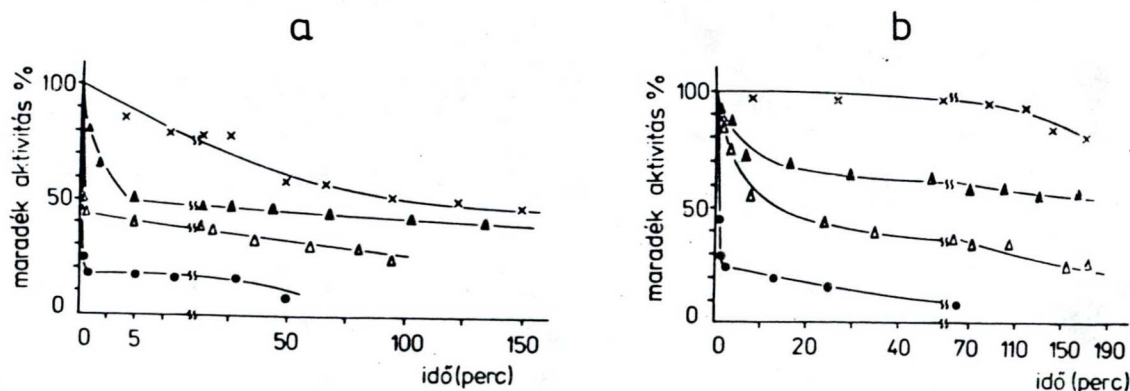
Enzim koncentrációk oldott enzimnél 0,1 mg fehérje/ml; rögzített enzimnél 0,2 mg száraz anyag/ml. Mind az oldott, mind pedig a rögzített enzim esetében a kezeletlen minta aktivitás értékét vettük 100%-nak, amely az oldott enzimnél 5,5 U/ml, a rögzített enzimnél pedig 1,2 U/ml volt.

-●-●-: pH=6,0; -○-○-: pH=7,0; -x-x-: pH=8,0.

4.3.3. Ureával szembeni stabilitás

Az urea hatását a piruvát kináz stabilitására 0,2 M, 1,0 M, 1,5 M, valamint 2,5 M koncentrációk mellett vizsgáltuk 0,1 M trietanolamin/HCl pufferben /pH=7,6/, az idő függvényében. Urea jelenlétében az aktivitás először hirtelen csökken, majd a továbbiakban sokkal lassabban. Mérési eredményeinket oldott és rögzített piruvát kinázra a 16. ábrán tüntettük fel. A rögzített enzim ureával szembeni ellenállóképessége sokkal jobb az oldotténál. 0,2 M

urea koncentrációjánál például az oldott enzim maradék aktivitása 4 perc alatt csökken 90%-ra, a kötötté pedig 2 óra alatt. Az 50%-os inaktiválódáshoz tartozó időket a IX. táblázatban adtuk meg.



16. ábra: Az oldott /a/ és a rögzített /b/ piruvát kináz ureával szembeni stabilitása

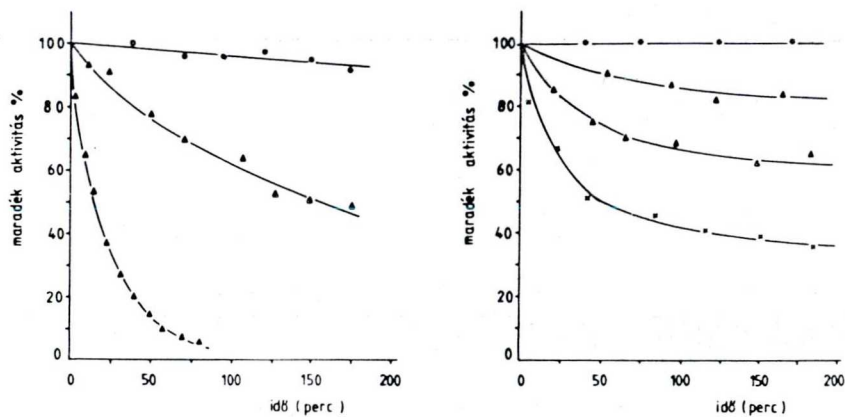
Enzim koncentrációk oldott enzimnél 0,1 mg fehérje/ml; rögzített enzimnél 0,3 mg száraz anyag/ml. Mind az oldott mind pedig a rögzített enzim esetében a kezeletlen minta aktivitását vettük 100%-nak, amely az oldott enzimnél 6,0 U/ml, a kötött enzimnél pedig 2,0 U/ml volt.

-x-x-: 0,2 M; -▲-▲-: 1,0 M; -△-△-: 1,5 M; -●-●-: 2,5 M.

IX. táblázat: Az oldott és a rögzített piruvát kináz ureával szembeni stabilitásának összehasonlítása

Urea koncentráció /M/	oldott	$t_{1/2}$ /perc/ enzim	rögzített
0,2	110		
1,0	5		232
1,5	0,3		13
2,5	0,1		0,9

Az urea hatását a tejsav dehidrogenáz stabilitására 0,1 M kálium foszfát pufferben /pH=7,0/ vizsgáltuk, 25 °C-on. A méréseket 2,5-3,5 M urea koncentráció tartományban végeztük 0,5 M-ként. A rögzített enzim stabilabbnak bizonyult az oldottnál. 2 M urea jelenlétében az oldott enzim aktivitása lassan csökkent az idő függvényében, míg a rögzített enzim 3 órás inkubálás során sem veszített aktivitásából. 3 M urea az oldott enzimet 1,5 óra alatt teljesen inaktiválta, a rögzített LDH pedig megőrizte aktivitásának több mint 60%-át. Kísérleteink eredményét oldott és rögzített tejsav dehidrogenázra a 17. ábrán tüntettük fel. Az 50%-os inaktiválódáshoz tartozó időket a X. táblázatban adtuk meg.



17. ábra: Az oldott /a/ és rögzített /b/ tejsav dehidrogenáz ureával szembeni stabilitása

Enzimkoncentrációk oldott enzimmél 0,1 mg fehérje/ml; rögzített enzimmél 0,3 mg száraz anyag/ml. Mind az oldott, mind pedig a rögzített enzim esetében a kezeletlen minta aktivitását vettük 100%-nak, amely oldott enzimmél 15 U/ml, a rögzített enzimmél pedig 1,5 U/ml volt.

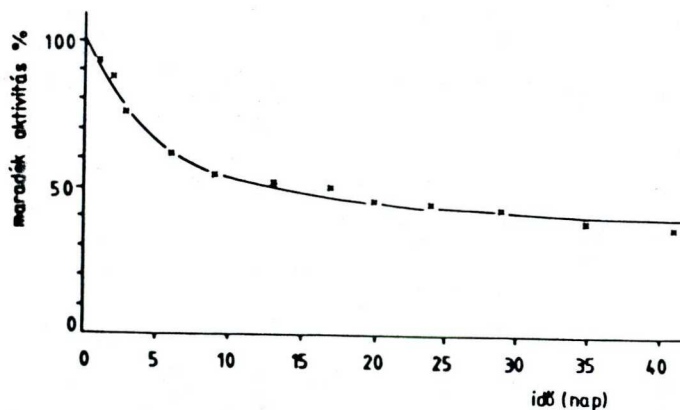
-o-o-: 2,0 M; -Δ-Δ-: 2,5 M; -▲-▲-: 3,0 M; -x-x-: 3,5 M.

X. táblázat: Az oldott és a rögzített tejsav dehidrogenáz ureával szembeni stabilitásának összehasonlítása

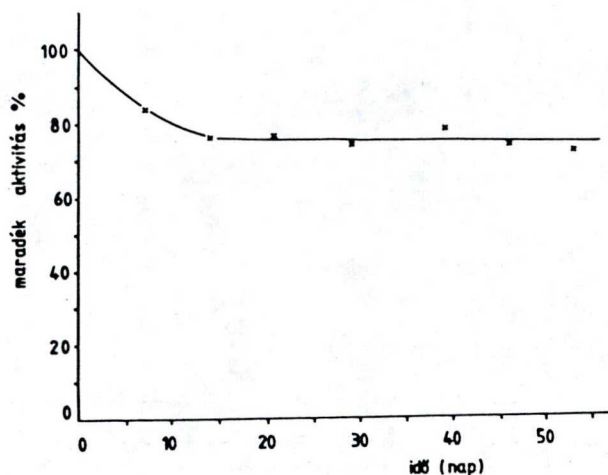
urea koncentráció /M/	$t_{1/2}$ /perc/	
	oldott	rögzített
	enzim	
2,5	150	
3,0	15	
3,5		52

4.3.4. Tárolási stabilitás

Hűtőszekrényben $+8^{\circ}\text{C}$ / tárolt rögzített piruvát kináz és tejsav dehidrogenáz aktivitásának időbeli csökkenését mértük. 40 napos tárolás után 0,1 M trietanolamin/HCl pufferben $\text{pH}=7,6$ / a piruvát kináz 40%-át /18. ábra/, a tejsav dehidrogenáz pedig 0,1 M foszfát pufferben $\text{pH}=7,0$ / 73%-át /19. ábra/ őrizte meg eredeti aktivitásának.



18. ábra: A rögzített piruvát kináz tárolási stabilitása



19. ábra: A rögzített tejsav dehidrogenáz tárolási stabilitása

4.4. Rögzített enzimek alkalmazása analitikai oszlopreaktorban

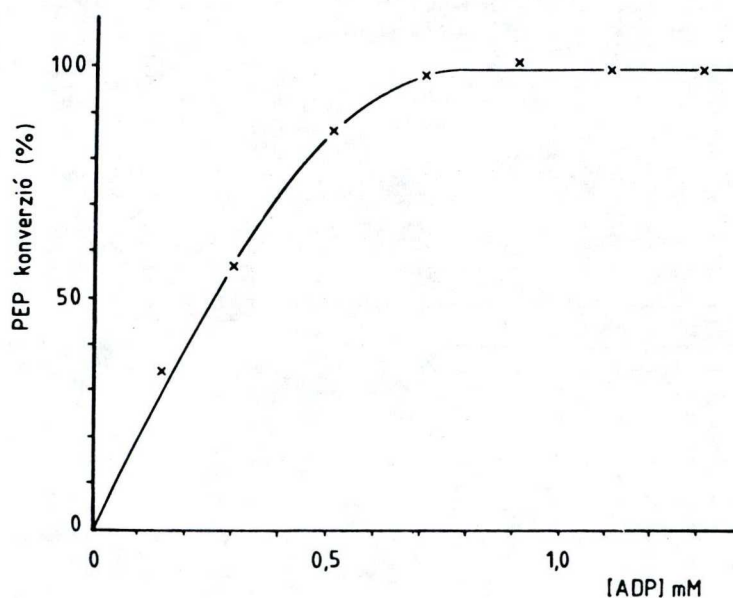
A rögzített piruvát kináz és tejsav dehidrogenáz jó stabilitása lehetőséget nyújtott arra, hogy ezeknek az enzimeknek az alkalmazhatóságát oszlopreaktorban is megvizsgáljuk.

4.4.1. Rögzített piruvát kináz alkalmazása analitikai oszlopreaktorban.

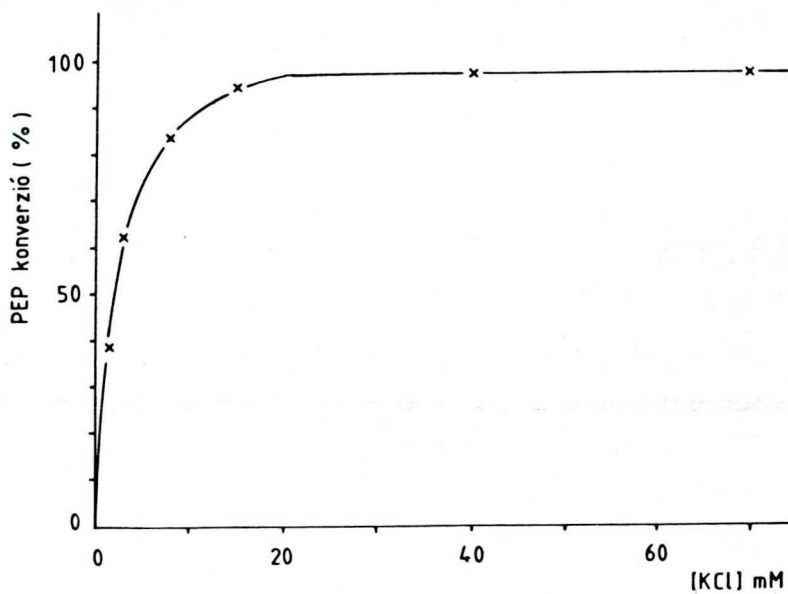
Rögzített piruvát kinázból 1,5 ml-es, 2,6 U aktivitású oszlopreaktort /0,9x2,5 cm/ állítottunk össze. Az ADP koncentráció függvényében 0,1 M trietanolamin/HCl pufferben /pH=7,6/ 0,2 mM PEP, 40 mM KCl és 0,5 mM $MgSO_4$ jelenlétében tanulmányoztuk a reaktor működését 70 ml/h átfolyási sebességnél /20.ábra/. PEP-re nézve maximális konverziót / a bemérés 99%-a / 0,9 mM ADP-nél kaptunk.

Megállapítottuk, hogy PEP-re nézve a maximális átalakulás eléréséhez legalább 25 mM KCl szükséges. A KCl koncentrációjának további

növelése /70 mM-ig/ nem befolyásolta az enzimreaktor működését /21. ábra/.



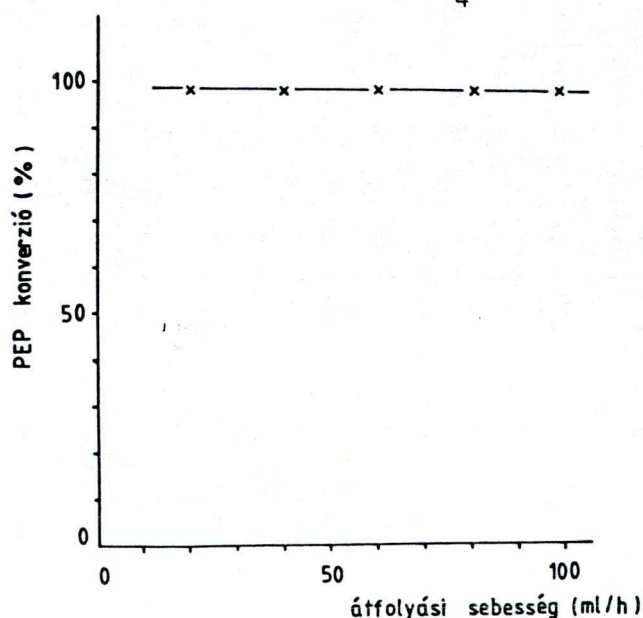
20. ábra: Az ADP koncentráció hatása a rögzített piruvát kináz oszlopreaktor PEP konverziójára



21. ábra: A KCl koncentráció hatása a rögzített piruvát kináz oszlopreaktor PEP konverziójára.

Az átfolyási sebesség 10 ml/h-ról 100 ml/h-ra való emelésekor a PEP-re mért konverzió mindössze 1%-ot csökkent. /22. ábra/ opti-

mális körülmények között /0,1 M trietanolamin/HCl /pH=7,6/, 0,2 mM PEP, 1,0 mM ADP, 40 mM KCl, 0,5 mM MgSO_4 /.



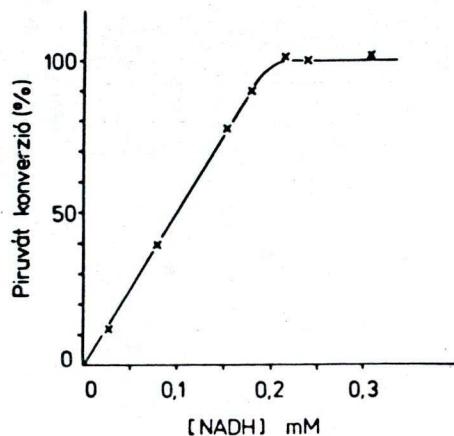
22. ábra: Az átfolyási sebesség változtatásának hatása a rögzített piruvát kináz oszlopreaktor működésére

4.4.2. Rögzített tejsav dehidrogenáz alkalmazása analitikai oszlopreaktorban

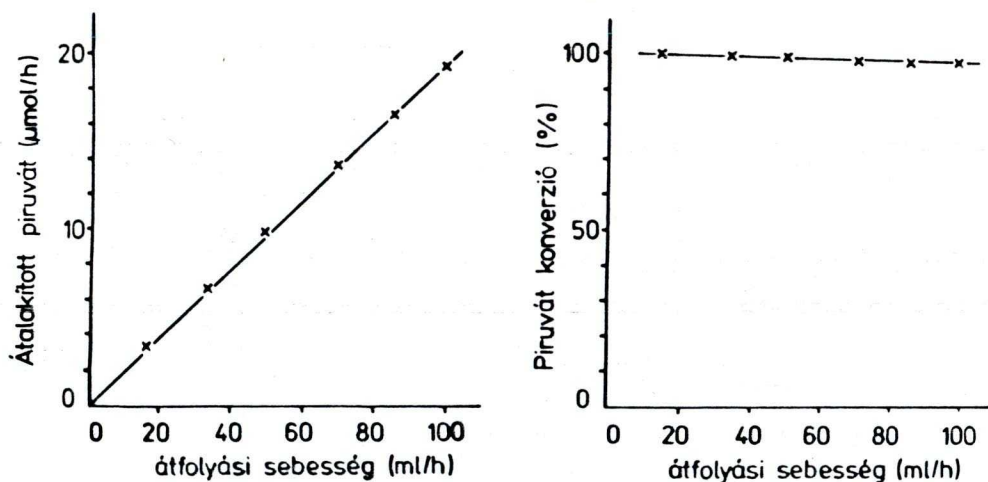
Rögzített tejsav dehidrogenáz enzimből 2 ml-es /0,9x3,3 cm/ 1,9 U aktivitású oszlopreaktort állítottunk össze. Tanulmányoztuk a NADH koncentráció hatását a reaktor piruvát konverziójára 14 ml/h átfolyási sebesség mellett. A reakcióelegy 0,2 mM piruvátot tartalmazott 50 mM trietanolamin/HCl pufferben /pH=7,0/. Megállapítottuk, hogy a piruvátnak és a NADH-nak gyakorlatilag azonos koncentrációban kell jelen lennie a teljes átalakuláshoz /0,2-0,22 mM/. Eredményeinket a 23. ábrán tüntettük fel.

Vizsgáltuk az oszlop működését különböző átfolyási sebességek mellett. A méréseket 50 mM trietanolamin/HCl pufferben /pH=7,0/

végeztük 0,2 mM nátrium piruvát ill. 0,24 mM NADH koncentrációknál. 100 ml/h-ig növelve az átfolyási sebességet, alig csökkent az időegység alatt átalakított szubsztrát mennyisége. Kísérleti eredményeinket a 24. ábrán tüntettük fel.



23. ábra: A NADH koncentráció hatása a rögzített tejsav dehidrogenáz oszlopreaktor piruvát konverziójára



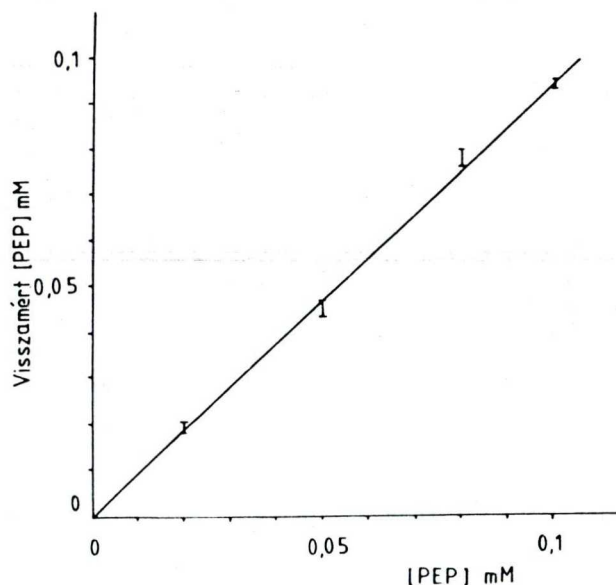
24. ábra: Az átfolyási sebesség változtatásának hatása a rögzített tejsav dehidrogenáz oszlopreaktor működésére

4.5. Rögzített piruvát kináz és tejsav dehidrogenáz alkalmazása analitikai meghatározásokra

4.5.1. "Batch" rendszerben végzett meghatározások

4.5.1.1. Foszfoenol-piruvát meghatározása

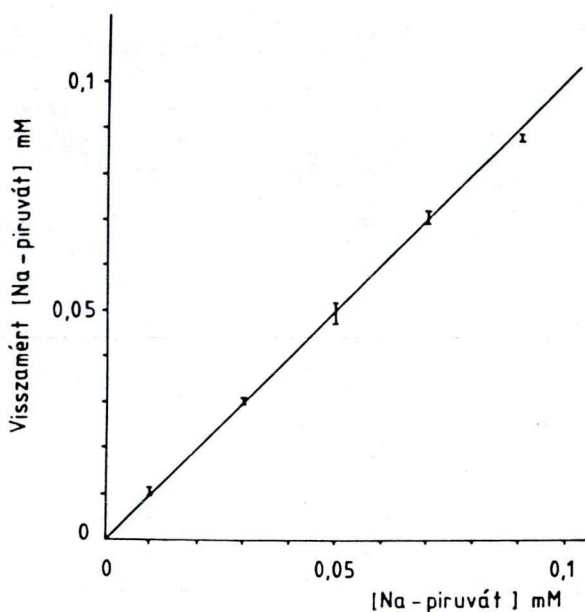
A klinikai gyakorlatban oldott piruvát kinázt használnak PEP meghatározására. Mi a rögzített enzimek alkalmazhatóságát vizsgáltuk. A kísérlet kivitelezése 50 mM trietanolamin/HCl pufferben /pH=7,6/ történt. A reakcióelegy 0,24 mM ADP-t, 40 mM KCl-t és 0,12 mM NADH-t tartalmazott. Az elegy 20 ml-ében 0,8 U aktivitású rögzített enzim alikvotokat szuszpendáltunk, majd meghatározott időközönként mintát véve oldott tejsav dehidrogenáz segédenzimmal 340 nm-nél mértük a reakció során keletkezett piruvát mennyiségét. A PEP koncentrációt 0,02-0,1 mM között változtattuk. A rögzített piruvát kináz felhasználható PEP mérésére mint azt a 25. ábra mutatja.



25. ábra: Foszfoenol-piruvát meghatározása rögzített piruvát kinázzal és oldott LDH-val kevert "batch" rendszerben /PK: 0,8 U; LDH: 1,0 U; reakcióidő : 20 perc; 25 °C/

4.5.1.2. Piroszőlősav meghatározása

Rögzített tejsav dehidrogenáz segítségével piroszőlősavat határoztunk meg "batch" rendszerben. A reakcióelegy 0,14 mM NADH-t tartalmazott 0,1 M trietanolamin/HCl /pH=7,0/ pufferben. 0,09 mM-ig gyakorlatilag 100%-os visszaméréssel tudtuk a piroszőlősavat meghatározni. Kísérleti eredményeinket a 26. ábrán tüntettük fel.



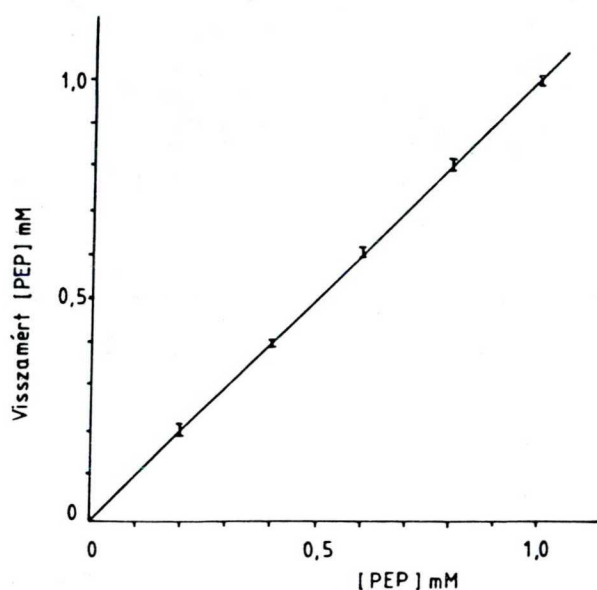
26. ábra: Piroszőlősav meghatározása rögzített LDH-val kevert "batch" rendszerben /LDH: 1 U; reakcióidő: 20 perc; 25 °C/

4.5.2. Enzim oszlopreaktorral végzett analitikai meghatározások /"Flow injection analysis"/

4.5.2.1 Foszfoenol-piruvát meghatározása

A foszfoenol-piruvát meghatározását két rögzített enzimet /piruvát kináz - tejsav dehidrogenáz/ tartalmazó reaktorral végeztük. Az oszlop 3,2 ml-es térfogatban /0,9x5,0 cm/ 0,8 U piruvát kinázt

és 1,0 U tejsav dehidrogenázt tartalmazott. A méréseket 0,05 M trietanolamin/HCl pufferben /pH=7,0/ végeztük, 99 ml/h átfolyási sebességnél. A vivő puffer 40 mM KCl-t és 0,5 mM MgSO_4 -et tartalmazott. A PEP koncentrációja 0,2-1,0 mM között változott. A mintában a PEP: ADP koncentrációjának aránya 1:10 volt. A minta térfogata 100 μl volt. 1 mM-ig a foszfoenol-piruvátot 100%-os visszaméréssel tudtuk meghatározni /27. ábra/.

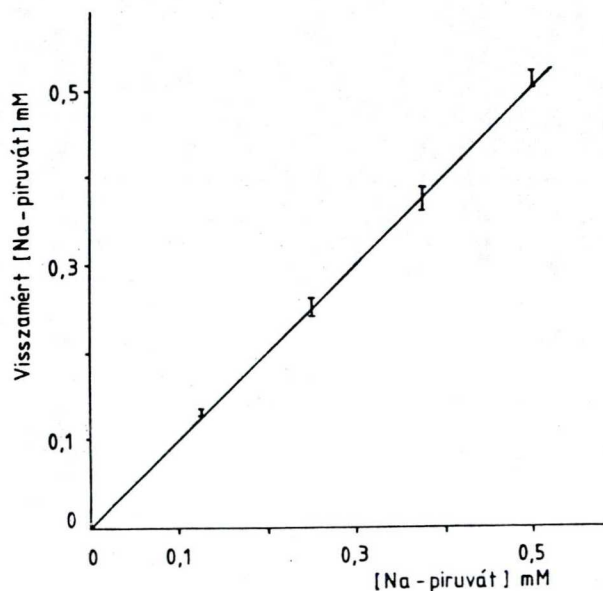


27. ábra: Foszfoenol-piruvát meghatározása rögzített piruvát kinázzal és LDH-val átfolyó rendszerben

4.5.2.2. Piruvát meghatározása

A piruvát meghatározásához 3 ml-es /0,9x4,7 cm/ tejsav dehidrogenáz reaktort használtunk, amely 1 U aktivitást tartalmazott. A méréseket 0,05 M trietanolamin/HCl pufferben /pH=7,0/ végeztük. A mintában a piruvát : NADH mennyiségének aránya 1:3 volt. A minta térfogata 100 μl volt. 100 ml/h átfolyási sebesség mellett 0,5 mM

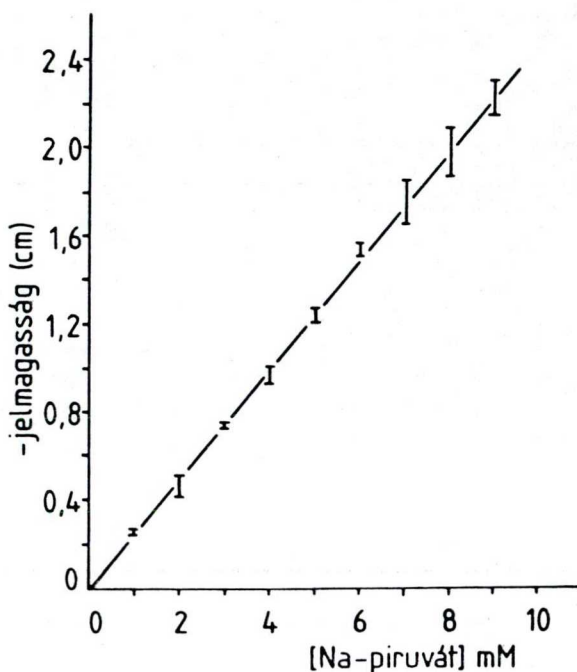
piruvát koncentrációig 100%-os visszamérést értünk el. Eredményeinket a 28. ábrán tüntettük fel.



28. ábra: Piruvát meghatározása rögzített LDH-val átfolyó rendszerben

A piruvát meghatározását úgy is elvégeztük, hogy a NADH-t /0,52 mM-t/ a vivő pufferhez tettük, így a felvitt minta csak piruvátot tartalmazott. A módszer előnye, hogy nem kell minden egyes mintához NADH-t hozzámérni, hátránya, hogy több NADH-t igényel. Az előző módszernél a jel magassága a feleslegben maradt NADH mennyiségével arányos, tehát ugyanolyan NADH koncentrációjú mintáknál a nagyobb piruvát koncentrációjúra kapunk kisebb jelet, itt pedig a negatív jelmagasság / a kitérés ellentétes előjelű / egyenesen arányos a minta piruvát koncentrációjával. A reaktor térfogatát 1 ml-re /0,9x1,6 cm/, a felvitt mintáét pedig 20 μ l-re csökkentettük, így a piruvát

meghatározását nagyobb koncentráció tartományban /9mM-ig/ tudtuk elvégezni. Az oszlop 1 U aktivitást tartalmazott. 0,05 M trietanolamin/HCl puffert /pH=7,0/ használtunk 100 ml/h átfolyási sebességnél /29. ábra/.

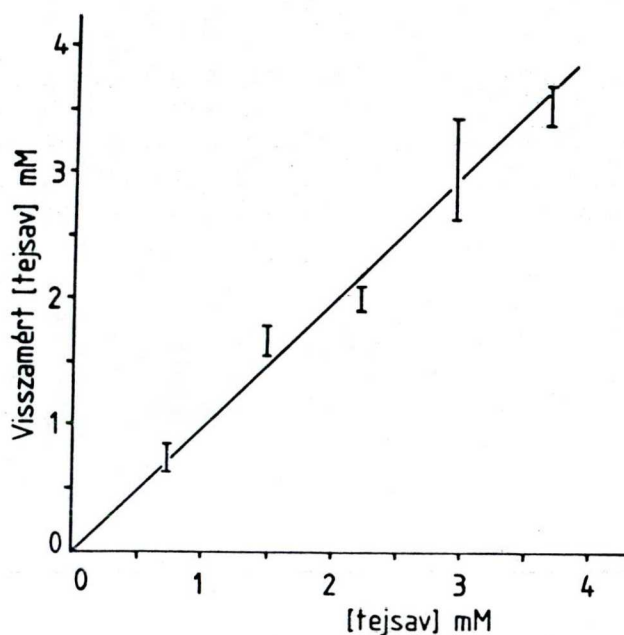


29. ábra: Piruvát meghatározása rögzített LDH-val átfolyó rendszerben 0,52 mM NADH-t tartalmazó trietanolamin/HCl pufferben /pH=7,0/

4.5.2.3. Tejsav meghatározása

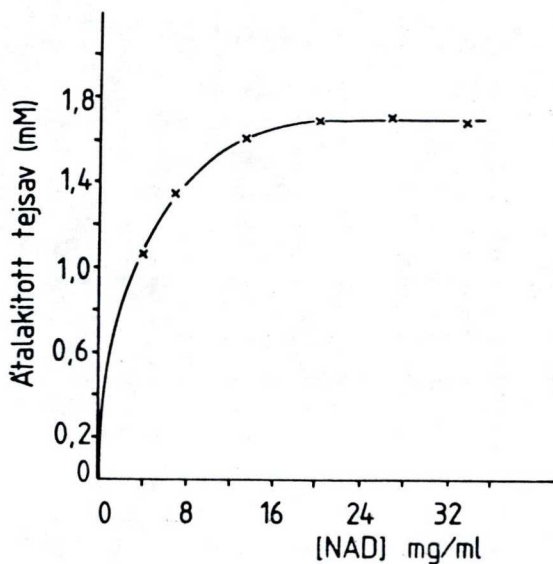
A tejsav dehidrogenáz által katalizált reverzibilis reakció pH=9,5-nél tejsav $\longrightarrow$ piruvát irányban megy végbe, így az LDH megfelelő körülmények között tejsav mérésére is felhasználható. A meghatározást hidrazin/glicin pufferben végeztük, amely hidrazinra nézve 0,4 M-os glicinre 1,0 M-os, EDTA-ra pedig 2 g/1000 ml-es volt és a pH-ját NaOH-dal állítottuk be pH=9,5-re. A 3 ml térfogatú/0,9x4,7 cm/ rögzített tejsav dehidrogenázzal töltött reaktor 4,1 U aktivitást tartalmazott. 99 ml/h átfolyási sebességnél 100 μ l mintával történtek a mérések. A minta 20 mg/ml NAD -t is tartalmazott a tej-

sav mellett. 4 mM-ig 100%-os visszamérést valósítottunk meg. 100%-nak az oldott enzimmal mért tejsavat vettük. Kísérleti eredményeinket a 30. ábrán tüntettük fel.



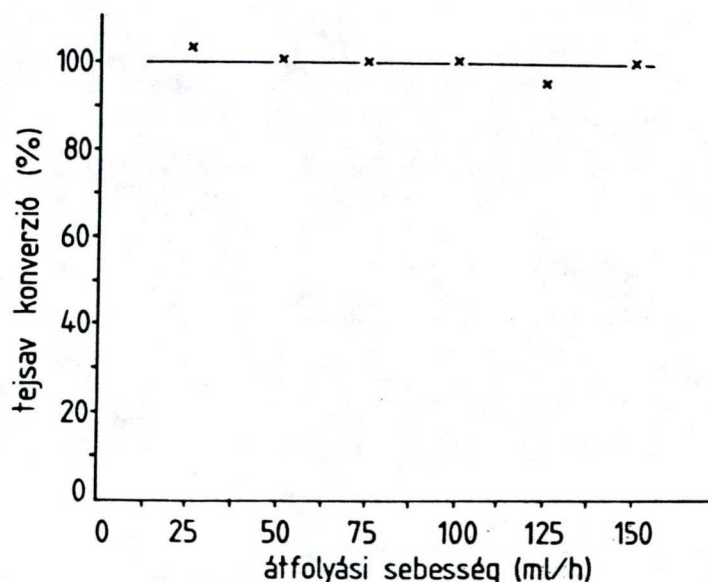
30. ábra: Tejsav meghatározása rögzített LDH-val átfolyó rendszerben

Tanulmányoztuk a NAD koncentráció hatását a reaktor működésére. Az oszlop 4,5 ml /0,9x7,1 cm/ rögzített tejsav dehidrogenázt tartalmazott, aktivitása 12 U volt. Hidrazin/glicin pufferben /pH=9,5/ dolgoztunk /0,4 M hidrazin; 1,0 M glicin; 2 g EDTA/1000 ml; 0,4 M Na_2SO_4 /. 99 ml/h átfolyási sebességnél 100 μl mintát vittünk az oszlopra, mely 1,71 mM tejsavat tartalmazott a NAD mellett. A NAD koncentrációját 34 mg/ml-ig növeltük és megállapítottuk, hogy 20 mg/ml NAD már elegendő a 100%-os konverzió eléréséhez. Kísérleti eredményeinket a 31. ábra szemlélteti.



31. ábra: Rögzített tejsav dehidrogenáz oszlopreaktor működése különböző NAD koncentrációknál

Vizsgáltuk az átfolyási sebesség hatását az oszlop működésére. A reaktor 4,5 ml-es /0,9x7,1 cm/ volt 12 U aktivitással. Hidrazin/glicin puffert /pH=9,5/ használtunk. 100 μ l mintával mértünk, amely 1,71 mM tejsavat tartalmazott és 20 mg/ml NAD-t. 150 ml/h-ig végeztünk méréseket 25 ml/h-ként. Minden átfolyási sebességnél új kalibrációt készítettünk ismert koncentrációjú NADH oldatokkal. Megállapítottuk, hogy 150 ml/h-ig az átfolyási sebesség növelése nem befolyásolja a reaktor konverzióját. 100%-os visszamérést értünk el. Eredményeinket a 32. ábrán tüntettük fel.



32. ábra: Rögzített tejsav dehidrogenáz oszlopreaktor működése különböző átfolyási sebességeknél

4.5.2.4. Mérések biológiai mintákkal

4.5.2.4.1. Különböző borok tejsav tartalmának meghatározása

A mérésekhez 5 ml térfogatú /0,9x7,9 cm/ 15,6 U aktivitású tejsav dehidrogenáz oszlopot használtunk. Hidrazin/glicin pufferben /pH=9,5/ dolgoztunk /0,4 M hidrazin; 1,0 M glicin; 2 g EDTA/1000ml; 0,4 M Na₂SO₄/. 100 ml/h átfolyási sebességnél 100 µl hígított bormintát - amely 20 mg/ml NAD-t is tartalmazott - vittünk fel az oszlopra. A hígításokat úgy választottuk meg, hogy a tejsav koncentrációja 1,5-2,0 mM közé essen. Az általunk vizsgált borminták tejsavtartalmának értékeit a XI. táblázatban foglaltuk össze. A táblázatból látható, hogy az oldott és rögzített enzimmel mért koncentráció értékek hibahatáron belül azonosnak tekinthetők.

XI. táblázat: Különböző borok tejsav tartalmának meghatározása

BOROK	Tejsav /mM/	
	oldott enzimmel	Kötött enzimmel
DEBRŐI	8,44 $\pm$ 0,31	8,48 $\pm$ 0,17
EGRI MUSKOTÁLY	14,29 $\pm$ 0,15	14,15 $\pm$ 0,18
PINOC NOIR	15,01 $\pm$ 0,16	14,96 $\pm$ 0,06
SZÜRKE BARÁT	15,05 $\pm$ 0,47	15,05 $\pm$ 0,13
PUSZTAMÉRGESI	15,73 $\pm$ 0,04	15,76 $\pm$ 0,15
RAJNAI	15,90 $\pm$ 0,13	15,94 $\pm$ 0,22
BIKAVÉR	16,36 $\pm$ 0,43	16,48 $\pm$ 0,11
SZEGEDI MUSKOTÁLY	20,09 $\pm$ 0,29	19,63 $\pm$ 0,07
CSONGRÁDI CABERNET	21,16 $\pm$ 0,25	21,26 $\pm$ 0,21

4.5.2.4.2. Vérminták tejsav és piruvát tartalmának mérése

A Szegedi Orvostudományi Egyetem Sebészeti Műtéttani Intézetétől kapott haemorrhagiás shockban lévő kutyák /89/ vérmintáinak tejsav és piruvát koncentrációját mértük. A tejsav mérése a borok analízisére használt oszloppal történt. A XII. táblázatban a plazma tejsav koncentrációját adtuk meg öt mintára.

A minták piruvát koncentrációját 3 ml-es /0,9x4,7 cm/ 2,5 U aktivitású LDH oszloppal mértük. Az átfolyási sebesség 120 ml/h volt. A méréseket 0,05 M trietanolamin/HCl pufferben /pH=7,0/ végeztük.

A NADH feleslegben volt. Eredményeinket a XIII. táblázatban foglaltuk össze. Az eredményekből látható, hogy rögzített enzim oszlopreaktorok vérminták esetében is eredményesen alkalmazhatók.

XII. táblázat: Vérminták tejsav koncentrációja

Tejsav /mM/		
	rögzített enzimmel	oldott enzimmel
1.	2,64 $\pm$ 0,13	2,68 $\pm$ 0,06
2.	8,18 $\pm$ 0,34	8,03 $\pm$ 0,10
3.	10,05 $\pm$ 0,19	9,57 $\pm$ 0,18
4.	9,87 $\pm$ 0,28	10,09 $\pm$ 0,16
5.	10,16 $\pm$ 0,29	9,88 $\pm$ 0,16

XIII. táblázat: Vérminták piruvát koncentrációja

Piruvát /mM/		
	rögzített enzimmel	oldott enzimmel
1.	0,18 $\pm$ 0,016	0,15 $\pm$ 0,008
2.	0,39 $\pm$ 0,034	0,41 $\pm$ 0,021
3.	0,59 $\pm$ 0,052	0,61 $\pm$ 0,031
4.	0,63 $\pm$ 0,055	0,64 $\pm$ 0,032
5.	0,54 $\pm$ 0,047	0,56 $\pm$ 0,028

4.5.2.5. Rögzített tejsav dehidrogenáz oszlopreaktor működési stabilitása

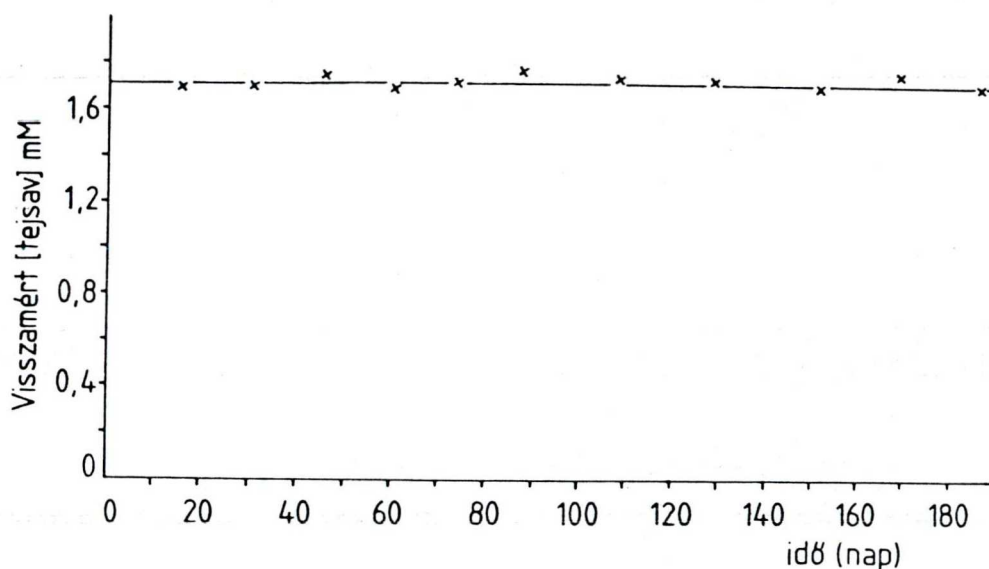
Vizsgáltuk a rögzített tejsav dehidrogenáz reaktor működési stabilitását pH=7,0-nél. 1,6 ml-es /0,9x2,5 cm/ LDH oszlopunk kezdeti aktivitása 1 U volt. Az analizisek meggyorsítása végett a mintatérfogatot 20 μ l-nek, az átfolyási sebességet pedig 300 ml/h-nak választottuk. A minta 1,0 mM nátrium-piruvátot tartalmazott, 0,05 M trietanolamin/HCl pufferben. A NADH feleslegben volt. 22 nap alatt összesen 625 mérést végeztünk el. Közben az oszlop aktivitása 0,28 U-ra csökkent, de még ekkor is 100%-os konverzióval működött. Megállapítható, hogy az enzim aktivitás vesztésében nagyobb szerepe van a közben eltelt időnek, mint a mérések számának. 8 nap alatt 0,53 U-t csökkent az enzim aktivitása pedig közben csak 20 mérést végeztünk, míg 200-nál több mérés sem csökkentette az enzim aktivitását rövid idő alatt. Az átfolyási sebesség növelésével és a térfogatok /oszlop és felvitt minta/ csökkentésével sikerült ugyan a meghatározást meggyorsítani / egy mérés mindössze 1,3 percet igényel/, ugyanakkor azonban a szórások értékei nagyobbak lettek, mint a korábbi méréseknél /XIV. táblázat/.

XIV: táblázat: Rögzített tejsav dehidrogenáz oszlopreaktor működése 0,05 M trietanolamin/HCl pufferben /pH=7,0/

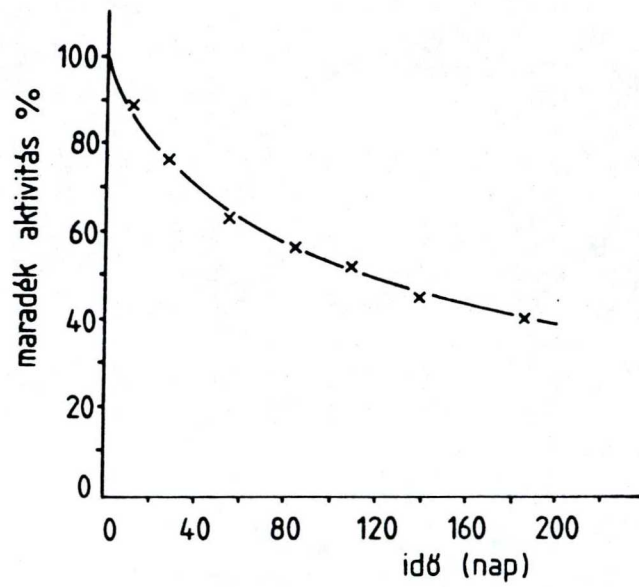
Működési idő /nap/	Mérések száma	Minta /1 mM/
1.	45	1,00 $\pm$ 0,19
9	65	1,01 $\pm$ 0,13
11	300	0,99 $\pm$ 0,09
18	470	1,02 $\pm$ 0,25
22	625	0,99 $\pm$ 0,17

4.5.2.6. Rögzített tejsav dehidrogenáz reaktor tárolási stabilitása

Vizsgáltuk a rögzített LDH reaktor tárolhatóságát hidrazin/glicin pufferben /pH=9,5/. A tárolás hűtőszekrényben történt 8°C -on. A méréseket szobahőmérsékleten végeztük. Az oszlop térfogata 4,5 ml /0,9x7,1 cm/, a mintáé 100 μl volt. A minta 1,71 mM tejsavat tartalmazott. 100 ml/h átfolyási sebességet alkalmaztunk. Megállapítottuk, hogy az oszlop hónapokig használható anélkül, hogy a konverzió csökkenne /33. ábra/. Az enzim aktivitása fél éves tárolás során 40%-ra csökkent /34. ábra/. Az 50%-os inaktiválódáshoz tartozó idő 118 nap.



33. ábra: Rögzített tejsav dehidrogenáz oszlopreaktor tárolásának hatása a konverzióra /pH=9,5; 8°C /.



34. ábra: Rögzített tejsav dehidrogenáz oszlopreaktor tárolási stabilitása /pH=9,5; 8 °C/ /Az oszlop térfogata 5 ml, kezdeti aktivitása 25,4 U/

5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

5.1. Enzim rögzítési módszerek értékelése

A piruvát kinázt és a tejsav dehidrogenázt kovalens kötésekkel rögzítettük. Hordozóként agaróz alapú Sepharose 4B-t, szilícium-dioxid alapú Szilokrom aldehidet, valamint a poliakrilamid típusú Akrilex P 100-at és Akrilex C 100-at használtunk. A rögzített enzimek mindegyike katalitikus aktivitással rendelkezett, de az egy gramm gélen kötött enzim egységek száma, a kötött fehérje mennyisége és az aktivitás mennyiség a hordozótól és az enzimtől függően jelentős eltéréseket mutatott. Az inaktiválódás mértéke a Szilokrom aldehidhez való kapcsoláskor volt a legnagyobb. Így noha fehérje kötő kapacitás szempontjából ez a gél bizonyult a legjobbnak, aktivitásra nézve viszont csak közepesnek számított. A legnagyobb aktivitású rögzített enzimeket a karbodiimiddel aktivált Akrilex C 100-hoz való kötésnél kaptuk, a piruvát kinázból 190 U, a tejsav dehidrogenázból pedig mintegy 90 egység kötődött egy gramm száraz gélre. Ezeket az értékeket nehéz összevetni az irodalmi adatokkal, mivel vagy nem közölték az enzim rögzítés anyagmérlegét, vagy más egységekben /U/ml: mg/g/ adták meg.

Pollack és munkatársai /90/ 10 U/ml aktivitással kötötték a piruvát kinázt. A tejsav dehidrogenázt 1,6-6 U/g aktivitással kötték poliakrilonitrilhez /72/, Al_2O_3 -on 0,3-30 mg enzim adszorbeálódott grammonként /77/, poliakrilamid kopolimerben pedig 13 U/ml aktivitást mértek /90/.

Az enzimek kovalens kötésekor tapasztalt jelentős aktivitás veszteségnek több oka lehet. Egyrészt a kötések kialakításában az aktív

centrum aminosav oldalláncai is részt vehetnek, másrészt rögzítéskor a hordozó vagy az egymás mellett lévő fehérje molekulák térben lefedhetik az enzim aktív centrumát /91/. Töltéssel rendelkező hordozóknál diffúziós gátaakkal is számolni kell. Megváltozhat a fehérje felületi töltése is ami a térszerkezet megváltozását vonhatja maga után.

5.2. Az Akrilex C 100-hoz rögzített enzimek sajátosságainak értékelése

A rögzített piruvát kináznál az aktivitás pH optimumának lúgos irányba való eltolódását figyeltük meg az oldott enzimhez viszonyítva. Az eltolódás magyarázható azzal, hogy a rögzített enzim anionos mikro-környezetben van. A hordozó sajátosságai a kötött enzim tulajdonságaira is befolyással vannak. Goldstein és munkatársai /92,93/ szerint a töltéssel rendelkező hordozó a rögzített enzim pH optimumának eltolódását eredményezi az oldottéhoz képest. Megfigyelték, hogy a negatív töltésű hordozók a pH optimum lúgos irányban való eltolódását eredményezték, pozitív töltésű hordozóknál pedig savas irányú eltolódást mértek. A mikro-környezeti hatásból eredő eltolódás a hidrogén és hidroxil ionok egyenlőtlen eloszlásának következménye. Polianionos gélekben a hidrogén ionok koncentrációja nagyobb, mint a külső folyadékban. A pufferek ionerősségének növelésével ezek az eltérések megszüntethetők /12/. A piruvát kináznál az ionerősség növelése a rögzített enzim aktivitásának pH optimum eltolódását csökkentette ugyan, de nem szüntette meg. Az Akrilex C 100 polianionos mikro-környezete mellett tehát az enzim szerkezetének a kovalens rögzítésből eredő megváltozását sem lehet figyelmen kívül hagyni.

A tejsav dehidrogenáznál az oldott és a rögzített forma is $\text{pH}=7,0$ -nél mutatott maximális aktivitást. Az optimum görbe alakja azonban megváltozott, kötött enzimnél a lúgos tartomány felé való kiszélesedését tapasztaltuk.

A rögzített enzim a létrejött kovalens kötés révén legalább egy oldalláncában módosítva van és speciális kölcsönhatások kialakítására is lehetőség nyílik /enzim-enzim, enzim-más fehérje, enzim-hordozó/. Ha az enzim kémiai módosítása az aktív centrumban történik, megváltozik a K_M vagy a $V_{\max}$ értéke. Ha a módosítás nem érinti az aktív centrumot akkor is a fehérje konformációjának és a felületi töltés viszonyoknak a megváltoztatása révén hatást gyakorolhat a molekula egészére.

A piruvát kináz és a tejsav dehidrogenáz aktivitásának hőmérséklet függését tanulmányozva megállapítottuk, hogy a rögzített enzimek optimum görbéi kiszélesedtek az oldott enzimekéhez képest. A különbségek feltehetően a két forma eltérő stabilitására vezethetők vissza.

A rögzített enzim Michaelis-konstansa eltérhet az oldott enzimétől. A változás oka lehet az enzim konformációjának megváltozása mellett a hordozó töltése, diffúziós különbségek. Ha a szubsztrát és a hordozó különböző töltésűek, akkor a $K_{M \text{ app}}$ érték csökkenése várható az oldott enzimhez képest, mivel a hordozóban nagyobb lesz a szubsztrát koncentrációja, mint az oldatban. Ha a szubsztrát töltése meggyezik a hordozóéval, a $K_{M \text{ app}}$ értéke nő. Az előbbi megfontolások alapján, ha mind a hordozó, mind a szubsztrátok hidrofób jellegűek, a $K_{M \text{ app}}$ értéke rögzített enzimre kisebbnek adódik /94,95/. Az

Akrilex C 100 hidrofil, polianionos jellegű gél, negatív töltésű szubsztrátokra a $K_{M\text{ app}}$ érték növekedése várható.

Irodalmi adatok szerint számos esetben nem találtak lényeges eltérést a rögzített és az oldott enzim Michaelis-állandójában /96, 75, 73, 68/. Kovalenko és munkatársai /77/ azonban az Al_2O_3 -hoz rögzített LDH $K_{M\text{ app}}$ értékét NADH-ra két nagyságrenddel nagyobbak mérték, mint az oldott enzimét. Wykes /76/ a DEAE-cellulózhoz kötött LDH esetén azt tapasztalta, hogy piruvátra 0,81 mM-al nőtt a $K_{M\text{ app}}$ értéke.

Az Akrilex C 100-hoz kötött piruvát kináz és tejsav dehidrogenáz $K_{M\text{ app}}$ értékei általában nem tértek el lényegesen az oldott enzimekétől. Kivételt képezett a tejsav dehidrogenáz NADH-ra mért látszólagos Michaelis-konstansa, mely két nagyságrenddel adódott nagyobbak az oldott enziménél. Feltételezhető, hogy a töltés és a diffúziós viszonyok mellett az enzim szerkezetének megváltozása és a felületi áttöltődés is szerepet játszik a szubsztráthoz való affinitás alakulásában. Ezzel magyarázható, hogy noha a szubsztrátok és a hordozó is negatív töltésűek, mégsem következett be minden esetben a $K_{M\text{ app}}$ értékek növekedése.

A rögzített enzimek stabilitási tulajdonságai is eltérhetnek az oldott enzimekétől. Az eltérés több okra vezethető vissza. A kötött enzim kémiaiilag módosítva van, ami a konformáció megváltozását eredményezheti. Új kölcsönhatások, másodlagos kötések tovább módosíthatják az enzim harmadlagos és negyedleges szerkezetét /11, 12/. A hidrofil jellegű gélek általában stabilizálják az enzimek aktív

konformációját. Az egyes enzim molekulák különböző számú kötéssel kapcsolódhatnak a hordozóhoz, így a hordozóhoz viszonyított helyzetük más és más lehet. A különböző bekötődésre a több alegységes enzimeknél még több lehetőség kínálkozik. A hordozóhoz való kötődés akkor is kihat a térszerkezet stabilitására, ha maga a kötés nem jár a konformáció megváltozásával.

A rögzített enzimek hővel szembeni stabilitása általában nőtt az oldotthoz képest. A piruvát kináz oldott és rögzített formája egyaránt elsőrendű kinetika szerint inaktiválódott. A rögzített tejsav dehidrogenázánál /Akrilex C 100-hoz kötött/ összetett inaktiválódási kinetikát figyeltünk meg. Az összetett kinetikának két oka is lehet. Az egyik, hogy az azonos funkciójú enzimformák eltérő stabilitásúak, ill. az oligomer enzim disszociál, és az oligomer és a monomerek eltérő stabilitással bírnak. A piruvát kináz és a tejsav dehidrogenáz tetramer enzimek, így az összetett kinetika nem meglepő /97, 98/. A piruvát kináznál urea jelenlétében kezdetben gyors inaktiválódást figyeltünk meg. Feltehető, hogy a tetramer enzim dimerekre disszociált /97/, vagy kevésbé kompakt tetramer enzim keletkezett /98/, amely kisebb aktivitással rendelkezett. A későbbiekben ez disszociált dimerekre és monomerekre. Ez a folyamat kötött enzimnél lassabb, ami a hidrofil gél stabilizáló hatásával magyarázható.

5.3. Rögzített enzimek alkalmazása

Az Akrilex C 100-hoz rögzített enzimek működését tanulmányoztuk oszlopreaktorban. Meghatároztuk a szubsztrát koncentrációk optimális értékeit. A tejsav dehidrogenáz és a piruvát kináz-tejsav dehidrogenáz reaktorunk konverzióját a sebesség 100 ml/h-ig való növelése mindössze 1-2%-kal csökkentette. Érdekesnek láttuk ezeket a készítményeket analitikai vizsgálatokra felhasználni. "Batch"- és oszlopreaktoros méréseket végeztük, ahol rögzített enzimeinkkel elvégeztük a foszfoenol piruvát, a piruvát és a tejsav mennyiségi analizisét. Kísérleti körülményeink mellett 97-100%-os visszamérést értünk el.

Átfolyó küvettás rendszerünket biológiai minták mérésére is alkalmaztuk. Bor - és vérminták tejsav ill. tejsav és piruvát tartalmát határoztuk meg. Az oldott és a rögzített enzimmel mért koncentráció értékek hibahatáron belül azonosak voltak, tehát a rögzített enzim oszlopreaktorok biológiai minták esetében is eredményesen alkalmazhatók. Több enzim egybekapcsolásával más intermedierek is mérhetők.

A rögzített enzimes reaktorok felhasználhatók kofaktorok regenerálására és inhibítor meghatározására is /71, 91/.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink során előállítottuk a piruvát kináz és a tejsav dehidrogenáz különböző hordozókhoz kötött formáit. Rögzített enzimeink mindegyike rendelkezett katalitikus aktivitással. Legaktívabbnak a vízoldható karbodiimiddel aktivált karboxil csoportokat tartalmazó poli-akrilamid alapú hordozón rögzített enzimeket találtuk, így ezek sajátosságait vizsgáltuk részletesebben, összehasonlítva az oldott enzimek tulajdonságaival.

Megállapítottuk, hogy a tejsav dehidrogenáz oldott és rögzített formájának pH optimumának értéke megegyezik, a piruvát kináznál lúgos irányba való eltolódást tapasztaltunk az oldotthoz képest.

Tanulmányoztuk az enzimek aktivitásának hőmérséklet függését. Rögzített enzimeknél az optimum görbe kiszélesedett feltehetően a nagyobb stabilitás eredménye képpen.

Az oldott és a kötött enzimek Michaelis-állandóit összehasonlítottuk. A tejsav dehidrogenáz NADH-ra meghatározott K_M app értéke két nagyságrenddel nőtt az oldott enzimhez képest, a többi esetben nem találtunk lényeges különbséget.

A különböző inaktiválódási kinetikák alapján az enzimek rögzített formái nagyobb stabilitásúak. A rögzített és az oldott piruvát kináz hőinaktiválódása egyaránt elsőrendű kinetika alapján történt. A rögzített tejsav dehidrogenáz összetett hőinaktiválódási kinetikát követett.

Piruvát kináz aktivitás vesztese urea jelenlétében egy kezdeti

gyors és egy azt követő lassú inaktiválódási szakaszra bontható. A rögzített enzim kezdeti aktivitás vesztese valószínűleg a gél stabilizáló hatása miatt lassúbb.

Tanulmányoztuk rögzített enzimeink reaktortöltetként való alkalmazhatóságának optimális körülményeit. Meghatároztuk azokat a feltételeket, melyek mellett a foszfoenol-piruvát, a piruvát és a tejsav mennyiségi mérése 100%-os konverzióval "Batch"- és átfolyó rendszerű reaktorokkal megvalósítható.

Kísérleteket végeztünk biológiai mintákból piruvát és tejsav meghatározására.

7. IRODALOM

1. Boyer, P.D.: Pyruvate kinase is the Enzymes /Ed.:Boyer, P.D., Lardy, H., Myrback,K./ Academic Press, New York, 6, 95-113, /1962/
2. Bücher,T. and Pfleiderer, G.: Pyruvate kinase from muscle, in Methods in Enzymology /Ed. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O./ 1, 435-440, 1955, New York, Academic Press
3. Krimsky, I.: Phosphorylation of pyruvate by the pyruvate kinase reaction and reversal of glycolysis in a reconstructed system. J. Biol. chem. 234, 232-236 /1959/ Medicis, E.D., Laliberté,J.F. and Vass-Marendó, J.
4. Purification and properties of pyruvate kinase from halobacterium cutirubrum. Biochem, Biophys. Acta 708, 57-67 /1982/
5. Kayne, F.J.: Pyruvate kinase, in "The Enzymes", 3rd edn. /Boyer, P.D./ Academic Press, New York, 8, 353-382 /1973/
6. Johnson, G.S. and Deal W.C.: Inactivation of tetrameric rabbit muscle pyruvate kinase by specific binding of 2 to 4 moles of pyridoxal 5-phosphate. J.Biol. Chem. 245, 238-242 /1970/ Price,N.C.,Stevens,E.
7. The refolding of denatured rabbit muscle pyruvate kinase Biochem J. 209, 763-770 /1983/
8. Holbrook, J.J., Liljas, A., Steindel, S. JJ. and Rossmann, M.G.: Lactate dehydrogenase, in "The Enzymes", 3rd edn /Boyer,P.D./ 11, 191-292, /1973/ Academic Press, New York
9. Busch, A. and Nair, P.V.: Inhibition of lactic acid dehydrogenase by fluoropyruvic acid. J. Biol. Chem. 229, 377-387 /1957/

10. Winer, A. D. and Schwet, G. W.: Lactic dehydrogenase. The influence of pH on the kinetics of the reaction. J. Biol. Chem. 231, 1065-1083 /1958/
11. Chibata, I.: Immobilized enzymes, research and development. Halsted Press, New York /1978/
12. Zaborsky, O. R.: Immobilizes enzymes /Ed. Weast, R. C., 2nd edn./ CRC Press, Cleveland /1974/
13. Wiseman, A.: Handbook of enzyme biotechnology. Halsted Press New York /1975/
14. Garr, P. W. and Bowers, L.D.: Immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry /Ed. Elving, P. J., Winefordner, J.D./ Wiley-Interscience publication, New York /1980/
15. Powell, L.W.: Developments in immobilized-enzyme technology, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 2, 409-438 /1984/
16. Manacke, G. and Gillert, K.E.: Serologisch spezifische Adsorbentien. Naturwissenschaften, 42, 212-213 /1955/
17. Manacke, G., Singer, S. and Gillert, K.E.: Serologisch spezifische Adsorbentien. Naturwissenschaften, 45, 440-441 /1958/
18. Mosbach, K.: Matrix bound enzymes I. Use of different acrylic copolymers as matrices. Acta Chem. Scand. 24, 2084-2100 /1970/
19. Weetall, H.H.: Trypsin and papain covalently coupled to porous glass: preparation and characterization. Science, 166, 615-617 /1969/
20. Weetall, H.H.: Storage stability of water-insoluble enzymes covalently coupled to organic and inorganic carrier. Biochim. Biophys. Acta, 212, 1-7 /1970/

21. Hofstee, B.H.J. and Ottilio, N.F.: Immobilization of enzymes through non-covalent binding to substituted agaroses. Biochem, Biophys. Res. Commun. 53, 1137-1144 /1973/
22. Bernfeld, P., Bieber, R.E. and McDonell, P.C.: Waterinsoluble enzymes: arrangement of aldolase within and insoluble carrier. Arch. Biochem. Biophys. 127, 779-786 /1968/
23. Mosbach, K. and Mosbach, R.: Entrapment of enzymes and microorganisms in synthetic cross-linked polymers and their application in column techniques. Acta Chem. Scand. 20, 2807-2810 //1966/
24. Chang, T.M.S.: Semipermeable microcapsules. Science, 146, 524-525 /1964/
25. Gregoriadis, G., Leathwood, F.D. and Ryman, B.E.: Enzyme entrapment in liposomes. FEBS Lett. 14, 95-99 /1971/
26. Nelson, J.M. and Griffin, G.E.: The influence of certain substances on the activity of invertase. J.Am.Chem.Soc. 38, 722-830 /1916/
27. Langmuir, I., Schaefer, V.J.: Activities of urease and pepsin monolayers. J.A. Chem.Soc. 60, 1351-1360 /1938/
28. Mitz, M.A.: New insoluble active derivative of an enzyme as a model for study of cellular metabolism. Science 123, 1076-1077 /1956/
29. Landsteiner, K. and Van der Scheer, J.: On cross reactions of immune sera to azoproteins. J. Exp. Med. 63, 325-339 /1936/

30. Mansson, M.O., Siegbahn, N. and Mosbach, K.: Site-to-site directed immobilization of enzymes with bis-NAD analogues Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1487-1491 /1983/
31. Wheeler, K.P., Edwards, B.A. and Whittam, R.: Some properties of two phosphatases attached to insoluble cellulose matrices. Biochem. Biophys. Acta 191, 187-192 /1969/
32. Axén, R., Porath, J. and Ernback, S.: Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. Nature 214, 1302-1304 /1967/
33. Porath, J., Axén, R. and Ernback, S.: Chemical coupling of proteins to agarose. Nature 215, 1491-1492 /1967/
34. Axén, R. and Vretblad, P.: Binding of proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. Studies on cyanogen bromide treated Sephadex. Acta Chem. Scand. 25, 2711-2716 /1971/
35. Axén, R. and Ernback, S.: Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide activated polysaccharide carriers. Eur. J. Biochem. 18, 351-360 /1971/
36. Wilchek, M., Oka, T. and Topper, Y.J.: Structure of a soluble super-active insulin is revealed by the nature of the complex between cyanogen-bromide-activated Sepharose and amines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1055-1058 /1975/
37. Kohn, J. and Wilchek, M.: Procedure for the analysis of cyanogen bromide-activated Sepharose or Sephadex by quantitative determination of cyanate esters and imidocarbonates. Anal. Biochem. 115, 375-382 /1981/

38. Kohn, J. and Wilchek, M.: Mechanism of activation of Sepharose and Sephadex by cyanogen bromide. *Enzyme Microb. Technol* 4, 161-163 /1982/
39. Epton, R., Hibbert, B.L. and Thomas, T.H.: Enzymes covalently bound to polyacrylic and polymethacrylic copolymers in *Methods in Enzymology* /Jakoby, W.B. and Wilchek, M. eds./ Academic Press, New York 44, 84-107 /1976/
40. Brown, E. and Racois, A.: Emploi des Vanacryls dans la preparation de nouveaux derives de l'urease insolubles dans l'eau. *Tetrahedron Lett.* 50, 5077-5080 /1972/
41. Brown, E. and Racois, A.: Enzymes Immobilisees. Les vanacryls et leur emploi dans la preparation de nouveaux derives insolubles de la trypsine. *Tetrahedron* 30, 675-682 /1974/
42. Brown, E. and Racois, A.: Emploi des vanacryls dans la preparation de nouveaux derives insolubles de l'urease *Tetrahedron* 30, 683-688 /1974/
43. Flemming, C., Gabert, A. and Roth, P.: Synthese und Eigenschaften tragerfixierter enzyme. I-II. *Acta. Biol. Ned. Ger.* 31, 365-373, 449-451 /1973/
44. Weakley, F.B., and Mehlretter, C.L.: Binding of papain to dialdehyde starch. *Biotechnol. Bioeng.* 15, 1189-1192 /1973/
45. Van Leemputten, E. and Horisberger, M.: Immobilization of trypsin on partially oxidized cellulose; Immobilization of enzymes on magnetic particles. *Biotechnol. Bioeng.* 12, 997-1003, 385-396 /1974/

46. Goldstein, L. and Manecke, G.: The chemistry of enzyme immobilization in Applied Biochemistry and Bioengineering /Wingard, L.B., Katchalski-Katzir, E. and Goldstein, L. eds./ Academic Press, New York 1, 23-111 /1976/
47. Royer, G.P., Liberatore, F.A. and Green, G.M.: Immobilization. Biochem. Biophys. Res. Commun 64, 478-484 /1975/
48. Weston, P.D. and Avrameas, S.: Proteins coupled to polyacrylamide beads using glutaraldehyde. Biochem. Biophys. Res. Commun 45, 1574-1580 /1971/
49. Inman, J.K.: Covalent linkage of functional groups, ligands and proteins to polyacrylamide beads in Methods in Enzymology /Jakoby, W.B. and Wilchek, V. eds. /Academic Press, New York 34, 30-58 /1974/
50. Brandt, J., Andrsson, L.O. and Porath, J.: Covalent attachment of proteins to polysaccharide carriers by means of benzoquinone. Biochem. Biophys. Acta 386, 196-202 /1975/
51. Stambolieva, N. and Turková, J.: Covalent attachment of proteins to spheron by means of benzoquinone. Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 45, 1137-1143 /1980/
52. Kálmán, M., Szajáni, B. and Boross, L.: A novel polyacrylamide-type support prepared by p-benzoquinone activation. Appl. Biochem. Biotechnol. 8, 515-522 /1983/
53. Krishna, N., Lemuel, B. and Wingrad, J.: Enzyme Microb. Technol. 7, 283-286 /1985/ p-Benzoquinone activation of metal oxide electrodes for attachment of enzymes.

54. Mattiasson, B. and Mosbach, K.: Studies on a matrix-bound three-enzyme system. *Biochim. Biophys. Acta* 235, 253-257 /1971/
55. Brown, G.: *Methods in Enzymology* /Mosbach, K. ed./ Academic Press, New York, 44, 263-280 /1976/
56. Broun, G., Thomas, D., Gellf, G., Domurado, D., Berjonneau, A. and Guillon, C.: New methods for binding enzyme molecules into a water-insoluble matrix. Properties after insolubilization. *Biotechnol. Bioeng.* 15, 359-375 /1973/
57. Hicks, G.P. and Updike, S.J.: The preparation and characterization of lyophilized polyacrylamide enzyme gels for chemical analysis. *Anal. Chem.* 38, 726-730 /1966/
58. Bauman, E.K., Goodson, L.H., Guilabault, G.G. and Kramer, D.N.: Preparation of immobilized cholinesterase for use in analytical chemistry. *Anal. Chem.* 37, 1378-1381 /1965/
59. Bauman, E.K., Goodson, L.H. and Thompson, J.R.: Stabilization of serum cholinesterase in dried starch gel. *Anal. Biochem.* 19, 587-591 /1967/
60. Wheatley, M.A., Phillips, C.R.: Temperature effects during polymerisation of polyacrylamide gels used for bacterial cell immobilization. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 623-626 /1983/
61. Chang, T., Yu, Y. and Grunwald, J.: In *Enzyme Engineering* /Chibata, I., Fukui, S. and Wingard, L. eds./ Plenum Press, New York, 6, 451-455 /1982/

62. Yu, Y T. and Chang, T.M.S.: Immobilization of multienzymes and cofactors within lipid-polyamide membrane microcapsules for the multistep conversion of lipophilic and lipophobic substrates. *Enzyme Microb. Technol*, 4, 327-331 /1982/
63. Chang, T.M.S. and Poznansky, M.J.: Semipermeable microcapsules containing catalase for enzyme replacement in acatalasaemic mice. *Nature* 218, 243-245 /1968/
64. Chang, T.M.S.: Microencapsulation of enzymes and biologicals, In *Methods in Enzymology* /Mosbach, K. ed./ Academic Press, New York 44, 201-218 /1976/
65. Chang, T.M.S.: Methods for the therapeutic application of immobilized enzymes. In *Methods in Enzymology* /Mosbach, K. ed./ Academic Press, New York, 44, 676-697 /1976/
66. Chang, T.M.S.: Gonda, E., Dirks, J.H., Coffey, J.F. and Lee-Burns, T.: Acac microcapsule artificial kidney for the long term and short term management of eleven patients with chronic renal failure. *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs* 18, 465-472 /1972/
67. Rony, P.K., Multiphase catalysis. II. Hollow fiber catalysts, *Biotechnol. Bioeng.* 13, 431-436 /1971/
68. Wilson, R.J.H., Kay, G. and Lilly, M.D.: the preparation and properties of pyruvate kinase attached to porous sheets, and the operation of a two-enzyme continuous-feed reactor. *Biochem. J.* 109, 137-141 /1968/

69. Kay, G., Lilly, M.D., Sharp, A.K. and Wilson, R.J.H.: Preparation and use of porous sheets with enzyme action *Nature*, 217, 641-642 /1968/
70. Newirth, T.L., Diegelman, M.A., Pye, E.K. and Kallen, R.G.: Multiple immobilized enzyme reactors. Determination of pyruvate concentrations using immobilized lactate dehydrogenase and pyruvate kinase. *Biotechnol, Bioeng.* 15, 1089-1100 /1973/
71. Campbell, J. and Chang, T.M.S.: Enzymatic recycling of coenzymes by a multi-enzyme system immobilized within semipermeable collodion microcapsules. *Biochim. Biophys. Acta* 397, 101-109 /1975/
72. Biondi, P.A., Pace, M., Vrenna, O. and Pietta, P.G.: Coupling of enzymes to polyacrylonitrile. *Eur. J. Biochem.* 62, 171-174 /1976/
73. Dixon, J.E., Stolzenbach, F.E., Berenson, J.A. and Kaplan, N.O.: Immobilized enzymes: the catalytic properties of lactate dehydrogenase covalently attached to glass beads. *Biochem, Biophys. Res. Commun.* 52, 905-912 /1973/
74. Srere, P.A., Mattiasson, B. and Mosbach, K.: An immobilized three-enzyme system: A model for microenvironmental compartmentation in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 2534-2538 /1973/
75. Wilson, R.J.H., Kay, G. and Lilly, M.D.: The preparation and kinetics of lactate dehydrogenase attached to water-insoluble particles and sheets. *Biochem. J.* 108, 845-853 /1968/

76. Wykes, J.R., Dunnill, P. and Lilly, M.D.: Cofactor recycling in an enzyme reactor. A comparison using free and immobilized dehydrogenases with free and immobilized NAD. *Biotechnol. Bioeng.* 17, 51-68 /1975/
77. Kovalenko, G.A., Shitova, N.B. and Sokolovskii, V.D.: Immobilization of oxidoreductases on inorganic supports based on alumina. Immobilization of lactate dehydrogenase on alumina by adsorption. *Biotechnol. Bioeng.* 23, 1721-1734 /1981/
78. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 /1951/
79. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 /1976/
80. Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. and Grassl, M.: in Bergmeyer, H.U.: *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim, 1, 471-485 /1970/
81. Racker, E.: Enzymatic synthesis and breakdown of deoxyribose phosphate. *J. Biol. Chem.* 196, 347-365 /1952/
82. Rayn, E. and Fottrell, P.F.: Interaction between an unusual aspartate aminotransferase from *Rhizobium japonicum* and pyridoxal-5'-phosphate studied by affinity chromatography. *FEBS Lett.* 23, 73-76 /1972/
83. Rayn, L.D.: Vestling, C.S.: Rapid purification of lactate dehydrogenase from rat liver and hepatoma: A new approach *Arch. Biochem. Biophys.* 160, 279-284 /1974/

84. Axén, R., Heilbronn, E., Winter, A.: Preparation and properties of cholinesterases covalently bound to Sepharose. *Biochim. Biophys. Acta* 191, 478-481 /1969/
85. Mosbach, K. and Mattiasson, B.: Matrix-bound enzymes. Studies on a matrix-bound two-enzyme-system. *Acta Chem. Scand.* 24, 2093-2100 /1970/
86. Szaĵáni, B., Ivony, K. and Boross L.: Comparative studies on soluble and immobilized pig kidney aminoacylase. *J. Appl. Biochem.* 2, 72-80 /1980/
87. Simon, L.M., Kotorján, M., Szaĵáni, B. and Boross, L.: Comparative studies on soluble and immobilized rabbit muscle pyruvate kinase. *Appl Biochem. Biotechnol.* 11, 195-205 /1985/
88. Kotorján, M., Simon, L.M., Szaĵáni, B. and Boross, L.: Immobilization of lactate dehydrogenase on polyacrylamide beads. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 8, 53-59 /1986/
89. Horpácsy G., Barankay T., Tárnoky K. és Nagy S. A plasma lysosomális és cytoplasmátikus enzyimeinek, tejsav és pyruvát színténének összehasonlító vizsgálata haemorrhagiás shockban kutyákon. *Kísérletes Orvostudomány* 22, 573-579 /1970/
90. Pollack, A., Blumenfeld, H., Wax, M., Baughn, R.L. and Whitesides, G.M.: Enzyme immobilization by condensation copolymerization into cross-linked polyacrylamide gels. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 6324-6335 /1980/
91. Slegers, G., De Laet, S., Lambrecht, R.H. and Block, C.: Co-immobilized pyruvate kinase and lactate dehydrogenase as recycling system for ATP. *Enzyme Microb. Technol.* 8, 153-156 /1986/

92. Goldstein, L., Levin, Y. and Katchalski, E.: A waterinsoluble polyanionic derivative of trypsin. II. Effect of the polyelectrolyte carrier on the kinetic behaviour of the bound trypsin. *Biochemistry* 3, 1913-1919 /1964/
93. Goldstein, L. and Manecke, B.: The chemistry of enzyme immobilization in *Applied Biochemistry and Bionengineering*, /Wingard, L.B., Katchalski-Katzir, E. and Goldstein, L. eds./ Academic Press, New York, 1, 23-126 /1976/
94. Mosbach, K.: Immobilized enzymes in *Methods in Enzymology* Academic Press, New York 44, /1976/
95. Johanson, A.C. and Mosbach, K.: Acrylic copolymers as matrices for the immobilization of enzymes. II. The effect of a hydrophobic microenvironment on enzyme reactions studied with alcohol dehydrogenase immobilized to different acrylic copolymers. *Biochim. Biophys. Acta* 370, 348-353 /1974/
96. Bohnensack, R., Augustin, W. and Hofmann, E.: Chemische Kopplung von Hexokinase aus Hefe an Sephadex. *Experientia* 25, 348-349 /1969/
97. Steinmetz, M.A. and Deal, W.C.: Metabolic control and structure of glycolytic enzymes. III. Dissociation and subunit structure of rabbit muscle pyruvate kinase. *Biochemistry* 5, 1399-1400 /1966/
98. Doster, W. and Hess, B.: Reversible solvent denaturation of rabbit muscle pyruvate kinase. *Biochemistry*, 20, 772-780 /1981/

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr Lehoczki Endréné egyetemi docensnek, hogy munkámat irányította, segített az elméleti és gyakorlati kérdések megoldásában.

Köszönöm Dr Szajáni Béla c. egyetemi docensnek, hogy sok hasznos tanáccsal ellátott.

Köszönöm Dr Nemcsók János tanszékvezetőnek, hogy munkám feltételeit biztosította.

Köszönöm Dr Boross László egyetemi tanárnak, hogy érdeklődésemet a biokémia felé irányította.

Köszönöm mindazok segítségét, akik valamilyen formában hozzájárultak a dolgozat létrejöttéhez.