

***AZ α -KIMOTRIPSZIN STABILITÁSA ÉS
MŰKÖDÉSE SZERVES OLDÓSZERES
KÖZEGBEN***

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

Készítette: LÁSZLÓ KINGA

Témavezető: LEHOCZKINÉ DR. SIMON MÁRIA

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

BIOKÉMIAI TANSZÉK

SZEGED 2002

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. AZ α -KIMOTRIPSZIN JELLEMZÉSE	4
2.1.1. Az aktív centrum szerkezete	6
2.1.2. A katalízis mechanizmusa	7
2.2. BIOKATALÍZIS SZERVES OLDÓSZERES KÖZEGBEN	9
2.2.1. A szerves oldószer hatása a szubsztrátra és a reakcióra	12
2.2.2. A szerves oldószer hatása a fehérjeszerkezetre	13
2.2.3. Szintetikus reakciók szerves oldószeres közegben	15
2.2.3.1. Észterszintézisek	15
2.2.3.2. Átészteresítések	18
2.2.3.3. Peptidszintézisek	20
2.3. ENZIMEK OLDÉKONYSÁGÁNAK ÉS STABILITÁSÁNAK FOKOZÁSA	22
2.3.1. Stabilizálás "protein engineering" technológiával	23
2.3.2. Stabilizálás kémiai módosítással	24
2.3.2.1. Kovalens rögzítési eljárások	28
2.3.2.2. Rögzített kimotripszin előállítása és alkalmazása vizes közegben	30
2.3.2.3. Rögzített kimotripszin alkalmazása szerves oldószeres közegben	31
2.3.3. Stabilizálás additívek hozzáadásával	33
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	36
3.1. ANYAGOK	36
3.2. MÓDSZEREK	36
3.2.1. Az α -kimotripszin rögzítése	36
3.2.1.1. Kimotripszin rögzítése Akrilex C-100-hoz	36
3.2.1.2. Kimotripszin rögzítése Akrilex P-100-hoz	37
3.2.1.3. Kimotripszin rögzítése p-benzokinonnal aktivált Szilokrómhoz	37
3.2.2. Az oldatok fehérjetartalmának meghatározása	37
3.2.3. Az α -kimotripszin aktivitásának mérése	38

3.2.4. Stabilitásmérések	38
3.2.5. Észter szintézisek és értékelésük	38
3.2.6. A víztartalom meghatározása	39
4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK	40
4.1. AZ OLDOTT KIMOTRIPSZIN STABILITÁSA SZERVES OLDÓSZERES KÖZEGBEN ..	40
4.1.1. Vízrel elegyedő szerves oldószerek hatása az enzim aktivitására ...	40
4.1.2. Vízrel nem elegyedő szerves oldószerek hatása a kimotripszin aktivitására	44
4.2. α -KIMOTRIPSZIN STABILIZÁLÁSA SZERVES OLDÓSZEREKBE	46
4.2.1. Rögzítés hatása a kimotripszin stabilitására	46
4.2.1.1. A rögzítés enzimkoncentráció függése	47
4.2.1.2. Rögzített kimotripszin stabilitása szerves oldószeres rendszerekben	49
4.2.2. Additívek hatása a kimotripszin stabilitására	52
4.2.2.1. Additívek hatásának időfüggése	52
4.2.2.2. Additívek hatása a rögzített kimotripszin stabilitására különböző szerves oldószerekben	53
4.3. KIMOTRIPSZINNEL MEGVALÓSÍTOTT SZINTETIKUS REAKCIÓK SZERVES OLDÓSZERES KÖZEGBEN	56
4.3.1. Észteresítési és átészteresítési reakciók vizsgálata	56
4.3.1.1. Észteresítés és átészteresítés normál láncú és elágazó alkoholokkal	56
4.3.1.2. Észteresítés és átészteresítés különböző oldószerekben	58
4.3.1.3. Az észterszintézis és az átészteresítés enzim koncentráció függése	59
4.3.1.4. A hőmérséklet és a pH hatása az észterszintézisre és az átészteresítésre	60
4.3.1.5. A direkt észteresítés és az átészteresítés szubsztrát koncentráció függése	61
4.3.1.6. A reakcióelegy víztartalmának hatása az észterszintézisre és az átészteresítésre	63
4.3.1.7. Az N-acetil-L-tirozin metil észter szintézisek időfüggése optimális körülmények között	64

4.3.2. Észteresítési és átészteresítési reakciók rögzített enzimekkel	65
5. DISZKUSSZIÓ	67
5.1. STABILITÁSVIZSGÁLATOK OLDOTT ENZIMMEL	67
5.2. ENZIMSTABILIZÁLÁSI VIZSGÁLATOK ÉRTÉKELÉSE	70
5.2.1. Enzimrögzítési kísérletek értékelése	70
5.2.2. Rögzítés stabilizáló hatásának értékelése	71
5.2.3. Additívek stabilizáló hatásának értékelése	72
5.3. ÉSZTERESÍTÉSI ÉS ÁTÉSZTERESÍTÉSI REAKCIÓK ÉRTÉKELÉSE	73
5.3.1. Szintetikus reakciók alkohol szubsztrát függése	74
5.3.2. Észteresítési és átészteresítési reakciók függése az oldószertől	74
5.3.3. Észteresítési és átészteresítési reakciók egyéb körülményeinek optimalizálása	76
5.3.4. Észteresítés és átészteresítés rögzített enzimekkel	78
6. ÖSSZEFOGLALÁS	79
7. SUMMARY	83
8. IRODALOMJEGYZÉK	86
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	95
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	96

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Az enzimek nagy specifitással (kemo-, enantio- és regiospecifitás) katalizálnak kémiai átalakulásokat általában enyhe körülmények között (pH, hőmérséklet, nyomás). Ma már több mint 3000 enzim ismert, azonban a biokatalízisben rejlő lehetőségek még messze nincsenek kiaknázva. Napjainkban széles körben használják az enzimeket a klinikai- és élelmiszeripari analitikában, katalizátorként gyógyszerek, élelmiszerek előállítására, és fontos szerepet játszanak a modern biotechnológiában is.

Az elmúlt évtizedekben az enzimológiai kutatásokban két irányzat alakult ki: a szilárdfázisú, és a nem hagyományos közegű biokatalízis. A szilárd fázisú biokatalízis az enzimek szilárd hordozóhoz való rögzítését jelenti, s a rögzített enzimek előállítását az újrafelhasználhatóság gondolata vetette fel. A reakció termékét nem szennyezi a keletkezését katalizáló enzim, hiszen a rögzített enzimek elválasztása egyszerűen megvalósítható, a termékek elkülönítése után az enzimek újra hasznosíthatók. Emellett lehetőség van arra is, hogy folyamatos üzemmódban működtessük őket. A rögzített enzimek többszöri felhasználhatósága, és sok esetben jobb stabilitása a legfőbb előnyük az oldott enzimekkel szemben.

A hagyományos, vizes rendszerekben működő biokatalitikus folyamatok mellett egyre nagyobb teret hódít és jelentősége van az enzimek nem hagyományos közegben való alkalmazásának. Nem hagyományos közeg többféle lehet: szerves oldószeres közeg, szuperkritikus folyadék, gáz halmazállapotú reakció közeg stb. Ezek közül talán a legdinamikusabban a szerves oldószeres rendszerek kutatása fejlődött és fejlődik mai napig is. A kevés vizet tartalmazó, szerves oldószeres közegben megvalósított enzimkatalízisnek számos előnye van a vizes rendszerekkel szemben: az apoláros szubsztrátok oldékonysága nő, a szerves oldószerből számos termék olcsón és könnyen kinyerhető, megváltozhat a reakció kinetikája, eltolódhat a termodinamikai egyensúly, nincs mikrobiális fertőződés és nincsenek mellékreakciók. A reakciók termodinamikai egyensúlyának eltolódása azt eredményezi, hogy a vizes közegben hidrolázként működő enzimek szerves oldószeres közegben szintetázként tudnak viselkedni. Vagyis szerves oldószerben olyan vegyületek szintézisét fogják katalizálni (peptidek, észterek), melyek hidrolízisét katalizálják vizes közegben.

A szerves oldószeres jelenléte azonban felvet néhány problémát is, melyek megoldása elengedhetetlen a sikeres biotranszformációk megvalósításához. Egyik ilyen fontos kérdés az oldószer helyes megválasztása, különös hangsúlyt fektetve a szerves

oldószer polaritására, amely megszabja az enzimek oldékonyságát, s ezen keresztül a katalitikus funkció ellátását. Az oldószer és az enzim kölcsönhatása viszont egy másik, a katalízis szempontjából fontos kérdést vet fel, mégpedig, hogy milyen az enzim stabilitása az illető szerves oldószerben. A szerves oldószeres rendszerekben folyó biokatalitikus folyamatok megfelelő hatékonyságának elérése céljából fontos az enzimek stabilitásának növelése. Az enzimek stabilitása szerves oldószeres közegben is növelhető a vizes rendszerekből ismert módszerekkel, mint pl. kémiai módosítással, rögzítéssel, "protein engineering"-gel, vagy adalékanyagok hozzáadásával. Lényeges feladat azonban a megfelelő módszer alkalmazása, s azon belül a legjobb módosító ágens, szilárd hordozó, adalékanyag megválasztása, vagy a hatásos aminosav cserék megvalósítása.

Mindezek ismeretében, munkánk célja az volt, hogy a szerkezeti felépítésében és főként vizes rendszerben mutatott működésében jól ismert szarvasmarha pankréász α -kimotripszin stabilitását és működését tanulmányozzuk különböző szerves oldószerekben. Vizsgálataink során a következő kérdésekre kerestünk választ:

Milyen az oldott enzim stabilitása néhány, kémiai tulajdonságaikban eltérő, kevés vizet tartalmazó, vízzel elegyedő és nem elegyedő szerves oldószerben;

Van-e összefüggés az oldószer polaritása és az enzim stabilitása között;

Hogyan befolyásolja a rögzítés (hordozó, rögzítési eljárások) az enzim stabilitását szerves oldószerekben;

Kivédhető-e a szerves oldószer okozta inaktiválódás additívek (poliolok, mono- és diszacharidok) adagolásával;

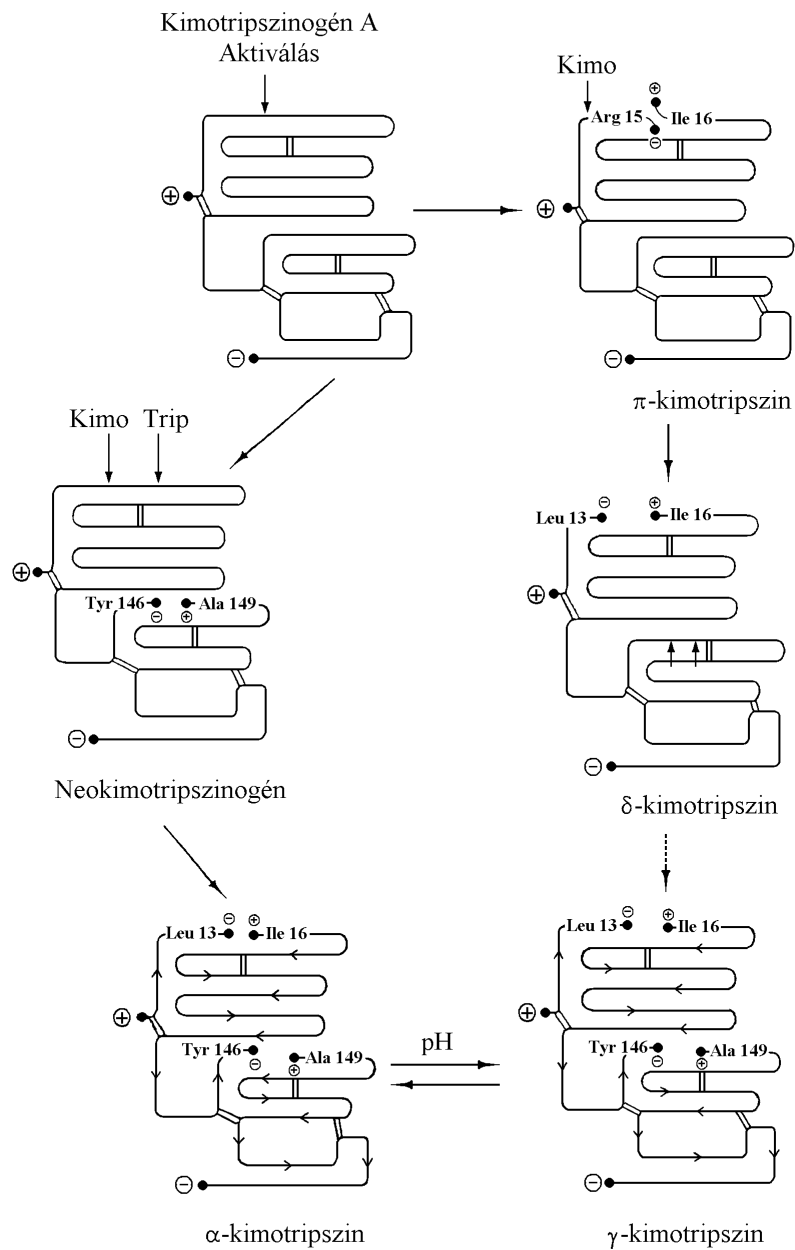
Aminosav észteresítési és átészteresítési reakciókon keresztül tanulmányoztuk az α -kimotripszin működését szerves közegben, továbbá célul tűztük ki a reakciók összehasonlító vizsgálatát;

Befolyásolja-e az enzim szintetáz aktivitását a rögzítéshez használt hordozó szerves oldószerben.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A kimotripszin a *szerin proteázok* csoportjába tartozik - sok más jól ismert enzimmel együtt, mint pl. a tripszin, trombin, szubtilizin, elasztáz, alvadási faktor VII, IX, X, XI, XII -, biológiai szerepe amidkötések ill. peptidkötések hasítása, de képes karboxil- vagy fenilészter kötéseket, sőt szén-szén kötéseket hasítására is (Rawlings és Barrett, 1993). Mindazonáltal az enzim fő feladata a szervezetben, hogy hidrolázként működve a fehérjék bélben történő emésztése során peptidkötések hidrolízisét katalizálja (Desnuelle, 1960). Nagy szelektivitással hasítja a peptideket az aromás oldalláncú aminosavak (Tyr, Trp, Phe) karboxil oldalán, valamint az olyan nagy hidrofób aminosavak mellett, mint pl. a metionin. Inaktív formáját a pankreász acinus sejtjei hozzák létre és ebben a formában szállítódik el a hasnyálmirigy váladékkal a duodenumba, ahol végül aktiválódik.

A kimotripszin különböző formái több lépéses folyamatok révén jönnek létre ill. alakulhatnak át egymásba. A kiindulási fehérje prekursor a kimotripszinogén-A, mely kétféle módon aktiválódhat. Az ún. "gyors" aktiválódás során a tripszin elhasítja a molekula egyik arginil-izoleucin kötését, s ezzel kialakul a π -kimotripszin (1. ábra). Ezt követően a π -kimotripszin autolizál az előzőekben kialakult C-terminálisán egy második kötést, és ezzel létrejön a δ -kimotripszin és felszabadul egy szeril-arginin dipeptid (Bettelheim és Neurath, 1955, Sigler és mtsai, 1968). Az így létrejött δ -kimotripszin viszonylag stabil végterméke a "gyors" aktiválásnak. A "lassú" aktiválás során két további folyamat megy végbe egymás mellett (Wright és mtsai, 1968). Ha nincs jelen tripszin, akkor a kimotripszin elhasítja a kimotripszinogén-A molekula egy másik régiójában két peptidkötést és ezzel a kimotripszinogén-A átalakul egy új, és még további aktiválásra váró formává, amit neokimotripszinogénnek nevezünk. Amennyiben tripszin jelen van kis mennyiségben, kétféleképpen alakulhat tovább a prekursor: 1) a kimotripszinogén-A aktiválódik egy tripszin katalizálta folyamatban, amit a δ -kimotripszin spontán autolízise követ és kialakul a γ -kimotripszin, amelyből alacsony pH-n egy egyensúlyi folyamatban keletkezik az α -kimotripszin (Corey és mtsai, 1965). 2) A kimotripszinogén-A neokimotripszinogénné alakul egy kimotripszin által katalizált reakcióban, melyet a tripszin alakít tovább szintén α -kimotripszinné.

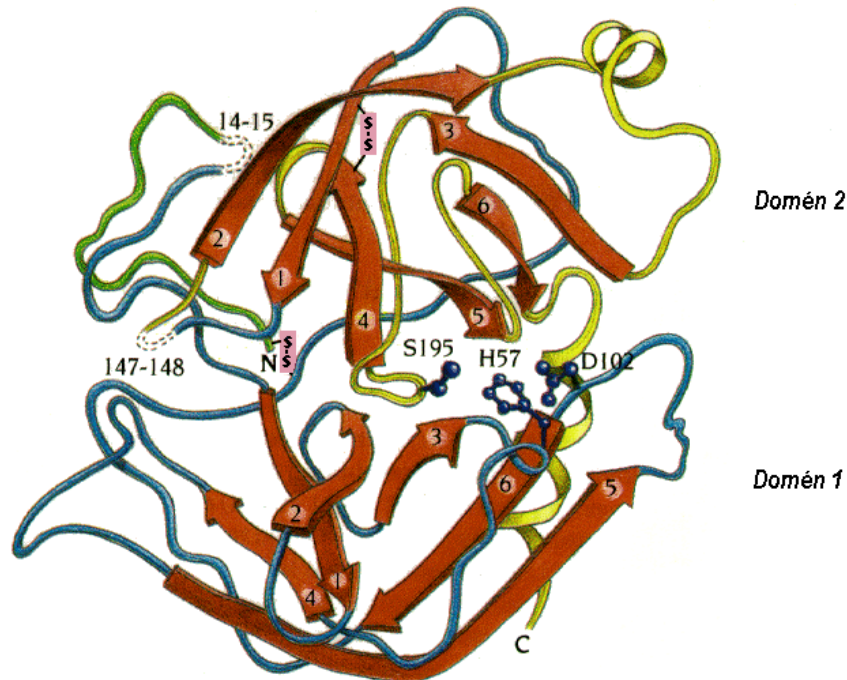


1. ábra. A kimotripszinogén A aktiválása és különböző autokatalitikus reakciók (Sigler és mtsai (1968) nyomán).

2.1. AZ α -KIMOTRIPSZIN JELLEMZÉSE

A α -kimotripszin két doménból áll, melyek mindegyike 120 aminosavat tartalmaz. Mindegyik domén 6 antiparallel β -lemezből álló ún. β -barrel struktúrát alkot (2.ábra). Az antiparallel β -barrel-ben a β -lemezek jellegzetes szupermásodlagos szerkezeti formákat öltenek, az 1-4 lemezek Greek-key motívumot alkotnak, melyeket

az 5-6 lemezek antiparallel "hairpin" motívuma követ. Az antiparallel redőzött-részek között mindegyik doménon belül hidrogén-kötések vannak, valamint további hidrogénhidak találhatóak ugyanazon domén első és hatodik lemeze között úgy, hogy ezáltal a hat lemez hidrogén-kötésekkel összekapcsolódva alakítja ki a β -barrel (henger) szerkezetet (Branden és Tooze, 1991). Az α -kimotripszin 25 kD móltömegű enzim, melynek szerkezetében 3 polipeptidlánc (A, B és C) különíthető el, amelyeket diszulfid hidak (2 láncok közötti, továbbá 3 láncon belüli diszulfid híd) kötnek össze (Blow, 1971).



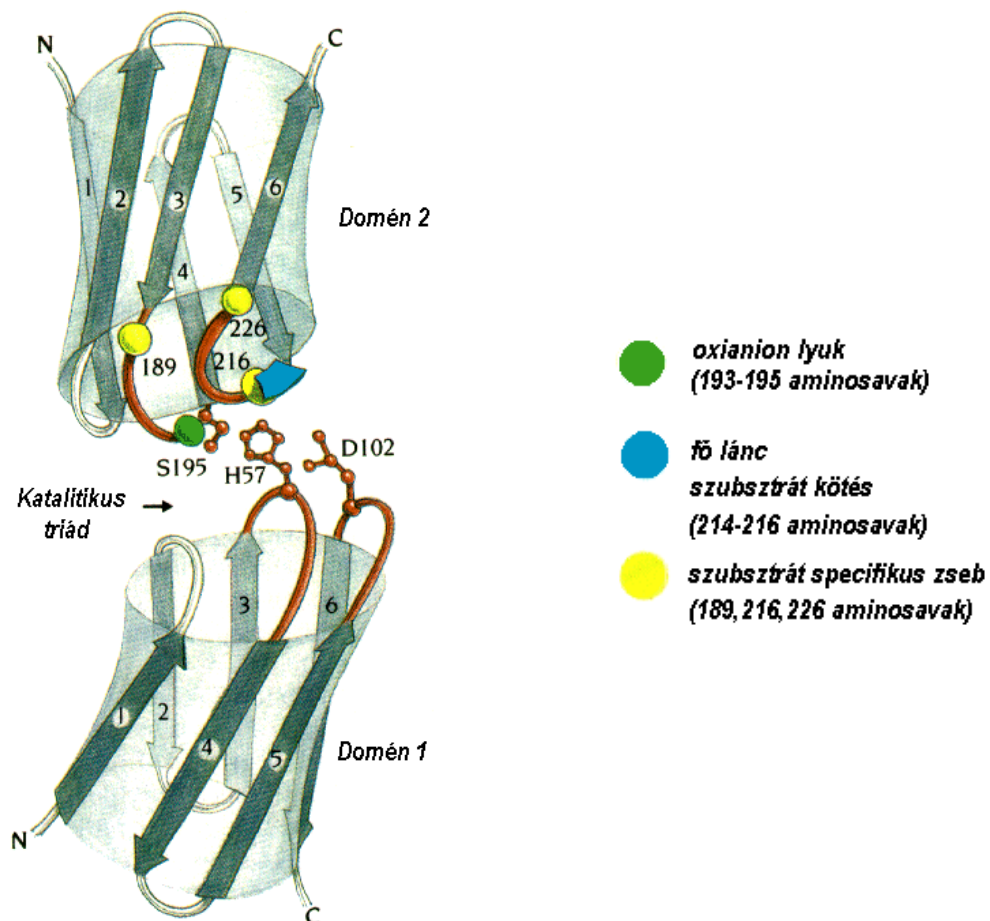
2. ábra. Az α -kimotripszin szerkezetének sematikus rajza. A-lánc (zöld), B-lánc (kék), C-lánc (sárga). A szaggatott vonalak a 14-15 és a 147-148 aminosavakat jelölik, melyek az inaktív kimotripszinogén prekurzorban találhatóak és a kimotripszinogén \rightarrow kimotripszin átalakulás során kihaladnak. S195: Ser 195, H57: His 57, D102: Asp 102 (Branden és Tooze (1991) nyomán).

Az A-lánc viszonylag rövid, 13 aminosavból áll (1-13) és a Cys 1 aminosaván keresztül diszulfid híd segítségével kapcsolódik a B-lánc Cys 122-höz, mely a leghosszabb, 130 aminosavval (16-146) (2. ábra). A B-lánc Cys 136 és a 97 aminosavból álló (149-245) C-lánc Cys 201 között szintén található egy összekötő diszulfid híd. További diszulfid hidak találhatóak az egyes láncokon belül, így a B-láncon belül a Cys 42 és a Cys 58 között, a C-láncon belül pedig a Cys 168 és Cys 182, valamint a Cys 191 és Cys 220 között. Az α -kimotripszin molekula elliptikus, némileg lapított az aktív centrumnál és a felületén van egy bemélyedés, ami fontos szerepet játszik a specifikus szubsztrát megkötésében. Az összes töltéssel rendelkező

csoport a molekula felületén van, kivéve az Ile 16 α -aminocsoportját, illetve az Asp 102 és Asp 194 karboxilcsoportjait. Habár több hidrofób csoport található a molekula felületén, mint pl. a Phe 39 és Phe 41, az általános tendencia az, hogy a hidrofób csoportok a molekula belsejében találhatók, és a polarizálható csoportok felületi elrendeződést mutatnak.

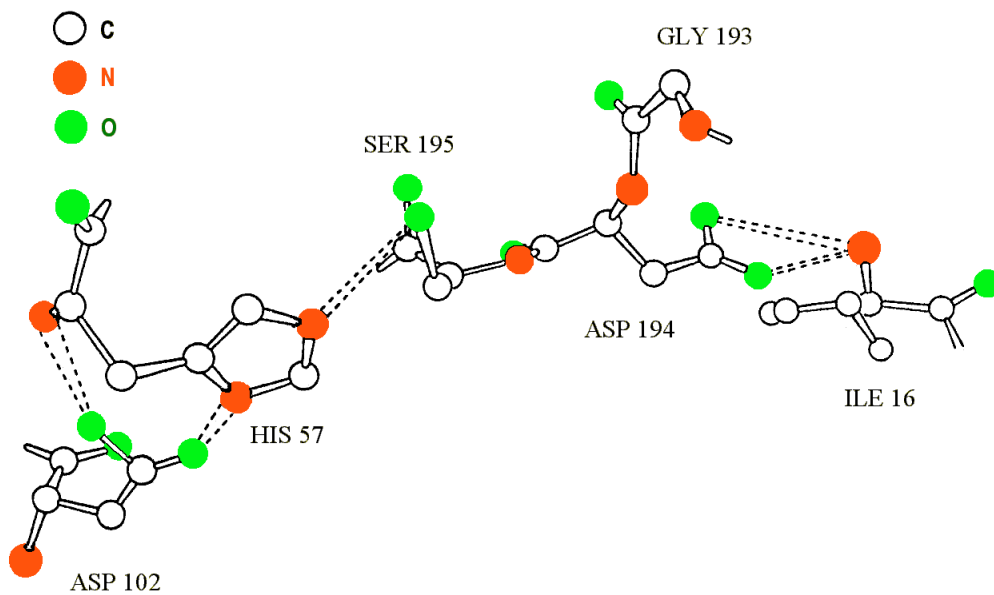
2.1.1. Az aktív centrum szerkezete

Az α -kimotripszin aktív centruma a két domén közötti részben helyezkedik el. A katalitikus triád tagjai: a His 57 és az Asp 102 a Domén-1-n, a Ser 195 pedig a Domén-2-n található. A 3. ábrán látható, hogy a His 57 a Domén-1, a Ser 195 a Domén-2 loop-3-4 régiójában, míg az Asp 102 a Domén-1 loop-5-6 régiójában van és az aktív hely többi részét a Domén-2 loop-3-4 és loop- 5-6 régiói alkotják.



3. ábra. Az α -kimotripszin két doménjének rajza és az aktív centrum elhelyezkedése a fehérjeszerkezetben. Az aktív hely aminosavai a két domén loop 3-4 és 5-6 régiójában helyezkednek el (piros vonalak). Ezek az aminosavak alkotják a katalitikus triádot (piros gömbök), az oxianion lyukat (zöld) és a szubsztrát kötő régiókat (sárga és kék). S195: Ser 195, H57: His 57, D102: Asp 102 (Branden és Tooze (1991) nyomán).

Az aktív centrumban és közelében található néhány aminosav elhelyezkedését mutatja az 4. ábra. Az Ile 16 α -aminocsoportja - amely a kimotripszinogén tripszines hasítás eredményeként jön létre, és esszenciális az enzimaktivitás fenntartásához - egy ionpárt alakít ki az Asp 194 karboxilát csoportjával. Az aktív centrum szerinje, a Ser 195 úgy helyezkedik el, hogy O^γ -ja kb. 3 Å távolságra van a His 57 $N^{\epsilon 2}$ -től. A kettő között hidrogén kötés alakul ki, és a protont mind a hisztidin $-N^{\epsilon 2}H$ csoportja (ha protonált), mind a szerin $-O^\gamma H$ csoportja (ha a His 57 $N^{\epsilon 2}$ -je nem protonált) szolgáltathatja.



4. ábra. Az α -kimotripszin aktív centrumában és környékén található aminosavak elhelyezkedése (Blow (1971) nyomán).

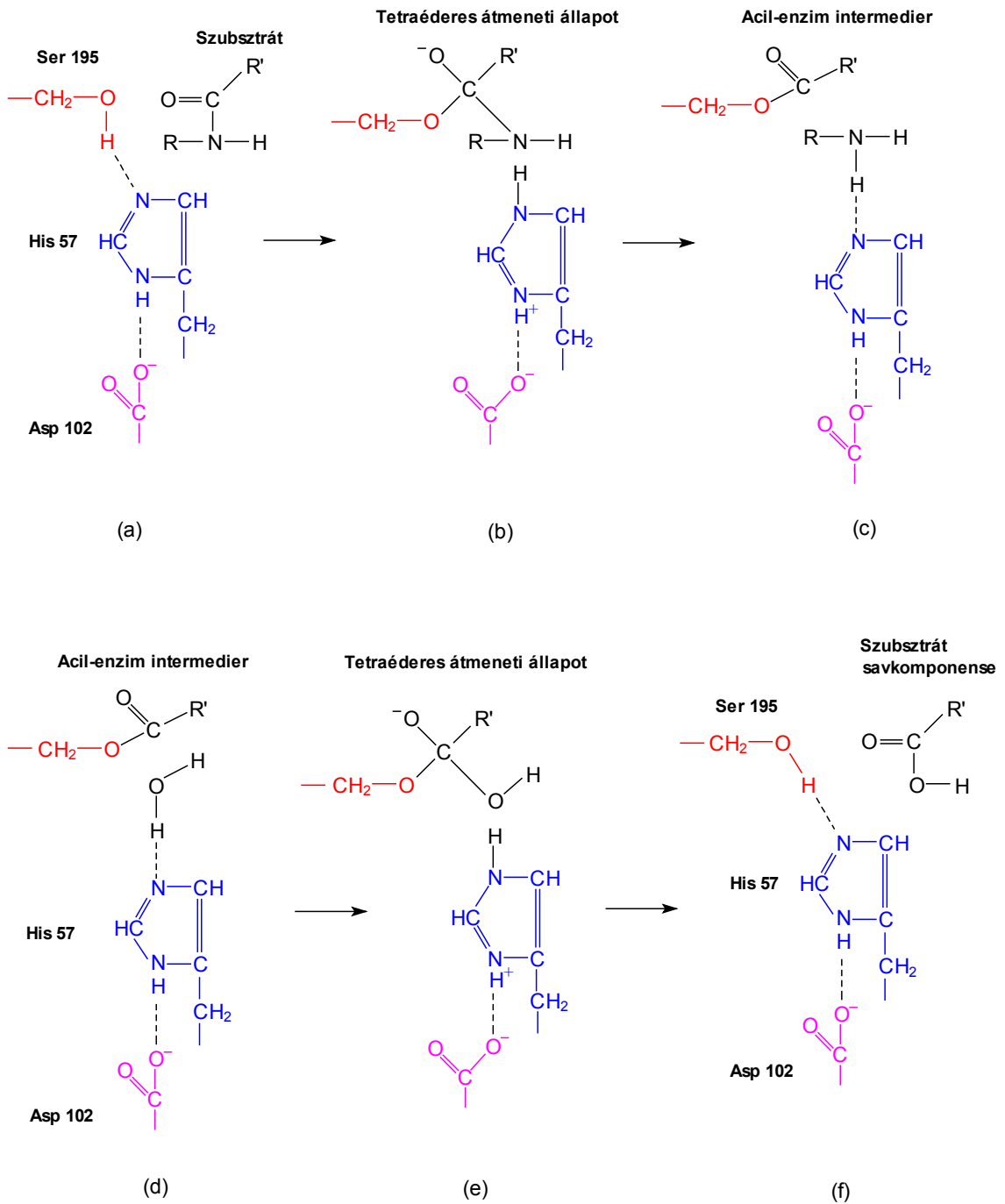
Az His 57 $N^{\delta 1}$ -je kb. 2,8 Å-re van az Asp 102 $O^{\delta 2}$ -től, így itt szintén egy hidrogénkötés alakul ki. A His 57 N^α -je és az Asp 102 $O^{\delta 1}$ között 2,9 Å a távolság, a kettő között is egy hidrogénhid kötés van, amely kialakításához a His 57 α -aminocsoportja szolgáltatja a protont.

2.1.2. A katalízis mechanizmusa

Az α -kimotripszin két jól elkülöníthető lépésben katalizálja a peptid vagy észterkötések hidrolízisét. Van egy gyors szakasz és egy ezt követő lassabb, ún. steady-state szakasz. Az első, gyors lépést, melynek során az acil-enzim intermedier kialakul, acilálásnak nevezzük, míg a második, lassabb lépést, mialatt az enzim

regenerálódik, dezacilálásnak hívjuk. Ez utóbbi lépés sokkal lassabb, mint az első, így ez határozza meg az észter- vagy peptidhidrolízis sebességét (Stryer, 1988).

A peptidkötés hidrolízisének első lépése, hogy a Ser 195 hidroxilcsoport oxigén atomja támadást intéz a szubsztrát elhasításra váró peptidkötésének karbonil szénatomján (5a. ábra).



5. ábra. Az α -kimotripszin katalízisének folyamata.

A karbonil csoport szén-oxigén kötése egyszeres kötéssé alakul, miközben az oxigénatom negatív töltésre tesz szert. Az eredeti karbonilcsoport szénatomja körül a négy kötés tetraédeserésen helyezkedik el, létrehozva egy ún. *átmeneti tetraédes közterméket* (5b. ábra). Ennek kialakulásában fontos szerepe van a katalitikus triád másik két tagjának is: a Ser 195-ről egy proton a His 57-re helyeződik át, ehhez az Asp 102 pontosan irányba állítja a His 57 imidazol gyűrűjét és részlegesen semlegesíti annak - az átmeneti állapot során kialakult - töltését. A His 57 protonált formája szolgáltatja a protont az elhasítandó peptidkötés nitrogénatomja számára. Így a szubsztrát aminkomponense hidrogénkötéssel kapcsolódik a His 57-hez, míg a savkomponense a Ser 195-höz kapcsolódik észterkötéssel létrehozva ezzel egy acil-enzim intermediert (5c. ábra). Az aminkomponens eldiffundál, s ezzel befejeződik az acilálás. Ezt követően a dezacilálás során egy vízmolekula foglalja el a szubsztrát aminkomponensének helyét (5d. ábra). Először egy töltésátrendeződés során egy proton a vízmolekuláról elvonódik, és az így kialakult OH^- támadást intéz a Ser 195-höz kapcsolódó acilcsoport karbonil szénatomján. Csakúgy mint az acilálás során, itt is kialakul az átmeneti tetraédes köztermék (5e. ábra). A His 57 donorként átad egy protont a Ser 195 oxigénatomjának, s ezzel a Ser 195 elengedi a szubsztrát savkomponensét (5f. ábra). A savkomponens eldiffundál és ezzel az enzim újabb szubsztrát átalakítására válik alkalmassá.

2.2. BIOKATALÍZIS SZERVES OLDÓSZERES KÖZEGBEN

Az enzimekatalízis fiziológias közege vizes oldat, azonban sok biokatalizátor képes működni nem hagyományos közegben is. Nem hagyományos közegnek tekintjük azokat, amelyek főleg szerves anyagokat (pl. oldószerek), szuperkritikus folyadékot tartalmaznak, esetleg gázhalmazállapotú reakció közeget jelentenek (Adlercreutz, 1994). Ezekben a rendszerekben gyakran a víztartalom meglehetősen alacsony. Leggyakrabban különböző szerves oldószereket alkalmaznak a nem hagyományos közegű biokatalitikus folyamatok vizsgálatára, mivel felhasználásuknak több előnye is van: alacsony víztartalom mellett a hidrolitikus reakciók egyensúlya eltolódhat ellenkező irányba, s így szintetikus reakciók (pl. peptid- és észterszintézis) valósíthatók meg; bizonyos reakciók jobb hatásfokkal mennek végbe, mint vizes közegben (pl. átészteresítés lipázokkal); nem kell számolni a mikrobiális fertőződés veszélyeivel; nincsenek mellékreakciók; egyes vegyületek (pl. cukrok, szteránvázis vegyületek) esetén kontrollálható az enzimek enantio/regioszelektivitása; szerves oldószeres

rendszerekben a hidrofób szubsztrátok oldékonysága nő; a szerves oldószerből számos termék olcsón és könnyen kinyerhető és az enzimek hőstabilitása is fokozódhat alacsony víztartalmú rendszerekben (Gupta, 1992; Katchalski-Katzir, 1993). A számos előny mellett a szerves oldószer alkalmazásának hátránya, hogy az oldószer enzim szerkezetére kifejtett hatása gyakran kedvezőtlen az enzim katalitikus aktivitása, stabilitása szempontjából. Ennek a problémának a kiküszöbölése a biotechnológia egyik nagy feladata.

A víz és a szerves oldószer aránya, megoszlása a rendszerben, a polaritási viszonyok jelentősen befolyásolják az enzimek működését. A szerves oldószeres rendszerek jellemzésére legelterjedtebben két paramétert használnak, a termodinamikai vízáktivítást (a_w), valamint a megoszlási hányados logaritmusát ($\log P$). Az a_w a közegben lévő víz oldaláról közelíti meg a rendszerben fennálló viszonyokat, míg a $\log P$ a szerves oldószer oldaláról jellemzi a rendszert.

A termodinamikai vízáktivitás (a_w) fogalmát azért vezették be, mert az enzimek szerves oldószeres közegben megfigyelt viselkedésére vonatkozó nagyszámú vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy egy adott enzim működéséhez szükséges vízmennyiség különböző oldószerekben más és más volt. Egyre inkább elfogadott, hogy alacsony víztartalmú közegben a vízviszonyokat legjobban a termodinamikai vízáktivítással lehet leírni (Halling, 1994). A tiszta víz vízáktivitása 1, a teljesen vízmentes rendszeré 0, és így az a_w értéke 0-1 között változhat. Az a_w értéke általában nem egyezik meg számszerűleg a vízkoncentráció értékével, ugyanis a reakcióelegyben levő összes fázis vízáktivitása azonos lehet egyensúlynál, mégha vízkoncentrációjuk általában különböző is lesz (Bell és mtsai, 1995). A vízáktivitás gyakorlatilag a víznek azt a mennyiségét mutatja meg, ami az enzimhez kötött és ez határozza meg az enzimaktivitást. Ezzel különböző enzimek eltérő szubsztrátspecifitásait is tudták értelmezni (Carrea és mtsai, 1995). Ha az enzimreakciókat különböző közegben végzik rögzített a_w értéknél, a biokatalizátorhoz kötött víz mennyisége ugyanannyi lesz. Kis vízáktivitás mellett a szerves oldószer jelenléte csak kevésbé befolyásolja a fehérje és a hozzá erősen kötődő víz közötti kölcsönhatást, tehát az oldószer molekulák csak kis mértékben hatolnak át az enzim hidrátburkán (Halling, 1990).

A víznek kulcsfontosságú szerepe van a szerves oldószeres biokatalízisben, ha nagyon kevés is, de mindig jelen kell lennie a katalízis során (Adlercreutz, 1991). A víznek kettős szerepe van: egyrészt fenntartja az enzim katalitikusan aktív konformációját, ugyanis biztosítja az enzim működéséhez szükséges flexibilitást,

másrészt szükség van rá az inaktiválódási folyamatokban is. Zaks és Klibanov (1988b) kimutatták, hogy sokkal inkább az enzimhez kötött víz, mint a rendszer teljes víztartalma határozza meg a katalitikus aktivitást. Ha ugyanannyi mennyiségű vizet adtak a különböző szerves oldószereket tartalmazó rendszerekhez, az enzimhez kötődő víz mennyisége különböző volt. Általánosan elmondható, hogy minél polárosabb az oldószer, annál több vizet tart oldatban, és így az képtelen az enzimhez kötődni (Gorman és Dordick, 1992; Bell és mtsai, 1995). Vizes fázis jelenléte nélkül, majdnem víztelen közegben lehetővé válik az enzim közvetlen kölcsönhatása a szerves oldószerrel és ennek a kölcsönhatásnak a lehetősége a katalizátor stabilitása, specifitása és aktivitása szempontjából új megközelítést nyújt. A víz jelenléte, mennyisége a közegben jelentősen befolyásolja az enzim aktivitását, stabilitását is (Klibanov, 1989). Szerves oldószeres biokatalízisekben az enzimek működéséhez szükséges vízmennyiség optimalizálása fontos feladat, ugyanis nagy mennyiségű víz jelenléte is kedvezőtlenül befolyásolhatja a katalitikus folyamatokat. Ha az optimálishoz képest túl sok a víz a rendszerben, az két szempontból is kedvezőtlen, egyrészt a sok víz kedvez az inaktiválódási folyamatoknak, másrészt a reakciók egyensúlya a hidrolízis irányába tolódik el.

Több egybehangzó irodalmi adat szerint az oldószereket jellemző paraméterek közül (Hildebrand oldhatósági állandó, dielektromos állandó, dipólus momentum, megoszlási hányados logaritmus stb.) a szerves oldószeres biokatalízisekben az enzimműködéssel talán legjobban összefüggő paraméter az oldószerek hidrofób jellegének jellemzésére szolgáló log P (megoszlási hányados logaritmus) (Castro, 1999), bár kétségtelenül nem minden esetben mutat korrelációt az enzimek működésével ez a paraméter sem (Battistel és Bianchi, 1993; Ghatorae és mtsai, 1994). A log P azt fejezi ki, hogy milyen az adott szerves oldószer megoszlása egy oktanol-víz kétfázisú rendszerben (Laane és mtsai, 1985). Az oldószereket három csoportba lehet sorolni log P értékük alapján: a) azok az oldószerek, amelyeknek vízben való oldékonysága $> 0,4\%$ ($\log P < 2$); b) a vízben kevésbé oldódó oldószerek ($0,04-0,4\%$), ezekre $2 < \log P < 4$ között van; c) apoláros oldószerek, melyek gyakorlatilag nem oldódnak vízben és $\log P$ értékük > 4 (Laane és mtsai, 1987). Megállapították, hogy összefüggés van az oldószer log P értéke és az adott oldószerben működő enzimek katalitikus aktivitása között. A $\log P < 2$ oldószerek általában nem nagyon alkalmasak biokatalitikus folyamatok kivitelezésére, mert jelentősen és kedvezőtlenül módosítják az alapvető víz-enzim kölcsönhatásokat, s ezáltal inaktiválják vagy denaturálják az

enzimet; azok az oldószeres, melyekre $2 < \log P < 4$, kevésbé hatnak a víz-enzim kölcsönhatásokra, így alkalmasabb közegek; míg azok az oldószeres, amelyek $\log P$ értéke > 4 , nem vagy csak kevésbé befolyásolják az esszenciális vízburkot az enzim körül, így az enzimet aktívabb állapotban tartják, s emiatt enzimátikus reakciók közegének különösen alkalmasak lehetnek (Reslow és mtsai, 1987).

Wehtje és mtsai (1993) az N-acetil-L-fenilalanin etanollal való észterezését vizsgálták rögzített kimotripsinnel különféle szerves oldószeresben (heptán, etilacetát, diizopropil éter, 2-pentanon, 2-heptanon, acetonitril) és vizsgálták a reakcióközeg polaritásának az enzimaktivitásra kifejtett hatását. Azt tapasztalták, hogy a reakciósebesség emelkedett a növekvő mennyiségű víz hozzáadásával, elérve egy optimum értéket, ami gyakorlatilag a reakcióközeg víztelítettségét jelentette. További víz hozzáadásával csökkent a szintetikus aktivitás, mely azzal magyarázható, hogy a hidrolízis irányába tolódott el a reakció egyensúlya. Az oldószeres hatását külön-külön és elegyekben is vizsgálták és arra a megállapításra jutottak, hogy az enzimaktivitás és az egyensúlyi hozam növekedett a közeg polaritásának csökkenésével. A legnagyobb aktivitás 80% diizopropil éter és 20% heptán tartalmú elegyben volt megfigyelhető. A tapasztalt enzimaktivitás korrelációban volt a víz oldékonyságával a reakcióelegyben és a közeg $\log P$ értékével.

2.2.1. A szerves oldószer hatása a szubsztrátra és a reakcióra

Szerves oldószeres biokatalízis során egy adott reakcióban mindig kritikus szerepet játszik a megfelelő szerves oldószer kiválasztása, ugyanis az oldószer a reakcióelegyben lévő minden összetevőre hatással van. Az alkalmas szerves oldószer kiválasztásakor figyelembe kell vennünk, hogy az milyen hatást fejt ki a reakcióra (beleértve a szubsztrátok oldékonyságát, reakció egyensúlyi helyzetét, kinetikai paramétereket, enzim specifitását) (Tewart és mtsai, 1995; Paninrarux és mtsai, 1995). A szubsztrát és az oldószer közötti kölcsönhatás erőssége befolyásolja a reakció kinetikai paramétereit, ugyanis ha pl. nagyon erős a szubsztrát-szerves oldószer közötti kölcsönhatás, akkor az enzim-szubsztrát komplex kialakulása gátolt, s a K_M értéke növekszik (Bell és mtsai, 1995). Fontos továbbá, hogy az illető oldószer csak közegként funkcionáljon a rendszerben, de ne legyen egyben reakciópartner is (pl. átészterezés alkoholokkal alkoholos közegben), hacsak nem kifejezetten ez a cél, hiszen ilyenkor előfordulhat, hogy szintézisek során nem a kívánt terméket kapjuk.

Az oldószer hatása ugyanarra a szubsztrátra nézve más enzimekkel másként érvényesül. Az oldószer molekulák kötődnek az enzim kötő- vagy katalitikus helyére és ezáltal befolyásolják egyik vagy másik enantiomer átalakítását, így módon az enzimek enantio- és regioszelektivitása változhat szerves oldószeres rendszerekben. Lozano és mtsai (1997) azt tapasztalták, hogy az oldószer hidrofób jellegének növekedésével fokozódott az α -kimotripsinnel vizsgált szintetikus reakció szelektivitása. Ugyanakkor Kawashiro és mtsai (1996) proteázok által katalizált átészterestéseket vizsgálva megállapították, hogy az enzimek mind hidrofíl, mind hidrofób oldószerekben általában az L-enantiomert részesítették előnyben, bár az enzimek enantioszelektivitását befolyásolta az oldószer természete, a rendszer víztartalma, illetve a szubsztrát (észter) szerkezete.

Noritomi és mtsai (1996) szubtilizin Calsberg és *Rhizomucor miehei* lipáz, valamint Månsson és mtsai (1992) α -kimotripszin enantioszelektivitását vizsgálva szerves oldószeres közegben megállapították, hogy az enzimek enantioszelektivitása erősen függött az enzimpreparálás módjától (pl. liofilizálás, ko-liofilizálás pl. polietilén glikollal vagy N-acetil-L-Phe-amiddal, keresztkötés, kovalens módosítás, kicsapás különböző oldószerekben L- vagy D-szubsztrát jelenlétében illetve anélkül).

2.2.2. A szerves oldószer hatása a fehérjeszerkezetre

A szerves oldószer hatással vannak a fehérjék szerkezetére, s ezúton befolyásolják az enzimek aktivitását, stabilitását is. Amennyiben a szerves oldószer az enzim aktív centrumába vagy annak közelébe kapcsolódik, jelentősen befolyásolhatja az enzimreakciót. A fehérjemolekulákat oldatban egy hidrátburok veszi körül, amit a fehérje felületéhez kötődött vízmolekulák alakítanak ki főleg hidrogénkötések révén és ezek segítségével tartják fenn a fehérjék natív konformációját (Khmelnitsky és mtsai, 1991). Ha jelen van valamilyen szerves oldószer az oldatban, ezek molekulái igyekeznek a vízmolekulákat átrendezni, mintegy elvonni a fehérje hidrátburkától, s ezáltal kedvezőtlenül befolyásolhatják azokat a kölcsönhatásokat, amelyek felelősek a fehérjék natív konformációjának fenntartásáért (Arakawa és Goddette, 1985). Általánosan elmondható, hogy a hidrátburok sérülése az egyik fő oka a fehérjék szerves oldószerekben megfigyelhető denaturációjának. Változhat a közegtől függően a hidrogén-hidak, elektrosztatikus kölcsönhatások mennyisége, gyengülhetnek a hidrofób kötőerők (Battistel és Bianchi, 1993). Mivel a szerves oldószer nem "közege" az enzimnek, így szerves oldószeres rendszerben gyengébb kölcsönhatás várható az enzim

és a szerves oldószer között, mint vizes közegben az enzim és a víz között. Bemquerer és mtsai (1994) azt tapasztalták, hogy alacsony víztartalmú rendszerekben az enzim rigidde válik, és feltételezhetően megváltozik a konformációja, az enzim-szubsztrát kölcsönhatás és ezáltal a specifitás is.

Az oldószer enzim szerkezetére kifejtett közvetlen hatásáról több vizsgálat tanuskodik. Schmitke és mtsai (1997) szubtilizin röntgenkrisztallográfiás vizsgálatát végezték el vízmentes dioxánban és leírták, hogy a szubtilizinhez hét molekula dioxán kötődik, melyből kettő az aktív centrum régiójába, öt pedig az enzim felületéhez kapcsolódik, s a kötődött oldószer molekulák helyzete kissé eltér a vízben vagy acetónitrilben tapasztalttól. Fitzpatrick és mtsai (1993) szintén a szubtilizinnél azt tapasztalták, hogy az enzim megköt néhány acetónitril molekulát az aktív centrumában. Gupta és mtsai (2000) *Tritirachium album* proteináz K enzimének szerves oldószer okozta szerkezeti változásait vizsgálva azt találták, hogy három molekula acetónitril található az enzim kötő régiójában, kimotripszin esetében pedig hexán molekulákat találtak az aktív centrum közelében (Yennawar és mtsai, 1994). Mindez arra utal, hogy az enzim közvetlen kölcsönhatásba lép az oldószerrel (Dong, 1996).

Az oldószernek az enzim szerkezetére kifejtett hatását vizsgálták Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiával Xu és mtsai (1997). A szubtilizin α -hélix és β -lemez összetételét hasonlították össze különböző szerves oldószerekben a vizes közeghez viszonyítva és megállapították, hogy 2,2,2-trifluoretanolba helyezett liofilizált szubtilizin α -hélix tartalma csaknem duplájára emelkedett, míg a β -lemezek száma gyakorlatilag nem változott. A többi vizsgált oldószer közül glicerinben és 2,2,2-triklóretanolban nem volt megfigyelhető az α -hélixek számának szignifikáns növekedése, míg 2,2,2-triklóretanolban a β -lemezek száma 10%-kal megnőtt. Érdekes eredményt kaptak dimetil szulfoxidban (DMSO), ugyanis ebben az oldószerben mind az α -hélixek, mind a β -lemezek száma drasztikusan lecsökkent. Ugyancsak 2,2,2-trifluoretanol indukálta szerkezeti változásokat írtak le Dong és mtsai (1998) dominánsan β -lemezből álló fehérjéknél (α -kimotripszin, β -laktoglobulin). Megállapították, hogy 50% (v/v) oldószer tartalmú rendszerben a fehérjék IR spektrumában α -helikális struktúrára jellemző sávok jelentek meg közvetlenül az oldószerben való feloldás után. Az α -helikális sávok intenzitása az idő előrehaladtával csökkent és ezzel egyidejűleg új sávkomponensek jelentek meg, melyek azonban intermolekuláris β -lemez aggregátumok megjelenését jelezték. Hasonló szerkezeti változásokat nem tapasztaltak a főként α -hélixekből álló mioglobin és citokróm c

fehérjéknél. A szerves oldószernek az enzim szerkezetére kifejtett módosító hatását írták le Simon és mtsai (2001) is. Tripszin és α -kimotripszin szerkezetét vizsgálták cirkuláris dikroizmus módszerrel különböző koncentrációjú etanolban és acetonitrilben és megállapították, hogy a másodlagos szerkezeti elemek százalékos megoszlása jelentősen eltért a vizes közegben tapasztalttól és nagy mértékben függött az oldószer természetétől és koncentrációjától.

2.2.3. Szintetikus reakciók szerves oldószeres közegben

Az enzimeknek szerves vegyületek szintézisére való felhasználása nagy tért hódított az elmúlt évtized során. A hidroláz enzimek szerves oldószeres rendszerekben, kontrollált körülmények között (pl. víztartalom) szintetikus reakciókat katalizálhatnak, melyek pl. észter- és peptidszintézisek, átészteresítések lehetnek. Az enzimátikus szintézisek során a hidrolázok nagyon jól alkalmazhatók kondenzációs termékek előállítására, mint pl. a β -laktám antibiotikumok, észterek, peptidek, oligoszacharidok, gliceridek (Moresoli és mtsai, 1991).

2.2.3.1. Észterszintézisek

Direkt észteresítések alkalmával proteázokkal megvalósított reakciókban résztvevő szubsztrátok általában N-védett aminosavak és alkoholok lehetnek. A reakció során az aminosav karboxilcsoportja és az alkohol hidroxilcsoportja között kondenzációs reakcióval észterkötés alakul ki.

Turková és mtsai (1982) kimotripszint adszorpcióval rögzítettek polietilén tereftalát hordozóhoz (Sorsilen) és az N-acetil-L-Trp etanollal való észteresítését tanulmányozták kloroformban. Az alkalmazott szubsztrát arányok a következők voltak: N-acetil-L-Trp:etanol 1:200, 1:400 és 1:800. Állandó aminosav-szubsztrát koncentráció mellett az észteresítés hozama növekedett a növekvő etanol koncentrációval ($1:200 < 1:400 < 1:800$). Az észterszintézis időben telítési görbe szerint ment végbe és a csökkenő szubsztrát koncentrációval arányosan időben hamarabb elérte a reakció a telítési maximumot.

Phillips és mtsai (1990) N-acetil-L-Trp különböző alkoholokkal való észteresítését vizsgálták oldott kimotripszinnel az illető alkohol oldatában, mint szerves oldószeres közegben. A normál láncú alkoholok közül az 1-propanol bizonyult a legjobbnak (81% termék), míg etanollal, 2-propanollal és 1-butanollal hasonló hozamokat értek el (64% termék). Nagyobb méretű és elágazó alkoholok közül a

3-metil-1-butanollal, ciklopentanollal és a ciklohexanollal 50% körüli átalakulást tudtak elérni, azonban négyszer olyan hosszú reakcióidő alatt, mint a rövidebb láncú és kisebb alkoholokkal. 2-metil-2-propanollal nem kaptak terméket, benzil-alkohollal pedig csak nyomokban tudták kimutatni a kapott észtert. Metanollal sem volt termékképződés. Hogy ezt értelmezni tudják, metanol:etanol (10:1, 1:1 és 1:10) elegyekben is végrehajtották a szintetikus reakciót, és arra az eredményre jutottak, hogy egyedül a metanol:etanol 1:10 elegyben kaptak terméket, ami egyértelműen arra utal, hogy a metanol erős inhibítora az α -kimotripszin által katalizált észteresítési reakciónak. Hasonlóan 2-metil-2-propanol:etanol (10:1, 1:1 és 1:10) elegyekben is megvizsgálták a lehetséges termékképződéseket és ez esetben mindegyik oldószer elegyben kaptak észtert, ami viszont arra utal, hogy a 2-metil-2-propanol nem inhibítora az α -kimotripszin által katalizált reakciónak, csupán képtelen nukleofilként résztvenni az észterszintézisben. Tanulmányozták továbbá a kimotripszin sztereospecifitását is, és arra a következtetésre jutottak, hogy az enzim igen nagy specifitást mutatott az L-aminosavakra nézve (> 99%).

Kise és Hayakawa (1991) α -kimotripszint és szubtilizin B-t rögzítettek adszorpcióval pórusos kitozán gyöngyökre és vizsgálták a rögzített, valamint az oldott enzimek katalitikus tulajdonságait N-acetil-L-Tyr és etanol között lejátszódó aminosav észteresítési reakciókban. Megállapították, hogy számos hidrophil szerves oldószerben (aceton, acetonitril, tetrahidrofurán (THF), dioxán) a rögzített kimotripszin nagyobb katalitikus aktivitást mutatott, mint az oldott. Nem volt észterképződés abban az esetben, ha a szerves oldószer metanol vagy dimetilformamid (DMF) volt. Ha magában az etanolban hajtották végre a reakciót, akkor az észteresítés kezdeti sebessége növekedett a víztartalommal és maximumát kb. 8% víz jelenlétében érte el, míg ha etilacetát volt a szintézis közege, a reakciósebesség magasabb víztartalom mellett csökkent és maximális 2-3% víztartalomnál volt. Ezzel szemben a szubtilizin B oldott formában gyakorlatilag egyáltalán nem katalizálta a fenti észteresítési folyamatot, ellenben kitozánra rögzítve hatékony katalizátornak bizonyult. Széles víztartalom tartományban a víz mennyiségének növelésével csak kis mértékben változott az észterszintézis hozama, s a maximális kitermelést 3,2% víz jelenlétében érték el.

Agaróz gyöngyökre többpontos kovalens kötással rögzített kimotripszinnel hajtották végre az N-acetil-L-Trp feniletill észter szintézisét szerves oldószeres közegben Blanco és mtsai (1992a). A konverzió az oldószer polaritásának csökkenésével növekedett (észter: triklóretán > izopropiléter > 3-pentanon > etilacetát > 2-butanon).

Az oldószerek polaritása és a reakció egyensúlyi helyzete között fordított arányosság állt fenn, ugyanis a legkevésbé poláros oldószer esetében kapott egyensúlyi állandó értéke 38-szor nagyobb volt, mint a legpolárosabb oldószer esetén. Ha koszolvenszet alkalmaztak (DMF, acetonitril 10-20%-ban), az nem befolyásolta a reakció kezdeti sebességét, de lényegesen csökkentette az egyensúlyi hozamokat valószínűleg azért, hogy növelte a szerves fázis polaritását.

Szacharózra rögzített *Aspergillus oryzae* proteáz által katalizált észterképződési reakciót vizsgálták Tai és mtsai (1993) pH 7,5-n különböző szerves oldószerekben (etilacetát, terc-amil-alkohol, kloroform, acetonitril, diklórmétán, dietil éter és THF). A reakcióhoz N-védett aminosavakat és különféle alkoholokat (metanol, etanol és 2-klór-etanol) használtak szubsztrátként. Ha metanol volt az alkohol szubsztrát, akkor az oldószerek közül az etilacetát bizonyult a legjobb (81% termék), míg a diklórmétán a legkevésbé alkalmas oldószernek (5% termék). Az alkohol szubsztrátok természete nagyban befolyásolta a reakció kimenetelét, ugyanis etilacetátban az elért észterhozam metanol > etanol > 2-klór-etanol irányban csökkent (észterhozam: 81, 65 és 5%).

N-védett aminosavak, illetve peptidek és a glicerin közötti észterképződési reakciót tanulmányozták Mitin és mtsai (1997) papainnal glicerinben mint oldószerben. Optimalizálták a reakció körülményeit és azt állapították meg, hogy 10% víztartalom és aminosav:glicerin 1:50 arány mellett, pH 3 körül, 50°C-on kapták a legnagyobb kitermelést. Az észteresítési reakció gyakorlatilag ilyen körülmények között 6-7 óra alatt érte el az egyensúlyt. Megállapították továbbá, hogy a vizsgált reakció független volt az enzim koncentrációjától, hiszen csaknem azonos kitermelést értek el 1-40 mg mL⁻¹ papain koncentráció tartományban. A legjobb észterhozamokat N-védett alaninnal, metioninnal és szerinnel kapták, mindegyik esetében 72-73%-os volt a konverzió.

Különböző Celitre rögzített proteázok (alkaláz, *Aspergillus oryzae* proteáz, pepszin, lipáz, szubtilizin, tripszin, papain) szintetikus tulajdonságait hasonlították össze Shih és mtsai (1997). Ehhez N-védett aminosavak és szekunder alkoholok (2-butanol, 2-feniletill alkohol) közötti észterképződési reakciókat tanulmányoztak egyrészt az adott alkoholok oldatában, másrészt egyéb szerves oldószerekben (toluol, diklór-métán, etilacetát). Jelentős eltérést tapasztaltak a különböző proteázok szintetizáló képességében: amennyiben 2-butanol volt az alkohol szubsztrát és egyben a reakció közege is, a legnagyobb észterhozamot tripszinnel érték el (66%-os konverzió), míg a legkisebbet pepszinnel (11%-os konverzió). Ha 2-feniletill alkohol volt a szubsztrát és a

közeg, a legnagyobb kitermelést papainnal (71%), a legkisebbet szintén pepszinnel (4%) kapták. Összehasonlították a lipáz, valamint a papain esetében a különböző szerves oldószerek észterhozamokra kifejtett hatását és azt kapták, hogy a legnagyobb hozamokat akkor érték el, ha az adott alkohol volt a reakció közege is (lipáz: 56%, papain: 71%). Ehhez képest lipáz esetében fele annyi termék képződött toluolban és diklór-metánban, és alig több mint 10% termék etilacetátban. Papain esetében toluolban és diklór-metánban közel annyi termék képződött, mint amikor az alkohol volt a közeg is, és a lipázhoz hasonlóan alig több mint 10% észter keletkezett etilacetátban. A legjobb hozamok eléréséhez pH 7,5 és 4 nap volt szükséges.

2.2.3.2. Átészteresítések

A szerves oldószeres rendszerekben végzett reakciók másik területét az átészteresítések jelentik. Ilyen esetekben már meglévő észterekből és valamely alkoholból mint szubsztrátokból indul ki a reakció és ennek során az észter alkohol komponense cserélődik le. A reakcióhoz szükséges aktiválási energia lényegesen kisebb, mint a direkt észteresítés során, hiszen ez esetben már eleve aktivált molekulából (észter) indul ki a reakció.

Szilikához rögzített kimotripsinnel megvalósított átészteresítési reakciót vizsgáltak Moresoli és mtsai (1991). Racém Phe-propil észter 1,4-butándiollal végrehajtott átészteresítését tanulmányozták, mely reakció eredményeként L-Phe-4-hidroxibutil észtert kaptak. A reakciót az átészteresítés során felszabaduló 1-propanol alkoholízise is kísérte, valamint a propil- és hidroxibutil észterek hidrolízisét is megfigyelték. Összehasonlították a rögzített és az oldott enzim átészteresítő képességét, valamint a kétféle enzimforma esetében az átészteresítéshez szükséges körülményeket. Különös figyelmet szenteltek a pH-nak és vizsgálataikat konstans pH mellett (pH 6,25), valamint pH kontroll nélkül is elvégezték. Ez utóbbi esetben a kiindulási pH 6,4 illetve 6,7 volt, és az átészteresítést kísérő hidrolízis következtében fokozatos pH csökkenést figyeltek meg a rendszerekben. A maximális észterhozamokat, a kiindulási pH 6,4 esetében pH 6,18-nál, míg a kiindulási pH 6,7 esetén pH 6,38-nál kapták. Állandó pH mellett (pH 6,25) az oldott enzim átészteresítő képességét találták nagyobbak, míg a hidrolízis a rögzített enzim esetében volt jelentősebb.

Kawashiro és mtsai (1996) különféle N-trifluoracetyl-Phe észterek és 1-propanol között lejátszódó átészteresítési reakciókat vizsgálták acetonitrilben és toluolban kimotripsinnel és szubtilizinnel. A reakciókban az észter szubsztrát:1-propanol arány

1:100, az enzimkoncentráció 10 mg mL^{-1} volt. Arra voltak kíváncsiak, hogy az észter szubsztrát észter csoportja (trifluoretil-, klóretil-, etil-) hogyan befolyásolja a proteáz enantioszelektivitását. Megállapították, hogy az észtercsoport aktiváltságának növekedésével növekszik az átészteresítés sebessége, de ezzel együtt csökken az enantioszelektivitás mindkét oldószerben. Míg a reakciósebesség a hidrofób toluolban volt a nagyobb, addig az enantioszelektivitás a hidrofil acetonitrilben. Megállapították, hogy a kimotripszin az L-enantiomert részesítette előnyben a nem aktivált észter szubsztrát esetében mindkét oldószerben, amit azzal magyaráztak, hogy a kimotripszin aktív centrumában lévő szubsztrátkötő zsebek csak megfelelő konfigurációjú szubsztrát bekötődését teszik lehetővé. A szubtilizin által katalizált átészteresítések során viszont azt tapasztalták, hogy az enzim specifikusa nagyon eltérő képet mutatott az alkalmazott oldószerektől függően.

Elsősorban lipázok, valamint mikrobiális proteázok esetében írtak le olyan átészteresítési reakciókat, melyben az egyik partner valamilyen szénhidrát, a másik pedig gyakran egy zsírsav vagy annak származéka volt. Az ilyen típusú reakciók végterméke az illető zsírsav szénhidrát észtere, mely termék nemionos felületaktív anyagként való felhasználása nagy jelentőségű a kozmetikai-, élelmiszer- és gyógyszeriparban is. Bagi és Simon (1999) különböző hordozókra (Al_2O_3 , Celit, Sorsilen, poliakrilamid és szilika) rögzített sertés pankreász lipáz enzimmel fruktóz-vajsav észter keletkezését acetonitrilben direkt észteresítéssel és átészteresítéssel írták le. Igen alacsony víztartalom (0,5%) és fruktóz:vajsav arány 1:5 mellett, 30°C -on, összehasonlították az egyes enzimpreparátumok szintetizáló képességét. Az adszorpcióval rögzített enzimkészítményekkel, elsősorban a Celittel és a Sorsilen-nel sokkal jobb konverziót értek el, mint a kovalensen kötöttekkel (szilika és poliakrilamid hordozók). Az átészteresítéssel elérhető maximális észterhozam (Celit-lipáz) ötször akkora volt (57%), mint a direkt észteresítéssel (Sorsilen-lipáz, 11%).

Potier és mtsai (2000) *Bacillus subtilis* proteináz-N enzim segítségével zsírsavak és egyéb savak trifluoretil észterei és szacharóz közötti átészteresítéseket tanulmányoztak vizes DMSO-ban és DMF-ban. Megfigyelték, hogy az átészteresítési reakciók regioszelektíven 1'-O-monoacilált szacharóz származék keletkezéséhez vezettek. Megállapították, hogy a kiindulási észterek lánchosszúsága, illetve elágazása befolyásolja a reakciót, az alifás észterekkel gyorsabb reakciót kaptak. Vizsgálták továbbá a víz hatását a reakcióra és azt figyelték meg, hogy nagyobb termékhozamokat

érték el max. 7% vizet tartalmazó DMF-ban, de amennyiben a víz mennyiségét 7% fölé emelték, alacsonyabb volt a kitermelés, mivel a víz mint kompetitív nukleofil játszott szerepet a reakcióban. Ugyanolyan körülmények között a DMSO-ban nem ment végbe reakció, amit annak tulajdonítottak, hogy a DMSO denaturálta az enzimet.

2.2.3.3. Peptidszintézisek

Peptidszintéziskor a szerves oldószeres rendszerekben a szubsztrátok általában N-védett aminosavak és C-védett aminosavak (aminosav-amidok) lehetnek. A reakció során az aminosav karboxilcsoportja és a másik szubsztrát aminocsoportja között kondenzációs reakció játszódik le és peptidkötés alakul ki.

Nilsson és Mosbach (1984) trezil kloriddal aktivált agarózra rögzített kimotripsint használtak peptidek szintézisére. Szubsztrátként N-acetilált aminosav észtereket alkalmaztak donornak és aminosav amidokat akceptornak. Szerves közegként pedig vízzel elegyedő oldószereket (DMF, acetone, acetonitril, metanol, glicerin, butándiol) használtak. Azt tapasztalták, hogy a peptidszintézis mértéke növekedett az oldószer koncentrációjának növekedésével, de a szubsztrátok koncentrációja, valamint tulajdonságai (D- vagy L-izomer) is befolyásolták a hozamokat. Gyakorlatilag csaknem teljes átalakulást értek el (97%), amikor a szubsztrátok N-acetil-Phe metil észter és L-alanin voltak és arányuk 1:6 volt. A rögzített enzim különbséget tett az L- és D-akceptor aminosavak között, és az L-forma bizonyult jobb szubsztrátnak, hiszen több mint két és félszer magasabb termékhozamot tudtak vele elérni 90% butándiolban. Tanulmányozták még a hőmérséklet és a pH hatását a peptidszintézisre és megállapították, hogy alacsonyabb hőmérsékleten jobb volt a peptidhozam (67% termék 22°C-on, 86% termék -10°C-on), valamint a pH emelésével emelkedett a kitermelés (10% DMF tartalmú elegyben a legmagasabb hozamot pH 11-nél érték el). A többi oldószer közül az 50% acetone és a 80-90% butándiol volt a legjobb oldószer (70-80% kitermeléseket értek el velük).

Más szerzők különböző hordozókra rögzítették az α -kimotripsint (agaróz, polietilén-hidroxi-metakrilát és oldható akril alapú mikrogélek) és különféle szerves oldószer-víz rendszerekben (etilacetát-víz és 1,4-butándiol-víz) vizsgálták az enzim peptidszintetizáló képességét (Alcántara és mtsai, 1992). Ehhez az acil donor:nukleofil aránya 1:2, a pH 9, a hőmérséklet 25°C volt. A legjobb peptidhozamokat etilacetát-víz elegyekben kapták: agaróz-kimotripsinnel és polietilén-hidroxi-metakrilát-kimotripsinnel is 100%-os konverziót tudtak elérni. Lényegesen kisebb volt a

kitermelés butándiol-víz rendszerekben: agaróz-kimotripszinnel és polietilén-hidroxi-metakrilát-kimotripszinnel maximum 30-45% termék keletkezett. Megállapították azonban, hogy az oldószerkelet összetétele és a hordozó milyensége egyaránt befolyásolja az elérhető maximális hozamokat, ugyanis agaróz gél esetén, ahogy nőtt a szerves oldószer aránya a reakcióelegyben, úgy nőtt a peptidhozam, míg polietilén-hidroxi-metakrilát hordozó esetében az előzővel ellentétes eredményt kaptak. A kapott eredményt azzal magyarázták, hogy az utóbbi hordozó vízmegkötő képessége sokkal kisebb, mint az agarózé. Az oldható mikrogélek esetén csak a butándiol-víz rendszereket vizsgálták és az előző hordozókhoz képest ezen hordozók esetében kapták a legtöbb peptidet a legrövidebb idő alatt (60-65% peptidhozam). Az oka pedig, hogy ez egy "folyékony" állapotú hordozó, így az enzim e hordozóhoz kötve nincs gátolva mozgásában, nincsenek diffúziós problémák.

Gololobov és mtsai (1994) Celitre és Szilokrómra-ra rögzített kimotripszint és szubtilizint használtak fel különböző peptidszintézisekben. Maleil- és benziloxikarbonil csoportokkal N-oldalon védett tripeptid észtereket használtak acil donorként, valamint fenilalanin-, leucin- illetve alanin-amidokat akceptor szubsztrátként a szintézisekben. A reakciókat olyan acetonitril-DMF-víz (4%) elegyekben hajtották végre, melyekben különböző volt a DMF mennyisége. Azt találták, hogy ha a reakcióelegyekben a DMF mennyiségét 0%-ról 48%-ig növelték, úgy a kimotripszin által katalizált reakció sebessége jelentősen csökkent, míg szubtilizin esetében növekedett, tehát a kimotripszin számára a DMF kevésbé alkalmas szolvens, mint a szubtilizin számára. Jelentősen befolyásolta a peptidszintézis reakciók sebességét és a hozamokat a nukleofil természete is.

Lozano és mtsai (1995) Celitre adszorbeáltatták az α -kimotripszint és katalizátorként alkalmazták dipeptid (benzoil-tirozin-arginil etil észter) szintézisre vízzel elegyedő oldószerekben (DMSO, acetonitril, DMF, aceton és THF). Vizsgálták a nukleofil donor minőségének és mennyiségének, valamint az oldószernek a hatását a reakcióra. Azt tapasztalták, hogy a legjobb nukleofil az arginil-etil észter volt, és a legnagyobb szintetikus aktivitást akkor érték el, amikor az arginil-etil észter (nukleofil):benzoil-tirozil-etil észter (acil akceptor) arány 1,5:1. Az oldószer hatásának vizsgálatok megfigyelték, hogy az optimális oldószer koncentráció az oldószer polaritásának növekedésével (THF < aceton < acetonitril < DMF < DMSO) emelkedett. Aceton, acetonitril és THF esetén a szerves oldószer koncentrációjának növekedésével kezdetben hirtelen, majd lassabban csökkent tovább az enzim szintetikus

aktivitása, míg DMSO és DMF esetén a szerves oldószer hozzáadásával növekedett a szintetikus aktivitás, de csak egy maximum értékig, onnan pedig további oldószer adagolással az aktivitás csökkent.

α -Kimotripszin és szubtilizin által katalizált N-benzoil-L-Tyr etil észter és Leu-amid közötti peptidszintézist vizsgáltak Sergeeva és mtsai (1997) szerves oldószeres rendszerekben. A reakciókat oldott és reverz micellákba zárt enzimekkel is végrehajtották és azt találták, hogy mindkét típusú enzimforma hidrofób oldószerekben (izooktán, izopropil éter, butilacetát, metilén-klorid) lényegesen aktívabb volt, mint hidrofilekben (etilacetát, THF), valamint, hogy az oldott enzimekkel a termékhozam több, mint három nagyságrenddel nagyobb volt izooktánban, mint a reverz micellákba zárt enzimekkel. Kis mennyiségű víz hozzáadásával (< 1%) a kimotripszin katalizálta peptidszintézis sebessége 150-szeresre emelkedett etilacetátban, viszont a hozzáadott víz nem fokozta az egyébként is csekély mértékű hidrolitikus mellékreakciót. Ezzel ellentétben ha a szubtilizint tartalmazó reakcióelegyhez adtak kis mennyiségű vizet, a reakció sebessége csökkent és a hidrolízis mértéke fokozódott.

2.3. ENZIMEK OLDÉKONYSÁGÁNAK ÉS STABILITÁSÁNAK FOKOZÁSA

A natív enzimek általában kevésbé oldódnak szerves oldószerekben (Dordick, 1989), ezért számos technikát fejlesztettek ki, hogy növeljék az enzimek oldékonyságát ilyen rendszerekben, így pl. az enzimhez kovalensen amfipatikus polimereket kötnek, pl. polietilén-glikolt (Vazquez-Duhalt és mtsai, 1992), etil-cellulózt (Otamiri és mtsai, 1992). Más esetekben, hogy aktív és stabil enzimeket hozzanak létre közel víztelen szerves közegben, ionpárokat alakítottak ki az enzim és egy felületaktív anyag között, létrehozva ezzel egy hidrofób enzimpreparátumot, ami jobban oldható a szerves közegben (Paradkar és Dordick, 1994, Meyer és mtsai, 1996). Hasonló céllal hidrofób enzimkészítmények nyerhetők, ha kovalensen zárják az enzimet polimer hordozókba (Wang és mtsai, 1997). A biokatalizátort különböző formában alkalmazva lehet a szerves oldószert tartalmazó reakcióelegybe vinni. Leggyakrabban por formájában szuszpendálják az enzimet a közegben erős keveréssel, azonban ilyen körülmények között az enzimrészecskék növekedésük során jelentős diffúziós gáttal kerülnek szembe, különösen magas vízaktivitás esetén.

Az enzimek kémiai módosítása, alkalmas hordozókba zárása nemcsak az oldékonyság növelését segítheti elő, hanem egyben lehetőséget nyújt - számos egyéb módszerrel együtt - az enzimstabilitás növeléséhez is. Különösen nagy figyelmet kell

szentelni az enzimek stabilitásvizsgálatára szerves oldószerekben, mivel a szerves oldószer okozta enzim stabilitás csökkenés lehetősége korlátozó tényező a gyakorlati alkalmazás, így pl. szintetikus reakciók kivitelezése, valamint egyéb hosszabb távú felhasználás szempontjából. Bjarnason és mtsai (1993) hideg-tengeri élőlények (pl. Atlanti tőkehal) enzimeinek (tripszin, α -kimotripszin, kollagenáz, elasztáz stb.) szerves oldószerekkel (DMSO, DMF, dioxán, glicerin, metanol, etanol, 1,3-propándiol, acetonitril) szembeni stabilitását vizsgálták. A szerves oldószereket 25-50%-ban alkalmazták, 25°C-on inkubáltak és 30 napig nézték 4°C-on az aktivitást. A kimotripszin nem inaktiválódott 20 napig DMSO-ban, dioxánban és glicerinben, és más oldószerekben 30 napig őrizte meg aktivitását. A maradék aktivitás megközelítőleg ugyanaz volt az összes szerves oldószerben, kivéve dioxánban, ahol azonnal csökkent az enzimaktivitás 20%-kal, de ezt a maradék aktivitást mindvégig megőrizte. Hasonló eredményeket kaptak szarvasmarha α -kimotripszin stabilitására is.

Mivel elsősorban a hidrátburok sérülése okozza a fehérjék szerves oldószerekben megfigyelhető inaktiválódását, s ezzel stabilitásuk csökkenését (Khmelnitsky és mtsai, 1991), ezért az enzimek stabilitásának javítására kifejlesztett módszereknek azt kell megcélozniuk, hogy kivédhető vagy csökkenthető legyen a hidrátburok sérülése, s ezzel együtt megakadályozható legyen az enzimek inaktiválódása. Az enzimek stabilitása szerves oldószeres közegben is javítható a vizes rendszerekből már ismert és széles körben alkalmazott módszerekkel, mint pl. a fentebb már említett kémiai módosítással, rögzítéssel, illetve "protein engineering"-gel, vagy adalékanyagok hozzáadásával.

2.3.1. Stabilizálás "protein engineering" technológiával

Az enzimek stabilabbá tétele történhet ún. "protein engineering" technológiával, amely során előre megtervezett módon állítják vagy állíttatják elő az illető biokatalizátort a későbbi felhasználási céloknak megfelelően (pl. aminosav cserék a fehérje felületén befolyásolják a fehérje hidrofilitását). A helyspecifikus mutagenézis (Matthews, 1993; Zhang és mtsai, 1995) és a random mutagenézis (Chen és Arnold, 1991; Murooka és mtsai, 1998) a leggyakrabban alkalmazott módszerek, melyek során a vad típusú enzimből meghatározott helyeken mutációt hoznak létre, s ezáltal az eredeti enzimhez képest több nagyságrenddel (30-50-szer, sőt akár 100-szor) stabilabb enzim állítható elő. De Filippis és mtsai (1998) α -amino-izovajsavat vittek be a termolizin C-terminális szubdoménjének meghatározott aminosav pozíciójába, s ezáltal az adott

aminosav nagyon tömör konformációt vesz fel, megakadályozva ezzel, hogy a fehérjelánc felvegye a jellegzetes α -helikális szerkezeti formáját. Ezzel az eljárással a fehérje szerkezetét rigidebbé tették, amely egyben stabilitásának növekedését is eredményezte. Wong és mtsai (1990) módosított szubtilizint nyertek hat helyspecifikus mutációval, és az így előállított enzim 100-szor stabilabb volt a vad típusú enzimhez képest vizes oldatban, valamint 50-szer stabilabb a vad típusnál csaknem vízmentes DMF-ban is. Chen és mtsai (1991) szubtilizint módosítottak random mutagenézissel, ennek eredményeként a 103-as pozícióban lévő Gln \rightarrow Arg-re, míg a 218-as pozícióban lévő Asn \rightarrow Ser-re cserélték. Megállapították, hogy a két mutáció aktivitás növelő és stabilizáló hatása egyenként is érvényesül, és ha együtt van jelen a két mutáció az enzimben, akkor hatásuk összeadódik. Azt tapasztalták, hogy a módosított enzim 10-szer aktívabb volt 20%-os DMF-ban a vad típusú enzimhez képest, és kétszer olyan stabilnak mutatkozott 40%-os DMF-ban, mint a vad típusú enzim.

2.3.2. Stabilizálás kémiai módosítással

A fehérjék *in vivo* poszttranszlációs módosulása - pl. zsírsavak, szénhidrátok hozzákapcsolódása kovalens kötéssel, foszforilálódás, hidroxilálódás stb. - általános jelenség az élővilágban, mely változásoknak meghatározott szerepük van a fehérjék további működése, feladatuk ellátása szempontjából. Az enzimek kémiai módosítása gyakorlatilag a fehérje mikrokörnyezetének módosítását jelenti, mely az enzim felületének, és így módon közvetlen környezetének megváltozása révén kedvezően befolyásolhatja annak tulajdonságait. Az *in vitro* kémiai módosításoknak is éppen az a célja, hogy a fehérjék bizonyos tulajdonságait (pl. stabilitás) kedvező irányban változtassák meg. Az, hogy egy enzim felületének hidrofil-lipofil jellege mennyire van egyensúlyban, befolyásolja annak számos sajátosságát (pl. szubsztrát felismerése és kötése, stabilitás) és ezen keresztül működését.

Az enzimek kémiai módosítása többféleképpen valósítható meg: amfipatikus polimerek (pl. polietilén-glikol) kovalens kötése az enzimhez (Gaertner és Puigserver, 1992; Zhen és mtsai, 1996), illetve egyéb módosítások, mint az ϵ -amino csoportok redukív alkilezése (Ampon és mtsai, 1991; Čerovsky és Jakubke, 1994), glikoproteinek deglikozilálása (Vazquez-Duhalt és mtsai, 1992), zsírsav láncok kötése az enzimhez (Kawasaki és mtsai, 1994) kedvezően befolyásolja szerves oldószerekben való felhasználásukat, hiszen egyrészt növelik az enzimek oldékonyságát, másrészt a kémiaiilag alkalmasan módosított enzimformák nagyobb stabilitást mutatnak szemben a

módosíthatlan enzimformákkal, és ezáltal a szerves oldószerekben katalizált reakciók sebessége és a termékhozam többszörösére emelkedhet. Más esetekben az enzim aktív helyének módosítása, pl. kimotripsinnél a His 57 metilálása (West és mtsai, 1988) vagy szubtilizin esetén az aktív hely szerinjének ciszteinre vagy szeleno-ciszteinre cserélése (Wu és Hilvert, 1989) valójában megváltoztathatja az enzim aktivitását azáltal, hogy más jellegű szubsztrát megkötődését teszi lehetővé, és így a katalizált reakció jellege is megváltozik.

Az enzimek kémiai módosítása történhet szilárd hordozóhoz való kötéssel is. Enzimrögzítéssel sokszor az oldott enzimmnél stabilabb és jobb katalitikus tulajdonságokkal rendelkező enzimkészítményt lehet előállítani (Kotormán és mtsai, 1994; Vértesi és mtsai, 1999). A rögzített enzimek fizikai kölcsönhatás vagy kémiai kötés révén szilárd hordozóhoz kapcsolt vagy a hordozó által körülzárt enzimek, melyek katalitikus aktivitásukat megőrzik (Chibata, 1978). Minden natív fehérje jellemezhető egy speciális szerkezeti résszel, ahol denaturációkor a kitekeredési folyamat ("unfolding") végbemegy. Az enzim akkor stabilizálódik rögzítéssel, ha ezt a kitekeredő régiót blokkolja a hordozó. Így módon az enzimeknek valamilyen szilárd hordozóhoz való kötése gyakran jelentős stabilizálódást vált ki szerves oldószerrel szemben. És ugyanakkor az egyik leggyakoribb módja az enzimek szerves közegbe vitelének a különféle rögzített enzimformák alkalmazása (szilárd hordozón adszorbeáltatott, gélbe zárt, kovalensen rögzített enzimformák stb., Gupta, 1992).

A rögzítés számos előnnyel jár, nevezetesen, hogy a rögzített enzimek ismételten és folyamatos üzemmódban használhatók, jól kontrollálhatók a működtetés körülményei (pH, hőmérséklet), az enzim nem szennyezi a terméket, könnyen kiszűrhető az oldatból, mellékreakciókkal nem kell számolnunk. Számos eljárást dolgoztak ki a rögzített enzimek klinikai- és élelmiszerkémiai analitikai alkalmazására, valamint katalizátorként élelmiszerek, gyógyszerek, vegyszerek előállítására.

Az enzimek rögzítése történhet:

- vízdoldhatatlan hordozóhoz való kapcsolással fizikai adszorpció, ionos kötés vagy kovalens kötés révén
- az enzim molekulák közötti intermolekuláris keresztkötések létrehozásával bi- vagy multifunkciós keresztkötő ágensek felhasználásával
- szemipermeabilis membránnal való körülzárással, üreges szálakba való bezárással vagy szemipermeabilis rácsokba zárással.

A rögzített enzimek tulajdonságai sok tekintetben eltérnek az oldottétól és működésüket egyrészt konformációs és sztérikus, másrészt mikrokörnyezeti hatások befolyásolják. Az enzim rögzítésekor kisebb-nagyobb mértékben megváltozik a fehérje konformációja, s a konformációs és sztérikus változások a keletkezett enzimforma működését alapvetően befolyásolják. Ugyanakkor az enzimek működésére nagy mértékben hatással van az őket körülvevő környezet, amelyben kifejtik katalitikus hatásukat. Oldott enzimek esetében az enzimet körülvevő környezet általában homogén, szemben a rögzített enzimekkel, ahol az enzim nemcsak a folyadék fázissal érintkezik és van az rá hatással, hanem az oldhatatlan hordozó mátrix-szal való kölcsönhatást is figyelembe kell venni. Rögzített enzimek esetében célszerű különbséget tenni az enzim makrokörnyezete (az oldat) és mikrokörnyezete között, mely utóbbi kialakításában magának a hordozónak nagy szerepe van. Az enzim mikrokörnyezete befolyásolja a szubsztrátok és termékek (esetleg aktivátorok, inhibitorok) megoszlását a rendszerben, tehát az enzim közvetlen környezetében is, valamint hatással van a komponensek diffúziójára is. Mindezen tényezők együttesen játszanak szerepet a rögzített enzimek tulajdonságainak kialakításában, működésében és járulnak hozzá ahhoz, hogy olykor az oldott enzimtől eltérő sajátosságú enzimformák keletkeznek (Gloger és Tischer, 1984).

A fizikai adszorpció a legrégebben alkalmazott módszer az enzimek rögzítésére. Az adszorpcióval történő enzimrögzítés alapja, hogy az enzimfehérje adszorbeálódik a nem vízzeloldható hordozó felületéhez. A módszer előnye, hogy egyszerű, az enzimek enyhe körülmények között, könnyen adszorbeálódnak a hordozóhoz s emiatt nagyon gyakran alkalmazzák manapság is ezt a rögzítési formát a szerves oldószeres katalízisekben is (Simon és mtsai, 1990; Barros és mtsai, 1998).

Az ionos kötéssel való rögzítés során az enzimet olyan hordozóhoz kötjük, amelynek ioncserére alkalmas csoportjai vannak. Bizonyos esetekben az ionos kötés mellett az adszorpció is szerepet játszhat a kötésben. Az ionos kötés kialakítása egyszerű, nem igényel erőlyes behatásokat, így általában nagy aktivitással köthetők az enzimek (Chibata, 1978).

Enzimek rögzítésére szolgáló módszer a gélbe polimerizálás is, mikor az enzimet a polimerizáció megindulása előtt a monomer oldatába keverik, így a képződött polimer magába zárja az enzimet. A gél pórusai a kis méretű szubsztrátok és termékek diffúzióját lehetővé teszik, de az enzimet visszatartják (Martinek és mtsai, 1977).

Az enzim szemipermeabilis kapszulába zárása úgy történik, hogy az enzim és egy hidrofíli monomer vizes oldatát emulgeálják egy vízzel nem elegyedő szerves

oldószerben. Majd az emulzióhoz ugyanazon szerves oldószerben oldott hidrofób monomer oldatát adják keverés közben. Mindkét monomer polimerizációja a vizes és a szerves oldószeres fázisok határfelületén megy végbe az emulzióban (Chibata, 1978), s ezzel a technikával az enzim egy polimer membránnal lesz körülvéve és a vizes fázisban helyezkedik el.

Rony (1971) használt először szemipermeábilis szálakat enzimek rögzítésére. Ebben az eljárásban egy olyan emulziót készítenek, amely egy vizes enzimoldatból és egy szerves oldószerben lévő szintetikus polimer oldatból áll (pl. cellulóz acetát vagy polivinil-klorid metilén-kloridban). Az emulziót koaguláltató fürdőbe engedik bele, s ezáltal szálak képződnek, melyekbe bezáródnak az enzimmolekulák (Goldstein és Manecke, 1976). A szálak nagy felületűek, folyamatos működést tesznek lehetővé.

Enzimek rögzíthetők oly módon is, hogy bi- vagy multifunkciós reagensekkel keresztkötéseket alakítanak ki az enzimmolekulák között. Rögzítésre számos bi- vagy multifunkciós vegyület (pl. toluol-2,4-diizocianát, diazobenzidin és származékai) felhasználható, de leggyakrabban glutáraldehidet alkalmaznak (Fischer és mtsai, (1980)).

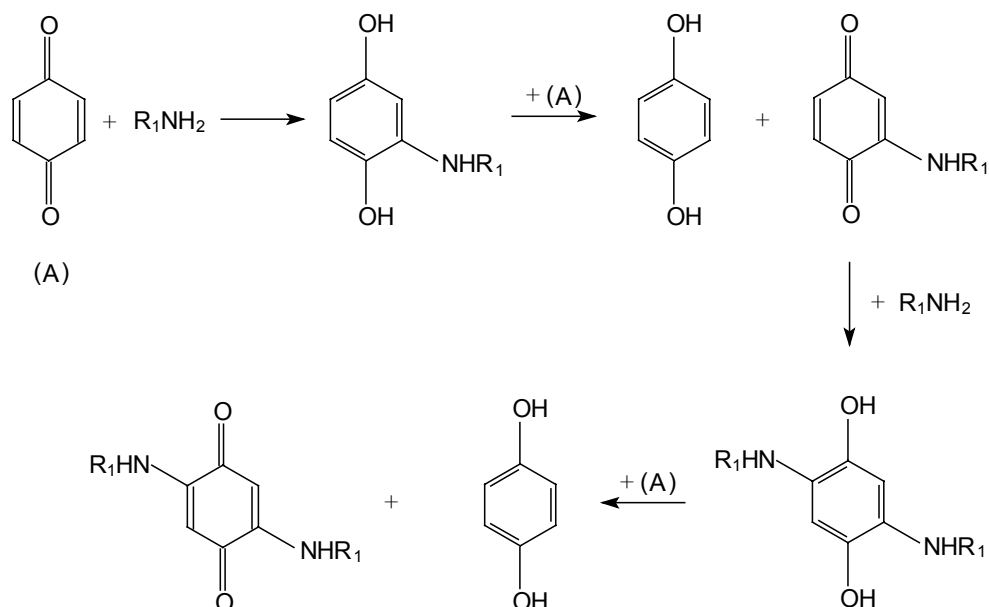
Az enzimek rögzítésére leggyakrabban alkalmazott módszer a kovalens kötéssel való rögzítés. Elsőként az immunológusok használták 1936-ban (Landsteiner és van der Scheer, 1936). Azóta számos új kovalens rögzítési eljárást dolgoztak ki. A módszer előnye, hogy a hordozó és az enzim között erős kémiai kötés jön létre, így a környezeti tényezők (hőmérséklet, pH, ionerősség) megváltoztatására nem következik be leoldódás. Hátránya azonban, hogy viszonylag bonyolult, s a kötéshez használt kémiai reagensek hatására az enzimek jelentősen inaktíválódhatnak, mivel a kötésben az aktív centrum aminosav-oldalláncai is részt vehetnek. A kémiai módosulás eredményeként számolni kell az enzim térszerkezetének, a szubsztrát hozzáférhetőségének megváltoztatásával. A kovalensen kötött enzimek katalitikus és stabilitási tulajdonságai lényegesen eltérhetnek az oldott enzimétől. Célszerű olyan hordozókat választani, amelyek az aktivitás szempontjából fontos aminosav-oldallancokkal nem reagálnak (dextrán, szintetikus polimerek).

A kovalens rögzítések során felhasználható hordozók természetes és szintetikus alapúak lehetnek. Természetes alapú hordozók pl. agaróz (Sephrose), cellulóz származékok, dextrán (Sephadex), üveg, keményítő stb. Szintetikus hordozók pl. akrilamid (Akrilex), maleinsavanhidrid, metakrilsav, polipeptid, polisztrének. A szintetikus hordozók alkalmazásának nagy előnye a természetes alapúakkal szemben,

hogy nem támadják meg a mikroorganizmusok. A kovalens rögzítésre leggyakrabban használt reakciók: acilálás, arilezés és alkilezés, brómcianos reakció, karbamoilálás és tiokarbamoilálás, glutáraldehides kapcsolás, diazotálás, polimer aldehidekkel való reakció, kondenzáció stb. A továbbiakban az általunk használt eljárásokat ismertetjük részletesebben.

2.3.2.1. Kovalens rögzítési eljárások

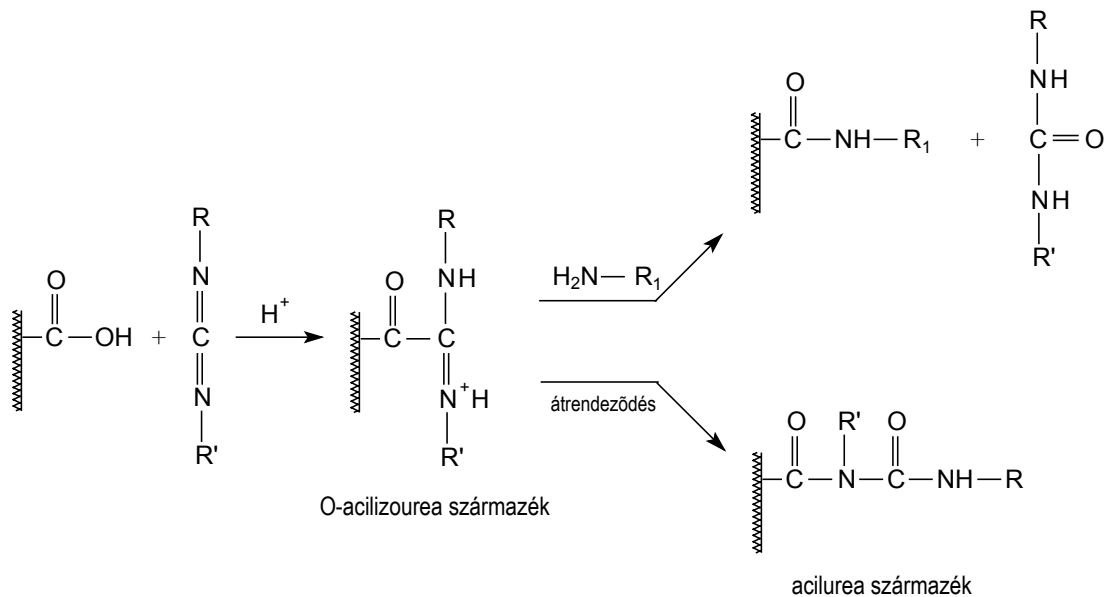
Számos próbálkozás történt az amidsoport aktiválására (Weston és Avrameas, 1971; Inman, 1974). Brandt és mtsai (1975) Sepharose 4B gélt aktiváltak p-benzokinonnal. Poliakrilamid típusú gélek is aktiválhatók p-benzokinonnal (Kálmán és mtsai, 1983). A p-benzokinon aminosokkal való reakciója ismert (Krishna és mtsai, 1985) 1,4-addíció (6.ábra), amely oxidációval is együtt jár.



6. ábra. Poliakrilamid típusú gélek aktiválása p-benzokinonnal.

Első lépésben az enzimmolekula aminosocportján keresztül kapcsolódik a p-benzokinonhoz, ezzel létrejön egy 2-helyzetben szubsztituált p-benzokinon. A következő lépésben a szabad p-benzokinon egy része hidrokinná alakul, majd ez lép reakcióba az egyszeresen szubsztituált p-benzokinonnal újabb enzimmolekula jelenlétében. Ekkor létrejön az 2,5-helyzetben diszubsztituált 1,4-hidrokinn, ami tovább oxidálódik 2,5-diszubsztituált p-benzokinonná. A végén a még hidrokinn formák visszanyerik kinoidális szerkezetüket.

Mattiasson és Mosbach (1971) karboxil csoportot tartalmazó gélek aktiválására vízdékony karbodiimideket használtak. A karboxil-csoportok aktiválására leggyakrabban 1-ciklohexil-3(2-morfolinoetil) karbodiimid metil-p-toluol szulfonátot (CMC) és 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)-karbodiimidet (EDC) használnak (Wiseman, 1975). Savas pH-n (pH 4,75-5,0) először a hordozó karboxil funkciós csoportja és a karbodiimid C-atomja között kialakul egy kovalens kötés, létrehozva ezzel egy O-acilizourea származékot (7.ábra).



7. ábra. Karboxil csoporttal rendelkező hordozó aktiválása karbodiimiddel.

Ez a reaktív intermedier kétféle módon tud továbbalakulni. Egyrészt az enzimek aminocsoportjaival reagálva amidkötéseket hoznak létre, ezáltal rögzül az enzim a hordozóhoz. Másrészt egy molekulán belüli átrendeződés mehet végbe, melynek eredménye egy acilurea származék. Az aktivált karboxil csoport más nukleofil csoportokkal (-OH, -SH) is reakcióba léphet (Goldstein és Manecke, 1976). A módszer hátránya, hogy az enzim felületén lévő karboxil funkciós csoportok is módosulhatnak. A karbodiimides aktiválás lehet egy- vagy kétlépcsős attól függően, hogy az illető enzim érzékeny-e a karbodiimidre (pl. karboxipeptidáz A) vagy sem (pl. kimotripszin). Az egylépcsős megoldásban minden alkotóelem egyszerre van jelen (enzim, karbodiimid, hordozó). A kétlépcsős megoldásban először a hordozót aktiválják a karbodiimiddel az enzim jelenléte nélkül, majd az aktiválószer felesleget kimossák a rendszerből, és csak ezután adják hozzá az enzimet. Rögzítéseink során az egylépcsős aktiválást alkalmaztuk, lévén, hogy a kimotripszin nem érzékeny a karbodiimidre.

2.3.2.2. Rögzített kimotripszin előállítása és alkalmazása vizes közegben

Martinek és mtsai (1977) az α -kimotripszint polimetakrilát és poliakrilamid gélekbe zárták és azt vizsgálták, hogy milyen hatással van a rögzítés az enzim stabilitására. A polimetakrilát gélbe zárással előállított rögzített kimotripszin relatív katalitikus aktivitása a natív enzimének 30-40%-a volt. Az aktivitás csökkenést az enzim mikrokörnyezetében a rögzítés következtében végbemenő változással magyarázták. A kimotripszin poliakrilamid gélbe zárását kétféle módszerrel is elvégezték. A poliakrilamid gélbe zárt kimotripszin relatív katalitikus aktivitása majdnem megegyezett a natív enzim aktivitásával. A kísérletek azt mutatták továbbá, hogy a gélbe zárt enzim hőstabilitása jóval nagyobb, mint az oldott enzimé.

Fischer és mtsai (1980) a kimotripszint s-trikloro-triazinnal aktivált γ -aminopropil-szilikához (TAP-szilika-kimotripszin) és N-hidroxi-szukcinimid észteren keresztül szukcinamidopropil-szilikához (SuAP-szilika-kimotripszin) kötötték. További szilika-kimotripszin származékot nyertek a kimotripszinnek szubsztituálatlan szilikán való adszorpciójával, majd ezt követően az enzim glutáraldehides keresztkötésével (szilika-kimotripszin). Ezenkívül keresztkötött poliakrilamidhoz azid-csoportokon keresztül kötődő rögzített kimotripszint is előállítottak (PA-kimotripszin). Összehasonlították a rögzített enzimformákat a kötődött aktivitás és fehérje szempontjából és a következőket tapasztalták: a legnagyobb aktivitással a PA-kimotripszin kötődött (95%), míg a legkisebbel a TAP-szilika-kimotripszin (20%). A kötődött fehérje szempontjából nem voltak ilyen nagy eltérések, mindegyik rögzített enzimformánál kb. 40-50 mg g⁻¹ száraz hordozó eredményeket kaptak.

Liu és mtsai (1993) a kimotripszint poli-(N-izopropilakrilamid-N-akriloxiszukcinimid) (PNN) aktív észter kopolimerhez kötötték, etiléndiamin keresztkötő ágens felhasználásával. Kétféle módon rögzítették az enzimet: az 'A' módszer során a PNN-oldathoz kimotripszin oldatot adtak, majd adott idejű keverés után adták a rendszerhez a keresztkötő oldatot. A 'B' módszerben a keresztkötő ágenszt a PNN-oldathoz az enzim oldat hozzáadása előtt keverték. A rögzítési módszernek hatása van az enzim aktivitására, ugyanis a rögzített kimotripszin relatív aktivitása nagyobb volt az 'A' rögzítés során, mint a 'B'-ben.

Ulbrich-Hofmann és mtsai (1993) a rögzített enzimek inaktiválódását vizsgálták spin- és fluoreszcencia jelölési módszerekkel. Tripszint és kimotripszint szilikához, polisztirolhoz, poliakrilamid hordozóhoz kötöttek és azt figyelték meg, hogy valamennyi esetben ha rögzítéskor a fehérje szerkezet stabilizálódott az enzimek

kétlépcsős inaktiválódást mutattak, szemben az oldott enzimmel, mely elsőrendű kinetika szerint inaktiválódott. Ha a rögzítés nem stabilizálta a fehérjeszerkezetet, akkor a rögzített enzim is elsőrendű kinetikát mutatott inaktiválódása során. Megállapították továbbá, hogy az enzimmolekulák katalitikus aktivitása nem változott rögzítés után.

Alcántara és mtsai (1993) stabilizálási céllal α -kimotripsint két különböző akril-típusú, mikrogél (M1 és M2) hordozóhoz kötöttek kétféle módszerrel. A két mikrogél különböző csoportokkal rendelkezett, melyek az M1-gél esetén karboxil- és karboxietil-, az M2-gél esetében pedig 3-klór-benzil csoportok voltak. A kapott származékok aktivitását és stabilitását tesztelték N-benzoil-L-Tyr-p-nitrofenil-amid mint szintetikus szubsztrát segítségével. M1-gél alkalmazásakor a rögzített enzim nagyobb hidrolitikus aktivitást mutatott, mint a natív enzim, azonban az M2-gélhez rögzített enzimszármazékkal a natív enzimhez képest kisebb mértékű volt a hidrolízis. Mindezeket mindkét származék esetén a rögzített enzim eltérő mikro környezetével magyarázták. Stabilitásvizsgálataik arra az eredményre vezettek, hogy az M2-származék stabilabb volt, mint az M1.

Norde és Zoungrana (1998) α -kimotripsint rögzítettek adszorpcióval különféle vízmegkötő képességű és morfológiájú hordozókhoz (teflon, polisztirol, szilika) és tanulmányozták a rögzített enzim aktivitását és szerkezeti stabilitását. Azt tapasztalták, hogy az adszorpcióra való képesség nagyobb volt hidrofób felületek (teflon, polisztirol) alkalmazásakor. Ha a szorbens felületén vízdoldható, flexibilis oligomerek vannak (pl. etilén-oxid), ezek csökkentik a fehérjék adszorpció készségét. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával ki tudták mutatni, hogy az adszorpció következtében bizonyos szerkezeti változások mehetnek végbe az enzimben. A torzulások mértéke csökkent a szorbens felületének csökkenő hidrofóbicitásával, az adott felület enzimmel való telítettségének növekedésével és a szorbens felületén lévő vízdoldható oligomerek jelenlétével.

2.3.2.3. Rögzített kimotripszin alkalmazása szerves oldószeres közegben

Turková és mtsai (1982) α -kimotripsint rögzítettek adszorpcióval polietilén tereftalát hordozóhoz (Sorsilen), hogy az enzim szintetikus aktivitását tanulmányozzák szerves oldószeres közegben. A hordozóhoz való rögzítés nagy mértékben függött a pH-tól, alacsony pH-n (pH 4,0) sokkal nagyobb volt a kötődés mértéke (18 mg fehérje g⁻¹ hordozó), mint magasabb pH-n (pH 9,5, kötődött fehérje: 5 mg g⁻¹ hordozó).

Trezil-kloriddal aktivált agaróz gélre (Sepharose) kovalensen kötött α -kimotripszint Nilsson és Mosbach (1984). Az aktiválószer mennyiségének növelésével a kötődött fehérje mennyisége kissé emelkedett, azonban csaknem háromszoros mennyiségű aktiválószer hozzáadásával mindössze kb. 10%-kal növekedett a kötődött kimotripszin mennyisége (78 mg g^{-1} száraz gél), miközben ezzel párhuzamosan a kötődött aktivitás csökkent. A rögzítéssel nyert enzimet peptidszintézisre használták fel szerves oldószerben.

Mások kitin hordozóra rögzített kimotripszinnel végeztek szintetikus reakciókat szerves oldószeres közegben (Kise és mtsai, 1987). Összehasonlították az oldott és a rögzített enzimek katalitikus tulajdonságait. Megállapították, hogy a rögzített enzimforma alkalmazásával sokkal nagyobb észterhozamot tudtak elérni ugyanannyi idő alatt (80-85% észter 12 óra alatt), mint oldott enzimmel (20% észter 12 óra alatt). Megvizsgálták azt is, hogy az enzim milyen hatékonysággal rögzül a hordozóra és azt találták, hogy fél óra alatt a kimotripszin 90%-a kötődött a kitinre, és a leoldódás jelentéktelen mértékű volt még 24 óra eltelte után is. Erre alapozták azt a megfigyelést, hogy a rögzített enzim nagyobb katalitikus aktivitást mutatott, mint az oldott. Összehasonlították továbbá különböző hordozók hatását is, és ehhez a kimotripszint 3 különféle Sephadex hordozóra és egy cellulóz alapú hordozóra rögzítették. A vizsgált észterhozam a legmagasabb a kitinre kötött enzimmel volt (38%), míg a legkisebb a DEAE-Sephadexre és a cellulózra rögzített kimotripszinnel (1-2%).

Mori és mtsai (1987) az α -kimotripszint Sephadex LH-20-ra adszorbeáltatták, vagy trezil kloriddal aktivált Sepharose 4B-hez kovalensen rögzítették. Az így előállított enzimformákkal az N-acetil-L-Tyr etil észter szintézisét vizsgálták szerves közegben. A kapott rögzített enzimek hatásos katalizátornak bizonyultak a vizsgált reakcióban. Azt tapasztalták, hogy a rögzített enzimformák kezdeti aktivitásuknak 60%-át megőrizték 6 nap működés után is ciklohexán-etanol elegyben.

Adlercreutz (1991) az α -kimotripszint különböző porózus anyagokon (Accurel PA6, hexil-CPG, glükóz-CPG, Celit) rögzítette, és az N-acetil-L-Phe etilészter 1-butanollal végrehajtott alkoholízisét vizsgálta. Megállapította, hogy a Celit volt az egyik legjobb hordozó, viszont az etilészternek csak kb. egyharmada alakult át butilészterré, a többi hidrolizálódott. Accurel PA6 poliamid hordozóval az alkoholízis volt a domináló reakció és alacsony vízaktivitásnál a hidrolízis teljesen visszaszorítható, mialatt a jelentős alkoholitikus aktivitás továbbra is fennmarad. CPG (kontrollált pórusú üveg) hexil- vagy glükozil-csoportokkal képzett származékai nagyon különböző

sajátságokkal rendelkeznek. Az α -kimotripszin katalizálta reakciókban a glükóz-CPG-n a hidrolízis, a hexil-CPG-n az alkoholízis volt a domináló reakció. A vizsgált hordozókat szerves közegű enzimátikus reakciókban is felhasználták. A szintézisek tekintetében a hordozó vízmegkötő képessége fontos paraméternek bizonyult. A Celit csak kis mennyiségű, a CPG származékai viszont jelentékeny mennyiségű vizet kötöttek meg. Az Accurel PA6 poliamid hordozó adszorbeálta a legtöbb vizet a vizsgált hordozók közül.

Heras és mtsai (1992) α -kimotripszint rögzítettek különböző hordozókhoz (trezil-kloriddal aktivált Sepharose 4B, tozil-kloriddal aktivált Sepharose 6B, glutáraldehiddel aktivált kitin) és az így kapott enzimkészítmények katalitikus aktivitásait vizsgálták vizes-szerves oldószeres rendszerekben (butándiol, DMF, THF, acetonitril). A legnagyobb mennyiségű fehérje a kitin esetében kötődött (96%), míg a tozil-kloriddal aktivált Sepharose 6B hordozóra rögzült a legkevesebb enzim (36%). Viszont a glutáraldehydes rögzítés több ponton kötött enzimet képes létrehozni, így kevésbé aktív enzimforma jöhet létre, s így ennek megfelelően a három rögzített enzimforma közül a kitin-kimotripszin hidrolitikus aktivitása volt a legkisebb ($0,01 \text{ U mg}^{-1}$ hordozó), a Sepharose-kötött enzimek között pedig csak kis különbséget tapasztaltak ($0,17\text{-}0,2 \text{ U mg}^{-1}$ hordozó). Az eltéréseket a hordozók eltérő vízmegkötő képességével magyarázták.

2.3.3. Stabilizálás additívek hozzáadásával

Bizonyos anyagok, pl. polihidroxi vegyületek (poliolok, cukrok), sók és egyéb polimerek adásával jelentősen növelni lehet az enzimek stabilitását az enzimek mikrokozonyezetének módosítása révén (Gray, 1988; Yamane és mtsai, 1990; Lozano és mtsai, 1994). Az additívek hatása molekuláris szinten nem ismert. Feltehetőleg által fejtenek ki hatást az enzimaktivításra, hogy befolyásolják a víz megoszlását a fehérjemolekulák közvetlen környezetében (Ulbrich-Hofmann és mtsai, 1995; Timasheff, 1998). Számos irodalmi adat van arra vonatkozóan, hogy milyen hatást gyakorolnak a polihidroxi vegyületek vizes közegben az oldott enzim katalitikus aktivitására és hőstabilitására. A vizsgálatok a legkülönbélebb enzimekre és additívekre terjedtek ki. Back és mtsai (1979) ovalbumin, lizozim és α -kimotripszinogén hőstabilitását tanulmányozták és megállapították, hogy cukrok és poliolk stabilizálják a fehérjéket a hődenaturációval szemben. Additívek alkalmazásával a denaturálási hőmérséklet emelkedett. Mejri és mtsai (1998) és Mejri és Mathlouthi (2001)

termolizin, valamint pullulanáz és inulináz, Pourplanche és mtsai (1992) lipoxigenáz és termolizin katalitikus aktivitását vizsgálták különböző additívek (pl. glicerin, maltóz, mannit, szorbit, szacharóz, glicerin) jelenlétében. Combes (1992) lizozim, glükóz oxidáz, invertáz és α -amiláz enzimek hőstabilitását, Athès és Combes (1998) *Kluyveromyces lactis* β -galaktozidáz enzim nyomással és hővel szembeni stabilitását tanulmányozták polihidroxi alkoholok (pl. eritrit, xilit, glicerin stb.), valamint alkáli halidok (pl. KCl, NaBr stb.) jelenlétében. Megállapították, hogy a poliolkok védő hatása lényegesen nagyobb volt, mint a sóké és glicerin < szorbit < eritrit < xilit sorrendben nő a stabilizáló hatás. Poliolkok és N-acetil-L-Tyr etil észter, mint szintetikus szubsztrát hatását tanulmányozták Lozano és mtsai (1994) α -kimotripszin hőstabilitására, valamint vizsgálták az enzim stabilizálódásának kinetikáját. Wehtje és mtsai (1992) kimotripsint, lipázt és mandelonitril liázt kötöttek különböző hordozókra (többféle kontrollált pórusú üvegre, Celitre) és különféle additívek (albumin, zselatin, tripton, polietilén glikol, szorbit, arabit, dextrán, keményítő, kazein, pepton, glicin és prolin) hatását tanulmányozták a rögzített enzimekre. Megállapították, hogy az additívek megakadályozták az enzimaktivitás veszteséget a rögzítés során. Stabilizáló hatást tapasztaltak az albuminnal, kazeinnel, zselatinnal, triptonnal és peptonnal, valamint polietilén glikollal. Sem a poliszacharidok, sem a monomer szénhidrátok, illetve aminosavak nem fejtettek ki stabilizáló hatást ezekre az enzimekre. Az additívek stabilizáló hatása enzimenként más és más, és nagymértékben függ az additív természetétől és koncentrációjától is.

Tanulmányozták ezeknek az anyagoknak különböző enzimekre kifejtett stabilizáló hatását szerves közegben is úgy, hogy az enzimrögzítéseket, illetve a különböző enzimkészítmények előállítását a fentebb említett additívek jelenlétében hajtották végre (ko-immobilizálás, ko-liofilizálás). Kovalensen rögzített *Mucor miehei* lipáz lipolitikus aktivitásának javítása érdekében különböző additívek hatását vizsgálták Rocha és mtsai (1998). Polietilén glikolt, glutáraldehidet, szerves oldószereket és puffereket adtak a rendszerhez rögzítés során és azt tapasztalták, hogy kis mennyiségű polietilén glikol és glutáraldehid hozzáadása során az aktivitás 40-100%-kal megnövekedett a rögzítést követően.

Poláros additívek (poliolkok, szacharidok) jelenlétében, illetve azok nélkül rögzített adszorpcióval Celitre kimotripsint és alkohol dehidrogenázt Adlercreutz (1993) és diizopropil éterben vizsgálta a kapott enzimpreparátumok katalitikus aktivitásait. Azt tapasztalta, hogy, az additívek jelentősen növelték az enzimek

katalitikus aktivitását. A kimotripszin számára a szorbit bizonyult a legjobb additívnek, mellyel az alkoholízis sebessége tízszeresére a hidrolízisé kétszeresére növekedett. Az alkohol-dehidrogenáz esetében a glükóz volt a legjobb additív, itt is a reakciósebesség több mint tízszeresére nőtt ahhoz képest, amikor additív nélkül történt a rögzítés.

Öste-Triantafyllou és mtsai (1997) megfigyelték, hogy a Celitre rögzített kimotripszin aktivitása nőtt, amikor az enzimet szorbittal ko-immobilizálták. Megállapították továbbá, hogy az enzim katalitikus aktivitása (peptidszintézis és átészteresítés) 4-8-szorosára növekedett, ha növekvő mennyiségben pufferekkel, illetve nátrium kloridot adtak az enzimhez rögzítés során.

Nordvi és Holmsen (1992) gélbe zárt lipáz stabilitását vizsgálták n-hexánban oly módon, hogy polihidroxi vegyületeket (szorbit, keményítő, glükóz, cellulóz, nem-ionos detergensok) adtak az enzimhez, mielőtt a gélbe zárták volna. A különböző detergensok jelentősen megnövelték a lipáz aktivitását, különösen nagy mértékű (15-szörös) emelkedés volt tapasztalható Span 60 nevű nem-ionos felületaktív anyaggal, melyben a szorbitán gyűrűt sztearinsav észteresíti. Azt találták, hogy a szénhidrátok mindegyike 1,5-2-szeres aktivitás növekedést okozott, míg a szorbit volt a leghatékonyabb stabilizáló ágens, mely kb. 6-szoros aktivitás emelkedést eredményezett.

Dong és mtsai (1996) szerves oldószeres közegbe helyezett enzimek másodlagos szerkezetét vizsgálták infravörös spektroszkópiával. Az α -kimotripszint és szubtilizint liofilizálták szorbit és trehalóz jelenlétében és azt tapasztalták, hogy a fehérje szerkezete így sokkal jobban hasonlít a natív szerkezetre, mint amikor additívek jelenléte nélkül liofilizálták. Ha ezt követően az enzimet szerves oldószerekbe (etanol, hexán, piridin) tették, az IR spektrum jelentősen megváltozott, jelezve, hogy a szerkezet erősen torzult. Ez a hatás piridinben volt a legkifejezettebb. Megállapították, hogy az additívek stabilizáló hatása abban nyilvánult meg, hogy megakadályozták a fehérjék liofilizálás indukálta "unfolding"-ját.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. ANYAGOK

A szarvasmarha pankreász α -kimotripszin enzimet (E.C. 3.4.21.1. type II; specifikus aktivitás 50 U mg^{-1}) a Sigma-Aldrich Kft-től (Budapest) szereztük be. Az N-acetil-L-tirozin (AT), N-acetil-L-tirozin etil észter (ATEE) szubsztrátokat, az 1-ciklohexil-3-(2-morfolinoetil)karbodiimid meto-p-toluol-szulfonát aktiválószer, valamint a polietilén glikol 8 000-t és a dimetil szulfoxidot szintén a Sigma-Aldrich Kft-től (Budapest) vásároltuk.

Az Akrilex C-100 poliakrilamid gyöngypolimer hordozót (részecskeméret $40\text{-}120 \mu\text{m}$, karboxil tartalom 4 mmol g^{-1} xerogél) és az Akrilex P-100 poliakrilamid hordozót (részecskeméret $120\text{-}320 \mu\text{m}$) a Reanal Kft-től (Budapest) szereztük be. A p-benzokinon, D-szorbit, D-glükóz, laktóz, a következő oldószerek: metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-oktanol, 1,4-dioxán, aceton, acetonitril, toluol, etilacetát, kloroform, széntetraklorid, dietil-éter, tetrahidrofurán, N,N'-dimetilformamid, valamint az egyéb vegyszerek (pl. pufferek) a Reanal Kft. (Budapest) termékei voltak.

A p-benzokinonnal aktivált Szilokróom hordozót (funkciós csoportok száma $37 \mu\text{mol g}^{-1}$ száraz tömeg, átlagos pórus méret 50 nm , részecskeméret $0,1\text{-}0,25 \text{ mm}$) az NPO Biolar cégtől (Riga-Olaine, Lettország), a Karl Fischer reagenst a víztartalom meghatározásához a Carlo Erba cégtől (Budapest) vásároltuk. Az 1-hexanol, 1-nonanol a Fluka (Budapest), az 1-heptanol, a Folin-Ciocalteu reagens és a Szilikagél 60 F₂₅₄ vékonyréteg lapok a Merck Kft. (Budapest) termékei voltak.

3.2. MÓDSZEREK

3.2.1. Az α -kimotripszin rögzítése

3.2.1.1. Kimotripszin rögzítése Akrilex C-100-hoz

50 mg száraz gélt $0,05 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pufferben (továbbiakban 'foszfát puffer') duzzasztottunk, majd $3 \times 10 \text{ mL}$ $0,05 \text{ M}$ foszfát pufferben (pH 6,0) mostunk. 1-ciklohexil-3-(2-morfolinoetil)karbodiimid meto-p-toluil-szulfonátból 50 mg -ot feloldottunk 2 mL hideg $0,05 \text{ M}$ foszfát pufferben (pH 6,0), majd a mosott és kevés foszfát pufferben szuszpendált gélhez adtuk folyamatos, 10 percig tartó keverés mellett. Ezután $5\text{-}10 \text{ mg}$ enzimet ($250\text{-}500 \text{ U}$) feloldottunk 2 mL foszfát pufferben (pH 6,0) és a gélhez adtuk (Szajáni és mtsai, 1980). Az így kapott szuszpenziót 4°C -on 24 órán át kevertettük. A gélt ezt követően leszűrtük, majd mostuk $3 \times 10 \text{ mL}$ $0,05 \text{ M}$ foszfát

pufferrel (pH 6,0), 3x10 mL foszfát pufferrel, amely 1 M NaCl-t is tartalmazott (pH 6,0), végül 3x10 mL 0,05 M foszfát pufferrel (pH 7,5). A gélt ez utóbbi pufferben tároltuk a felhasználásig.

3.2.1.2. Kimotripszin rögzítése Akrilex P-100-hoz

A gél aktiválása: A rögzítést megelőzően az Akrilex P-100 hordozót aktiválni kell, melyhez 100 mg száraz gélt 4 mL 0,1 M foszfát pufferben (pH 8,0) szuszpendáltunk, majd 1 mL 0,1 M p-benzokinon oldatot adtunk hozzá, melyet 20%-os dioxánban készítettünk el (Kálmán és mtsai, 1983). A gélt 24 óráig aktiváltuk 50°C-on, majd ezt követően 3x10 mL 20% dioxánt tartalmazó desztillált vízzel átmostuk, hogy a p-benzokinon felesleget eltávolítsuk. Ezután a gélt mostuk 3x10 mL 0,1 M acetát pufferrel (pH 4,0), 3x10 mL ugyanezen pufferrel, amely 1 M NaCl-t is tartalmazott és végül 3x10 mL 0,1 M foszfát pufferrel (pH 7,5).

Az enzim rögzítése: 100 mg aktivált gélt szuszpendáltunk 4 mL 0,05 M foszfát pufferben (pH 6,0), amely 12-16 mg (600-800 U) enzimet tartalmazott. A kötési idő 24 óra volt 4°C-on. A rögzítés befejezésével a gélt mostuk 3x10 mL 0,1 M foszfát pufferrel (pH 8,0), 3x10 mL 1 M NaCl-t tartalmazó foszfát pufferrel (pH 8,0), és végül 0,05 M foszfát pufferrel (pH 7,5).

3.2.1.3. Kimotripszin rögzítése p-benzokinonnal aktivált Szilokrómhoz

500 mg hordozót mostunk 0,05 M foszfát pufferben (pH 7,5). Ezt követően 5 mL 0,05 M foszfát pufferben (pH 7,5) oldott α -kimotripszint (9 mg mL^{-1}) adtunk hozzá és az oldatot kevertettük 4°C-on 24 óráig (Vértesi és mtsai, 1999). Ezután a gélt leszűrtük, majd mostuk 3x5 mL kötőpufferrel, 3x5 mL 0,05 M foszfát pufferrel (pH 7,5), amely 0,5 M NaCl-t tartalmazott és végül 3x5 mL 0,05 M Tris/HCl pufferrel (pH 7,5). A gélt ebben a pufferben tároltuk a felhasználásig.

3.2.2. Az oldatok fehérjetartalmának meghatározása

Lowry és mtsai (1951) szerint a Folin-Ciocalteu reagens lúgos közegben kék színreakciót ad a fehérjékkel, mely oldat spektrofotometriás meghatározása 750 nm hullámhossznál végezhető. Az oldatok fehérjetartalmát szarvasmarha szérumból készített, ismert koncentrációjú oldatsor alapján felvett kalibrációs egyenes segítségével határoztuk meg. A rögzített fehérje mennyiségét indirekt módon határoztuk

meg a reakcióelegybe bevitt és a mosó oldatokból visszamért fehérje mennyiségének különbségeként.

3.2.3. Az α -kimotripszin aktivitásának mérése

Az α -kimotripszin aktivitás méréséhez N-acetil-L-tirozin etil észter (ATEE) szintetikus szubsztrátot használtunk és fotometriás úton követtük nyomon az abszorpció csökkenését 237 nm-en (Schwert és Takenaka, 1955). A reakcióelegy (3 mL) összetétele a következő volt: 0,05 M kálium foszfát puffer (pH 7,0) és 1 mM ATEE. A reakciót 20-200 μ L oldott vagy rögzített enzimmel indítottuk (1-5 U). 1 enzimegység megfelel annak az enzim mennyiségnek, amely percenként 1 μ mol ATEE hidrolízisét katalizálja pH 7,0-en és 25°C-on.

3.2.4. Stabilitásmérések

Az enzim stabilitását 10-90 térfogat% szerves oldószert tartalmazó 0,05 M kálium foszfát pufferben (pH 7,0) vizsgáltuk. A disszertációban a reakcióelegyek esetében megadott szerves oldószer %-ok térfogat%-ot jelentenek. Oldott enzim esetén az enzim koncentrációja az inkubálási elegyekben 1 mg mL⁻¹ volt. Rögzített enzimből 5-15 enzimegységet, valamint a különböző koncentrációjú additívekből különböző mennyiségeket mértünk a reakcióelegyekbe. A mintákat 60 vagy 120 percig inkubáltuk 25°C-on és adott időpillanatokban mintákat vettünk, majd a minták aktivitásait spektrofotometriásan határoztuk meg.

3.2.5. Észter szintézisek és értékelésük

A direkt észterszintézisekhez és az átészteresítésekhez alkalmazott standard reakcióelegyek (5,125 mL) összetétele a következő volt: 0,05 mmol N-acetil-L-tirozin vagy N-acetil-L-tirozin etil észter, 0,5 mL alkohol, 4,5 mL oldószer, 0,5 mg mL⁻¹ 0,05 M kálium-foszfát pufferben (pH 7,0) elkészített enzimoldat. A reakcióelegyeket 30°C-on 24 órán át inkubáltuk, közben mágneses keverőn kevertettük őket (450 rpm). A reakciókat jól záródó üvegedényekben hajtottuk végre, hogy elkerüljük az oldószerek párolgását. Különböző időközönként (3, 6, 9 és 24 óra) mintákat vettünk a reakcióelegyekből, majd ezt követően a mintákat analizáltuk. Az N-acetil-L-tirozin alkil észterek mennyiségét vékonyréteg kromatográfia és a Gelbase Pro&Gelbase/Gelblot (UVP/Ultra Violet Products) számítógépes program segítségével analizáltuk. A

vékonyréteg kromatográfiához aktivált fluoreszkáló szilikagél lemezeket használtunk (F₂₅₄), a futtatóelegy pedig 1-butanol:jégecet:víz (4:1:1) volt.

3.2.6. A víztartalom meghatározása

A reakcióelegyek víztartalmának meghatározását Fischer (1935) jodometriás módszerével végeztük el. A módszer szerint vízmentes metanolban oldott SO₂ és I₂ nem reagál egymással, azonban ha az oldathoz vizet adunk, a következő egyensúly áll be:



A reakció teljesen jobbra tolható el, ha vízmentes piridint adunk a rendszerhez, ugyanis a piridin bázisként a jobb oldalon szereplő erős savakat megköti.

A vízmentes piridint tartalmazó reagens vízártékének meghatározása után meghatározható az egyes reakcióelegyek víztartalma. A reagens vízártéke megadja, hogy annak 1 mL-e hány mg vizet mér és értékét abszolút metanol, valamint egy vizes metanol beállító oldat 1-1 mL-ének titrálásakor kapott reagensfogyások segítségével számolhatjuk ki. A egyes reakcióelegyek 1 mL-ére eső reagensfogyásból a reagens vízártékének segítségével megadható a reakcióelegyek víztartalma.

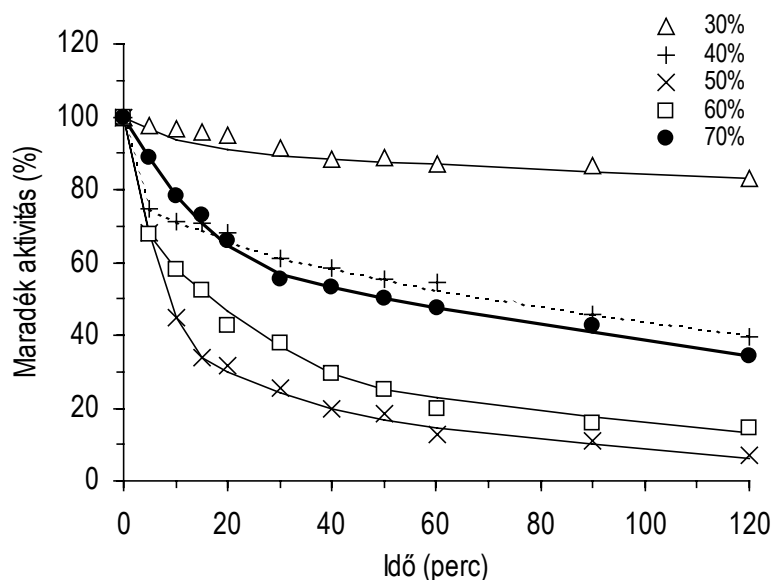
4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

4.1. AZ OLDOTT KIMOTRIPSZIN STABILITÁSA SZERVES OLDÓSZERES KÖZEGBEN

A szerves oldószerek alkalmazásakor felvetődik annak a lehetősége, hogy az oldószer kedvezőtlenül befolyásolja az enzim szerkezetét, s ezen keresztül annak katalitikus aktivitását és stabilitását. Előfordulhat, hogy a választott oldószerben az enzim gyorsan inaktíválódik, vagy a vizsgálni kívánt reakció nem zajlik le, esetleg egyéb tényezők befolyásolják hátrányosan a rendszer összetevőit. Az egyes enzimek gyakorlati alkalmazása, felhasználása előtt tehát mindig érdemes megvizsgálni az enzim stabilitását az alkalmazni kívánt közegben. Ezért elsőként az α -kimotripszin stabilitását tanulmányoztuk különböző vízzel elegyedő és vízzel nem elegyedő szerves oldószerekben a későbbi szintézisekre való felhasználás céljából.

4.1.1. Vízzel elegyedő szerves oldószerek hatása az enzim aktivitására

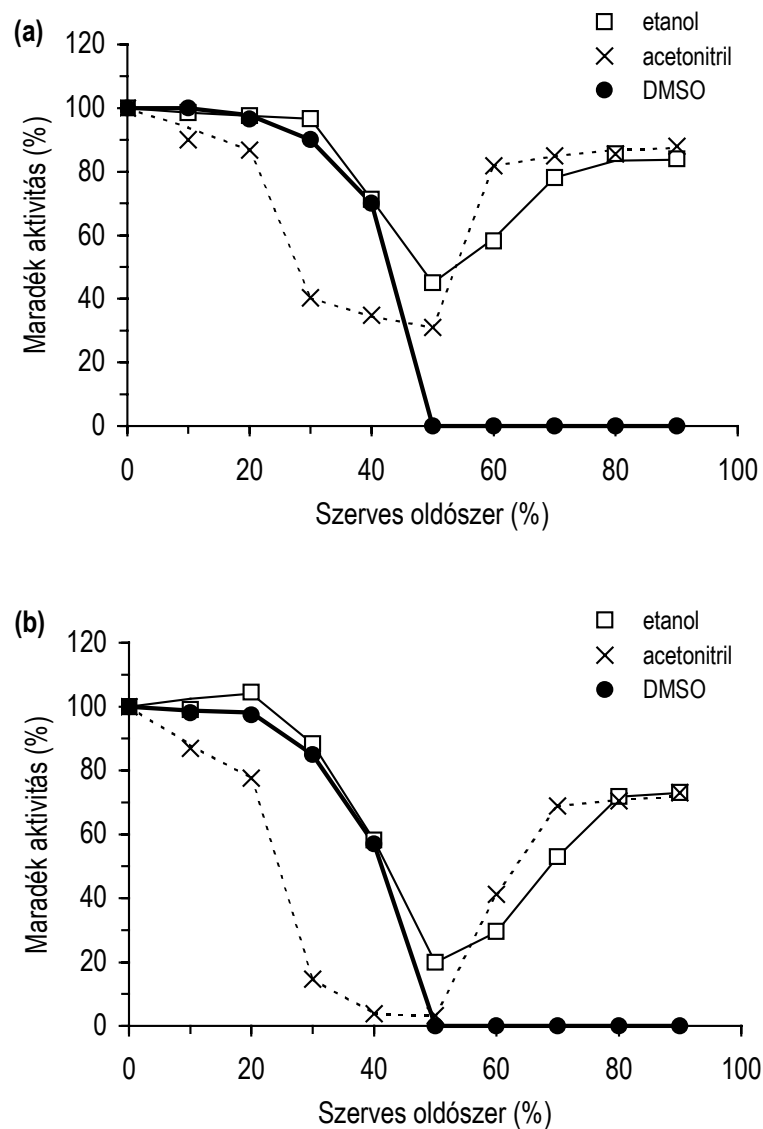
Kísérleteink során különböző vízzel elegyedő szerves oldószerek (etanol, dioxán, acetonitril, DMSO és aceton) oldott α -kimotripszinre kifejtett hatását vizsgáltuk. Az inkubációs elegyek szerves oldószer tartalmát 10-90% között változtattuk, a vizes fázis 0,05 M kálium foszfát puffer (pH 7,0), az enzimkoncentráció 1 mg mL^{-1} volt. Az inkubálásokat 2 órán keresztül végeztük 25°C -on.



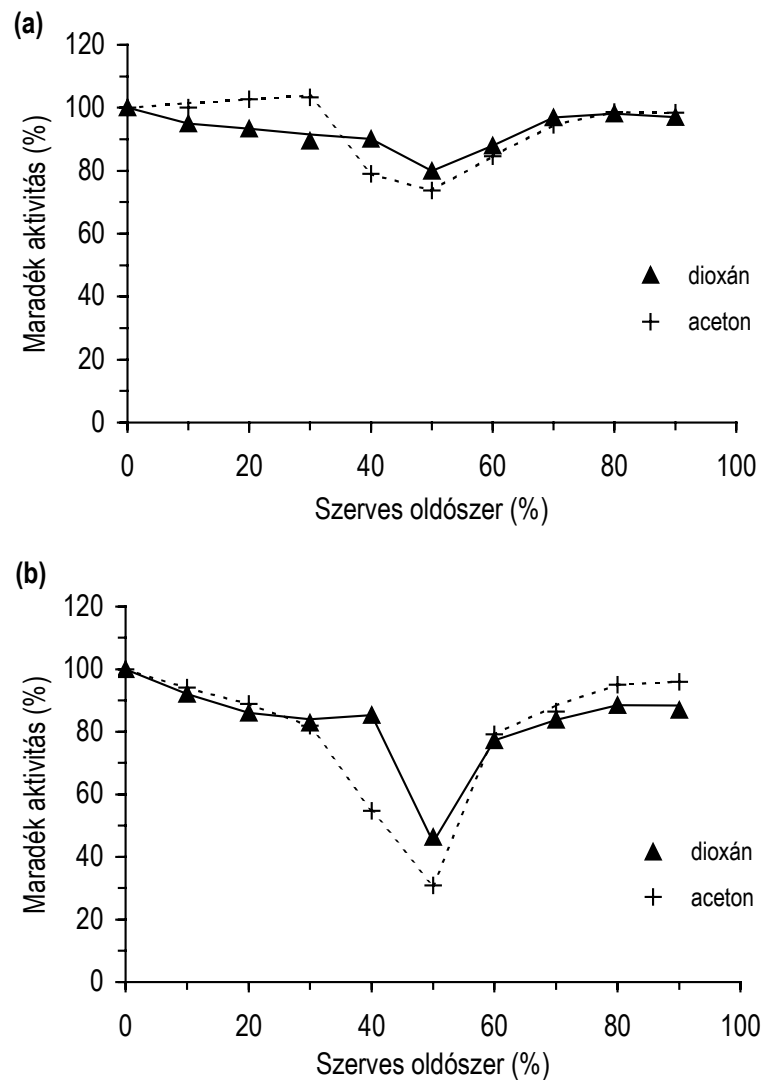
8. ábra. Az α -kimotripszin aktivitása 30-70% etanolt tartalmazó elegyekben 25°C -on.

Minden egyes szerves oldószer koncentrációjánál, különböző időpillanatokban megmértük az enzim aktivitását, majd az inkubálási idő függvényében ábrázoltuk a maradék aktivitásokat. Példaként a különböző mennyiségű etanolt tartalmazó elegyekre kapott időgörbék eredményeit mutatjuk be (8. ábra).

A továbbiakban a fenti időgörbék adataiból kiválasztottunk 2 időpillanatot (10 és 40 perc), melyekhez tartozó enzimaktivitás értékeket minden oldószer százalék görbéről kiemelve újra ábrázoltunk az inkubálási elegyben lévő oldószer mennyiségének (%) függvényében (9. és 10. ábra).



9. ábra. Különböző koncentrációjú etanol, acetonitril és DMSO hatása az α -kimotripszin stabilitására. Inkubálási idő (a) 10 perc, (b) 40 perc 25°C-on.

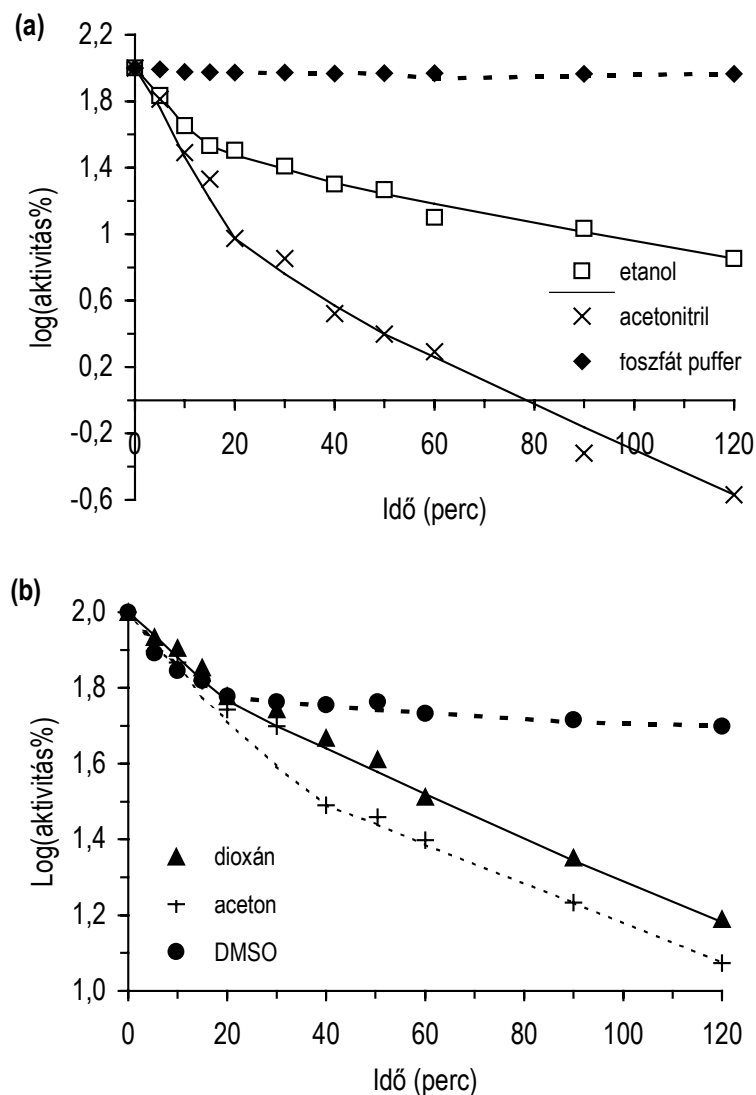


10. ábra. Különböző koncentrációjú dioxán és acetón hatása az α -kimotripszin stabilitására. Inkubálási idő (a) 10 perc, (b) 40 perc 25°C-on.

Mind az öt oldószer esetében az oldószer mennyiségének növekedésével az enzim aktivitása először csökken, majd elér egy minimum értéket, s ezt mindegyik oldószer alkalmazásakor 50% körüli oldószer koncentrációnál figyeltük meg (Simon és mtsai, 1998). A minimum pontban mért maradék aktivitás értékek 10 perc inkubálási idő után: dioxánban 80%, acetónban 74%, etanolban 45%, acetónitrilben 31%, valamint DMSO-ban 0%. 40 perc inkubálás után a minimum pontban kapott aktivitás értékek: dioxán 46%, acetón 31%, etanol 20%, acetónitril 3%, s a DMSO-ban 0%. Etanol, acetónitril, dioxán, valamint acetón esetében a szerves oldószer mennyiségének 50% fölé emelésével az enzim aktivitása fokozatosan növekszik és 90% oldószer tartalomnál

megközelíti (70-90% aktivitás), de nem éri el a kiindulási aktivitást. A DMSO-nál a többi oldószerrel eltérő eredményt kaptunk. Bár kezdetben a többi oldószerhez hasonlóan az oldószer mennyiségének növekedésével itt is csökken az enzim aktivitása és 50% oldószer jelenlétében éri el minimumát, de az oldószer koncentráció további emelésével párhuzamosan nem tapasztalható az enzimaktivitás növekedése.

Azért, hogy az inaktiválódás kinetikáját tanulmányozhassuk, a kapott eredményeket analizáltuk féllogaritmikus ábrázolásban. A 11. ábrán az dioxán, acetón, etanol és acetonitril esetében az 50% szerves oldószer jelenlétében mért adatokat tüntettük fel.

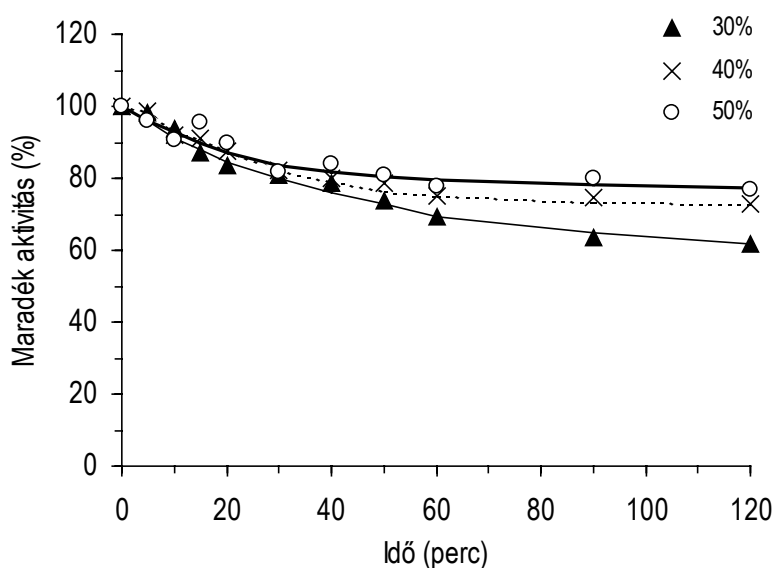


11. ábra. Az α -kimotripszin inaktiválódása 0,05 M kálium-foszfát pufferben (pH 7,0) és 50% szerves oldószer tartalmú elegyekben 25°C-on (DMSO esetén 40%-os oldószer koncentrációnál történt a mérés).

Mivel 50% DMSO tartalmú elegyekben az enzim 5 perc alatt teljesen inaktiválódott, így DMSO esetében a 40% szerves oldószer jelenlétében kapott inaktiválódási adatokat elemeztük. Az inaktiválódás kétlépcsős jellege a vizes közegben ismert inaktiválódáshoz hasonlóan minden oldószerben nyomon követhető volt, bár dioxán esetében nem annyira kifejezett a görbe kétlépcsős jellege. Az enzim kezdetben gyorsabban veszíti aktivitását, majd kb. 20 perc elteltével az inaktiválódás folyamata lelassul.

4.1.2. Vízrel nem elegyedő szerves oldószer hatása a kimotripszin aktivitására

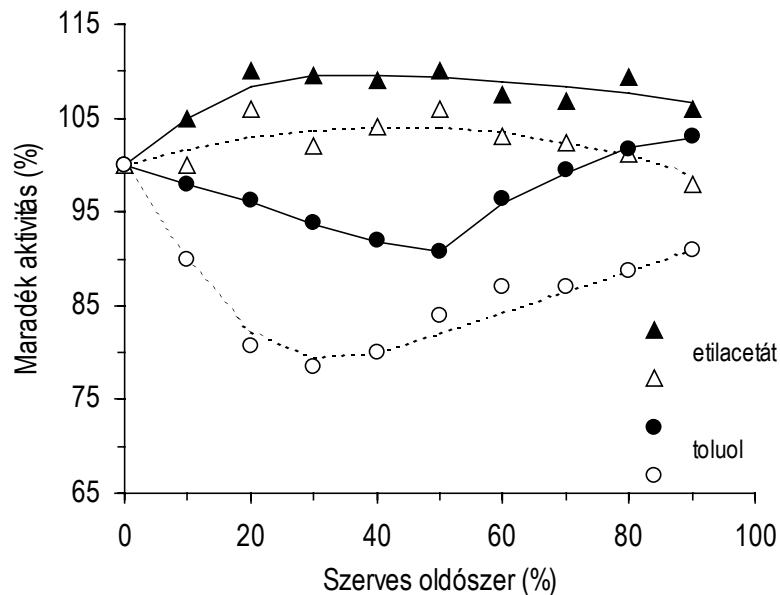
A vízzel nem elegyedő oldószer között a toluol és az etilacetát enzim stabilitására kifejtett hatását vizsgáltuk (Simon és mtsai, 1998). Kísérleteinket 10-90% oldószer koncentráció tartományban végeztük el a vízzel elegyedő oldószerknél leírt körülmények között, s a kapott eredmények értékelésénél is hasonlóan jártunk el. Példaként a különböző mennyiségű toluolt tartalmazó elegyek adatait mutatjuk be (12. ábra). Toluolban az enzim igen stabilnak mutatkozott, kiindulási aktivitásának több mint 60%-át megőrizte az inkubálás végéig minden oldószer koncentrációnál.



12. ábra. Az α -kimotripszin aktivitása 30-50% toluolt tartalmazó elegyekben 25°C-on.

Ugyanakkor etilacetátban kezdetben kis mértékű aktiválódást tapasztaltunk (maximális enzimaktivitás 118%, 20 perc inkubálás után 50% etilacetát tartalmú elegyben), majd kissé csökkent az enzim aktivitása és az inkubálási idő végére gyakorlatilag elérte a kiindulási aktivitás értéket (adatok nincsenek feltüntetve). A

kapott eredményekből ezeknél az oldószereknél is kiválasztottuk a 10 és a 40 perces inkubálási időpillanatokban mért adatokat, melyeket ismét ábrázoltunk a szerves oldószer koncentráció függvényében, hogy megnézzük hogyan változik az enzim aktivitása az oldószer koncentrációjától függően (13. ábra).



13. ábra. Különböző koncentrációjú etilacetát és toluol hatása az α -kimotripszin stabilitására 25°C-on. 10 perc inkubálási idő: zárt szimbólumok, 40 perces inkubálási időnél: nyitott szimbólumok.

Megállapíthatjuk, hogy az alkalmazott koncentráció tartományban az etilacetát nem befolyásolta kedvezőtlenül az enzim aktivitását és a kimotripszinre kifejtett hatása független az etilacetát koncentrációjától. A toluol esetében, bár csaknem minden koncentráció esetén a kiindulási értékhez képest kisebb az enzimaktivitás, ez a csökkenés azonban kis mértékű (10-20%). Az enzimaktivitás változása a toluol mennyiségének függvényében kis mértékben hasonlít a vízzel elegyedő oldószereknél tapasztaltakhoz, ugyanis toluol alkalmazásakor is az oldószer mennyiségének növekedésével az enzim aktivitása először csökken, majd magasabb toluol koncentrációk alkalmazásakor emelkedik. A csökkenés és az emelkedés mértéke lényegesen kisebb, mint a vízzel elegyedő oldószereknél, és az aktivitás minimumpontja sem annyira kifejezett (Simon és mtsai, 1998). Az 50% oldószer jelenlétében mért adatok féllogaritmikus ábrázolásával megkaptuk az enzim toluolban mutatott inaktiválódási kinetikáját bemutató görbét (adatok nincsenek feltüntetve), melyet analizáltunk és megállapítottuk, hogy toluolban az enzim - a vizsgált vízzel elegyedő

oldószerekhez hasonlóan - kétlépcsős inaktiválódást mutat, vagyis kezdetben gyorsabban, később lassabban veszíti aktivitását.

Összefoglalva arra a következtetésre jutottunk, hogy a vizsgált vízzel nem elegyedő oldószerek kedvezőbbek az enzim aktivitására és stabilitására nézve, mint a vízzel elegyedő szerves oldószerek. Azonban az α -kimotripszinnel végzett szintetikus reakciók szubsztrátjai többnyire poláros, vízzel elegyedő oldószerekben oldódnak, s ezért kompromisszumos megoldást kell választani a hatékony felhasználás végett, vagyis sok esetben vízzel elegyedő poláros vagy kevésbé poláros oldószert érdemes választani közegként a szintézisekhez.

4.2. α -KIMOTRIPSZIN STABILIZÁLÁSA SZERVES OLDÓSZEREKBE

A fehérjeszerkezet stabilizálására szolgáló eljárások (kémiai módosítás, enzimrögzítés, "protein engineering", aditívek hozzáadása) közül munkánk során azt vizsgáltuk, hogy milyen hatással van az enzim szilárd hordozóhoz rögzítése, valamint különféle aditívek jelenléte az inkubálási elegyben az α -kimotripszin stabilitására szerves oldószeres rendszerekben.

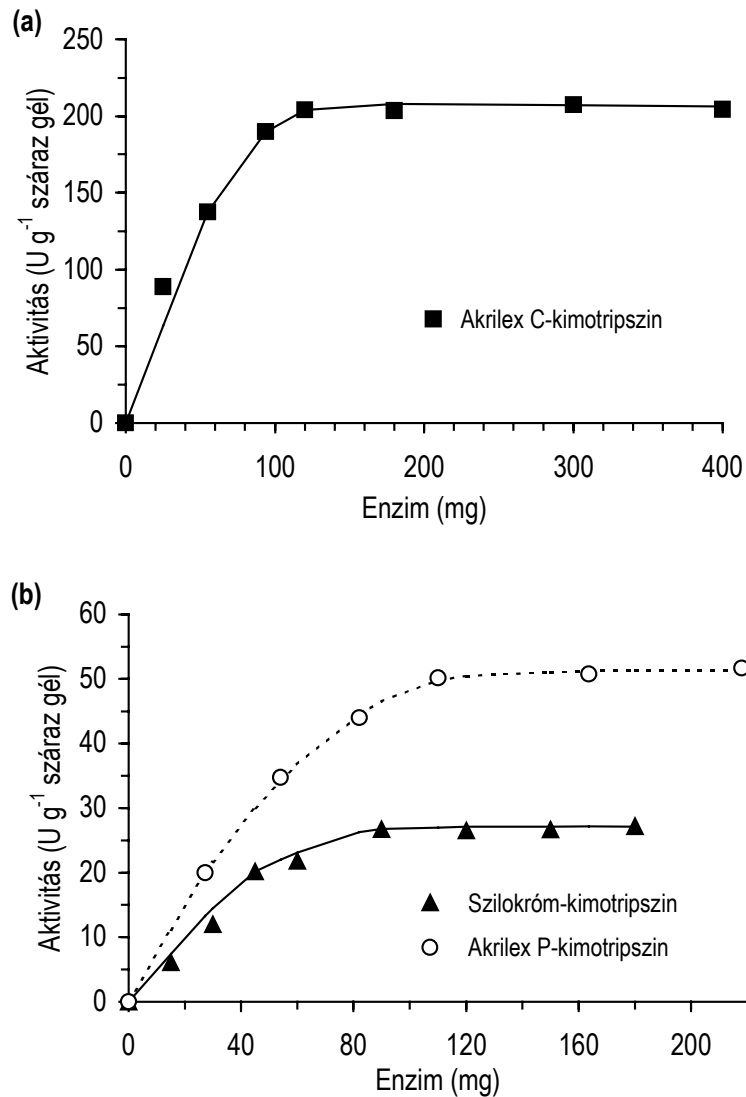
4.2.1. Rögzítés hatása a kimotripszin stabilitására

Az enzimek szerves oldószerekben mutatott stabilitása többféle módon befolyásolható. A stabilitás növelésének egyik lehetősége, hogy az enzimet szilárd hordozóhoz rögzítjük. A jól megválasztott hordozó, illetve rögzítési eljárás kedvező hatással lehet az enzim stabilitására, sőt pozitív irányban befolyásolhatja az enzim katalitikus tulajdonságait is. Mindezek figyelembevételével további kísérleteink célja az volt, hogy a kimotripszint különböző hordozókhoz rögzítsük, és megvizsgáljuk a rögzített enzimformák szerves oldószerekben mutatott stabilitását, valamint összehasonlítsuk az oldott és rögzített enzimformák stabilitási tulajdonságait.

Munkánk során az α -kimotripszint két poliakrilamid alapú gyöngypolimer hordozóhoz (Akrilex C-100 és Akrilex P-100) és egy szilika alapú hordozóhoz (p-benzokinonnal aktivált Szilokrómm) kovalensen rögzítettük. Az Akrilex C-100 poliakrilamid hordozó karboxil funkciós csoportokat tartalmaz, melyeket a rögzítés előtt karbodiimiddel, az Akrilex P-100 poliakrilamid hordozót pedig p-benzokinonnal aktiváltuk. Megfelelő aktivitású rögzített enzim előállításához a rögzítési körülményeket célszerű optimalizálni, így a következő kísérletek erre irányultak.

4.2.1.1. A rögzítés enzimkoncentráció függése

Az Akrix C-100 esetében 1 g hordozó felhasználásával 25-400 mg között változtattuk az enzim mennyiségét a rögzítéseknél (14a. ábra). A rögzítést 4°C-on 0,05 M Na₂HPO₄/KH₂PO₄ pufferben (továbbiakban 'foszfát puffer') (pH 6,0) végeztük. Megállapítottuk, hogy 1 g száraz hordozóra vonatkoztatva 120 mg enzim alkalmazása elegendő a rögzítés során, és így 204,1 U g⁻¹ száraz gél aktivitású α-kimotripszin állítható elő.



14. ábra. Rögzített α-kimotripszin aktivitásának változása az enzimkoncentráció függvényében.

Az Akrix P-100 hordozó egy grammjára számítva 27-272 mg tartományban különböző enzim mennyiségeket használtunk fel a rögzítéseknél 0,05 M foszfát pufferben (pH 6,0) 4°C-on (14b. ábra). Eredményeinkből kitűnik, hogy 110 mg enzim

felhasználása elegendő a legnagyobb aktivitású rögzített enzim ($50,1 \text{ U g}^{-1}$ száraz gél) előállításához és az enzimmennyiség növelésével már nem nő a rögzített enzim aktivitása. A további rögzítésekhez ezt az enzimmennyiséget használtuk fel.

Egy gramm p-benzokinonnal aktivált Szilokrómm hordozóra vonatkoztatva 15-180 mg kimotripsint használtunk fel a rögzítések során (0,05 M foszfát puffer, (pH 7,5), 4°C). A legjobb aktivitású rögzített enzimet 90 mg körüli enzimnek 1 g hordozóra való felvitelekor kaptuk (14b. ábra). Az így előállított rögzített kimotripszin aktivitása $26,7 \text{ U g}^{-1}$ száraz gél volt.

Rögzítési kísérleteink eredményeit az 1. táblázatban foglaltuk össze. A rögzítésekhez használt eltérő enzimmennyiségeket az egyes hordozók eltérő duzzadási tulajdonsága, illetve fehérje kötő kapacitása indokolta. Az α -kimotripsint mindhárom hordozóhoz sikeresen rögzítettük. A legkevesebb fehérjét az Akrilex P-100 kötötte meg (8,1 mg-ot), a legtöbbet az Akrilex C-100 (39,2 mg-ot). A három hordozó közül 1 g hordozóra vonatkoztatva az Akrilex C-100 esetén kaptuk a legnagyobb aktivitású rögzített enzimet ($204,1 \text{ U g}^{-1}$ száraz gél), míg a p-Szilokrómmra rögzített enzim bizonyult a legalacsonyabb aktivitásúnak ($26,7 \text{ U g}^{-1}$ száraz gél aktivitás), s ezzel együtt a Szilokrómmhoz való rögzítésnél tapasztaltuk a legnagyobb mértékű inaktiválódást is (84,3%).

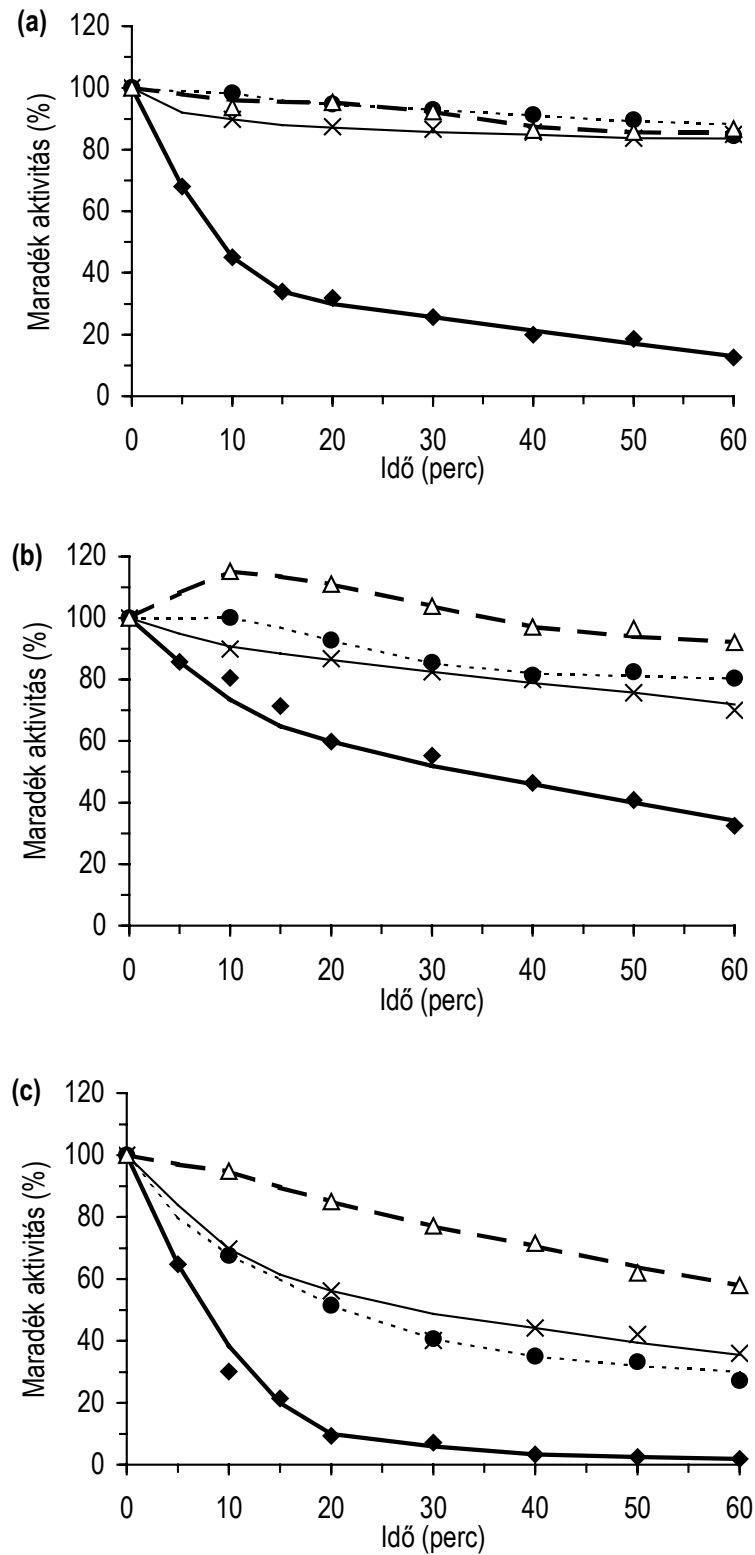
1. táblázat. Az α -kimotripszin különböző hordozókhöz történő rögzítésének anyagmérlege 1 g száraz géltre vonatkoztatva.

	<i>AKRILEX C-100</i>	<i>AKRILEX P-100</i>	<i>p-SZILOKRÓM</i>
Reakcióelegybe vitt			
aktivitás (U)	6003,0	5012,0	3814,0
fehérje (mg)	123,8	111,6	87,0
Kötődött aktivitás (U)	204,1	50,1	26,7
(%)	3,4	1,0	0,7
Kötődött fehérje (mg)	39,2	8,1	28,1
(%)	31,7	7,3	32,3
Szűrletből és mosókból			
visszamért aktivitás (U)	3451,7	4059,7	572,1
(%)	57,5	81,0	15,0
Aktivitás veszteség (%)	39,1	18,0	84,3

4.2.1.2. Rögzített kimotripszin stabilitása szerves oldószeres rendszerekben

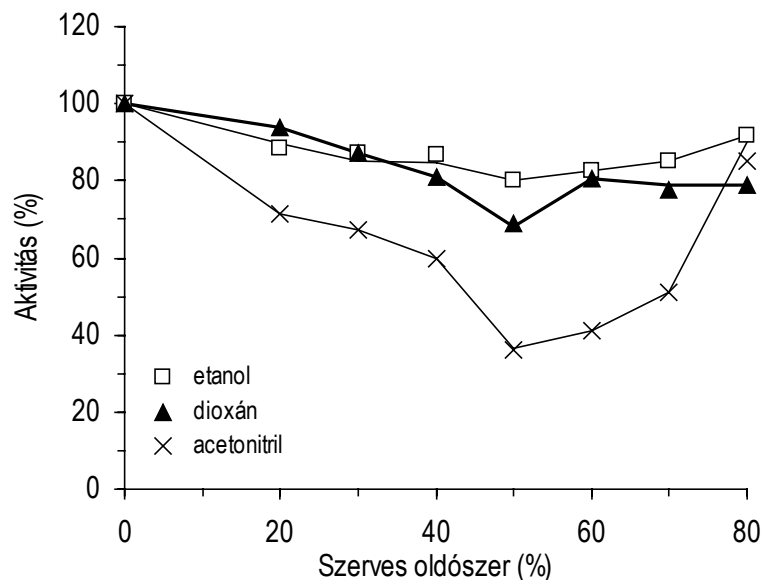
Az előző kísérleteinkben előállított rögzített enzimekkel a továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy hogyan változik meg az enzim stabilitása szerves oldószerekben a rögzítést követően. A fentebb leírt, oldott enzimmel végzett kísérleteink alapján - mely szerint a legtöbb általunk vizsgált oldószerben az enzim aktivitása minimumgörbével volt jellemezhető az oldószer koncentrációjától függően -, kiválasztottuk az etanolt, acetonitrilt, melyekben az enzim aktivitása a legnagyobb mértékben csökkent, valamint a kevésbé destabilizáló oldószeresek közül a dioxánt a további vizsgálatokhoz. Mivel mindhárom oldószer esetében 50% szerves oldószer koncentráció mellett kaptuk a minimum aktivitásértékeket, így e három oldószer 50% koncentrációja mellett vizsgáltuk, hogy a különféle hordozókra rögzítés milyen hatással van az α -kimotripszin stabilitására. Az inkubációs elegyekben a rögzített enzimből 5-15 enzimegység volt jelen. Méréseinket 25°C-on 0,05 M kálium foszfát puffer (pH 7,0) felhasználásával 60 percig végeztük.

A különféle rögzített enzimformák nagyobb stabilitást mutattak mindhárom oldószerben, mint az oldott enzim. 50% etanol jelenlétében mindhárom rögzített enzimforma gyakorlatilag hasonló stabilitást mutatott (15a. ábra), és az oldott enzimhez képest a rögzítéssel nagyfokú stabilizálódást tapasztaltunk. Amíg ugyanis az oldott enzim aktivitásának több, mint 85%-át elveszítette 60 perc inkubálás alatt, addig a rögzített enzimek aktivitása ugyanennyi idő alatt mindössze kb. 15%-kal csökkent. 50% dioxán jelenlétében is jelentősen növekedett az enzim stabilitása a rögzítéssel (15b. ábra), bár az etanolhoz viszonyítva kisebb mértékű stabilizálódás volt megfigyelhető. A három rögzített enzim közül a Szilokróm-kimotripszin bizonyult dioxánban a legstabilabbnak, aktivitásának több, mint 90%-át megőrizte 60 perces inkubálás elteltével is. A kétféle Akrilex hordozó alkalmazásával az enzim hasonló stabilitást mutatott dioxánban, mindegyik esetében a kiindulási aktivitásnak több mint 70%-át megőrizte 60 percnyi inkubálás után is. Acetonitrilben az oldott enzim már 20 perc alatt elveszítette aktivitásának mintegy 90%-át. A rögzítés csökkentette az inaktiválódás mértékét, hiszen Akrilex C ill. P hordozók esetében az enzim aktivitása csak 65-70%-kal, míg Szilokróm hordozón mindössze kb. 40%-kal csökkent 60 perc alatt (15c. ábra).



15. ábra. Oldott és különböző hordozókra rögzített α -kimotripszin stabilitása (a) 50% etanol, (b) 50% dioxán és (c) 50% acetonitril tartalmú elegyekben 25°C-on. (◆) oldott enzim; (×) Akrilex C-enzim; (●) Akrilex P-enzim; (Δ) Szilokróm-enzim.

A rögzített enzimeket 10-90% oldószer koncentráció tartományban együtt inkubáltuk a kiválasztott három oldószerrel (etanol, dioxán, acetonitril) 60 percig. Azért, hogy a rögzített enzimek aktivitásának oldószer koncentráció függését vizsgálhassuk, az időgörbék adataiból minden oldószer koncentráció esetében kiválasztottuk a 60 perces inkubálási időponthoz tartozó aktivitás értékeket és ezeket ábrázoltuk az oldószer koncentrációjának függvényében az oldott enzimhez hasonló módon (v.ö. 9. ábra). A rögzített enzimek aktivitásának oldószer koncentráció függését az Akrilex-C-kimotripsinnél mutatjuk be (16. ábra). A rögzített enzim az oldott enzimhez hasonló oldószer koncentrációfüggést mutat, hiszen itt is jellegzetes minimumponttal rendelkező görbéket kaptunk a kiválasztott három oldószerben, azonban az inaktiválódás mértéke rögzített enzim esetében lényegesen kisebb, még annak ellenére is, hogy hosszabb inkubálási idő elteltével ábrázoltuk eredményeinket.



16. ábra. Különböző koncentrációjú etanol, dioxán és acetonitril hatása az Akrilex C-re rögzített α -kimotripszin stabilitására. Inkubálási idő: 60 perc, 25°C-on.

Megállapíthatjuk tehát, hogy az alkalmazott hordozók kedvezően befolyásolták a kimotripszin stabilitását szerves oldószerekben. Oldószerenként eltérő mértékű stabilizáló hatást mutatott a különféle hordozók alkalmazása, s ezek közül a Szilokróm hordozóhoz való rögzítés volt a legjobb az α -kimotripszin számára. Összességében etanolban tapasztaltuk a legnagyobb mértékű stabilitás fokozódást az oldott enzimhez képest mindhárom hordozó esetében. A háromféle hordozó hatása között etanolban nem

volt nagy különbség, s dioxánban valamint acetonitrilben is az Akrilex C és P-re rögzített kimotripszin hasonló stabilitást mutattak.

További kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy polihidroxi vegyületek milyen hatással vannak a rögzített enzim stabilitására szerves oldószerekben és, hogy a rögzítéssel elért stabilitás növekedés tovább fokozható-e ezeknek az anyagoknak a rendszerhez adásával.

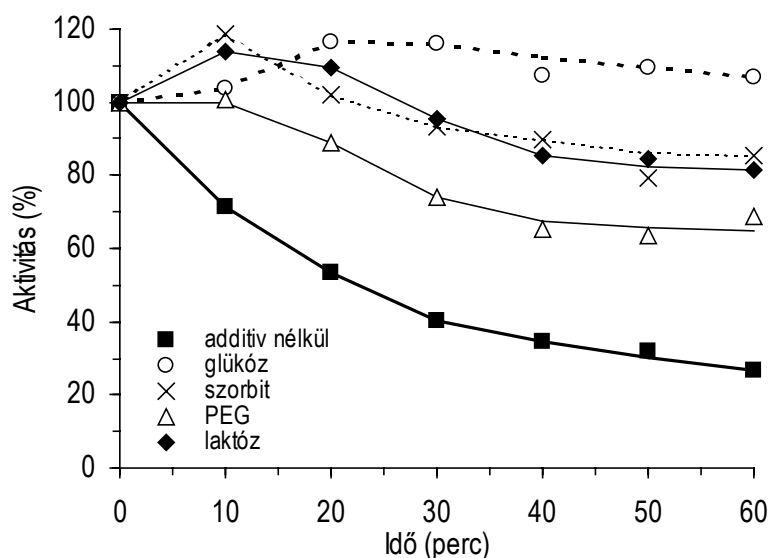
4.2.2. Additívek hatása az α -kimotripszin stabilitására

Ismeretesek bizonyos anyagok ill. eljárások, amelyekkel a fehérjeszerkezet stabilizálható, így felhasználás szempontjából stabil fehérjék állíthatók elő. Ennek egyik módja, hogy additíveket (mono- és diszacharidok, poliolo) adnak a fehérjét tartalmazó oldathoz. Ezen anyagok hatását jórészt vizes közegben és oldott enzimek esetében vizsgálták, illetve azt tanulmányozták, hogy milyen szerepet játszanak ezek a vegyületek az enzimek hőstabilitásában. Több vizsgálatot végeztek el arra vonatkozóan is, hogy milyen hatást fejtenek ki ezek az anyagok az egyes enzimek stabilitására, ha rögzítés során alkalmazzák őket. Viszonylag kevesebb adat áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy milyen hatásuk van ezeknek az anyagoknak az enzimek stabilitására szerves oldószeres rendszerekben, ha a rögzített enzimmel együtt vannak jelen. Ezért a rögzített α -kimotripszin stabilitását tovább vizsgáltuk különböző additívek (laktóz, glükóz, szorbit, polietilén glikol 8.000) jelenlétében. Korábbi eredményeink alapján a stabilitás vizsgálatokhoz az 50% acetonitrilt, dioxánt illetve etanolt tartalmazó elegyeket alkalmaztuk. Legelőször különböző additív koncentrációk hatását vizsgáltuk az α -kimotripszin stabilitására. Glükózzal és szorbittal $30\text{--}365\text{ g L}^{-1}$, laktóz esetében $20\text{--}240\text{ g L}^{-1}$, polietilén glikol (PEG) esetében pedig $30\text{--}240\text{ g L}^{-1}$ (az oldékonyságtól függően) koncentráció tartományban végeztük a méréseket és azt állapítottuk meg, hogy a legnagyobb mértékű stabilizáló hatás glükóz esetében 180 g L^{-1} , szorbittal 182 g L^{-1} , laktózzal 137 g L^{-1} és a PEG-gel 90 g L^{-1} koncentrációnál következett be. A további kísérletekhez ezért az egyes stabilizálókat ezekben a koncentrációkban alkalmaztuk.

4.2.2.1. Additívek hatásának időfüggése

Vizsgálataink során a különböző rögzített enzimformákat 60 percig inkubáltuk a stabilizálószerrel a különböző oldószerekben 25°C -on és azt tanulmányoztuk, hogyan változik az enzimek aktivitása az idő függvényében. A 17. ábrán példaként az Akrilex P-re rögzített α -kimotripszin aktivitásának változása látható az idő

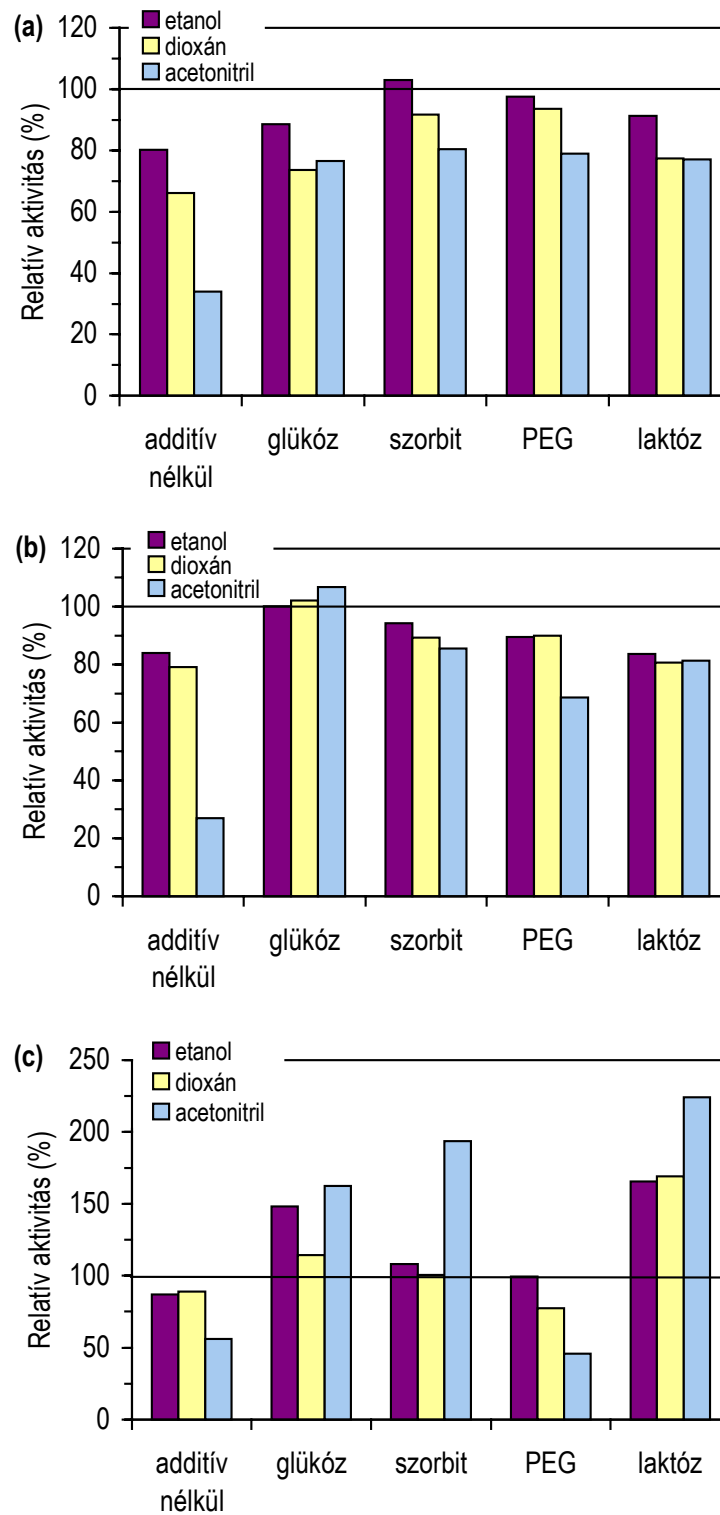
függvényében acetonitrilben különböző stabilizálószer jelenlétében és azok jelenléte nélkül. Már rövidebb (10 perc) inkubálás után is megfigyelhető stabilizáló hatás, de jelentősebb stabilitásnövekedést csak hosszabb idő elteltével tapasztaltunk. Az Akrilex P-re rögzített kimotripszin stabilitása mindegyik additív hozzáadása során növekedett acetonitrilben, és a legjobb stabilitást a glükóz jelenlétében mutatta az enzim. A szorbit és a laktóz közel hasonló mértékű stabilizáló hatást fejtettek ki az enzimre, míg a PEG jelenléte eredményezte a legkisebb mértékű, bár még mindig jelentős stabilizáló hatást (László és mtsai, 2001).



17. ábra. Akrilex P-kimotripszin aktivitása 50% acetonitrilt tartalmazó elegyekben additívek nélkül, valamint 180 g L^{-1} glükóz, 182 g L^{-1} szorbit, 137 g L^{-1} laktóz vagy 90 g L^{-1} polietilén glikol jelenlétében. A mérési eredmények a vizes kontroll %-ában vannak kifejezve (0,05 M kálium-foszfát puffer (pH 7,0)), és a $6,7 \text{ U mg}^{-1}$ aktivitás értéket vettük 100%-nak.

4.2.2.2. Additívek hatása a rögzített kimotripszin stabilitására különböző szerves oldószerekben

180 g L^{-1} glükóz, 182 g L^{-1} szorbit, 137 g L^{-1} laktóz és 90 g L^{-1} PEG hatását tanulmányoztuk az Akrilex C-, Akrilex P- valamint Szilokró-m-kimotripszin stabilitására 50% etanolban, dioxánban és acetonitrilben 60 percig 25°C -on. Az eredmények bemutatásához az inkubálás 60. percében mért aktivitás értékeket használtuk fel, lévén, hogy az additívek hatása 60 perc inkubálás után sokkal kifejezettebb volt, mint rövidebb idejű inkubálás után. Mindegyik enzimforma esetében a saját vizes kontroll 60 perces aktivitás értékeit tekintettük 100%-nak és ehhez viszonyítottuk az egyes stabilizálószer által kifejtett hatást (18. ábra).



18. ábra. Különböző rögzített α -kimotripszin formák stabilitásának összehasonlítása 180 g L⁻¹ glükóz, 182 g L⁻¹ szorbit, 90 g L⁻¹ PEG és 137 g L⁻¹ laktóz jelenlétében 50% etanolban, dioxánban és acetonitrilben 25°C-on 60 perces inkubálás során. A kísérleti adatok az adott rögzített enzim vizes kontrolljának %-ában vannak kifejezve (rögzített enzim 0,05 M kálium-foszfát pufferben (pH 7,0) inkubálva 60 percig 25°C-on). A vizes kontrollra kapott aktivitás értékeket tekintettük 100%-nak: (a) 5,61 U mg⁻¹ az Akrilex C-kimotripszinre, (b) 6,70 U mg⁻¹ az Akrilex P-enzimre és (c) 1,02 U mg⁻¹ a Szilokró-m-kimotripszinre.

Megállapítottuk, hogy csaknem mindegyik additív mindhárom oldószerben stabilizáló hatást fejtett ki a rögzített enzimekre. Ez alól csak néhány eset kivétel, így a laktóz nem fejtett ki stabilizáló hatást az Arilex P-enzimre etanolban és dioxánban, valamint a PEG nem stabilizálta a Szilokróm-enzimet dioxánban és acetonitrilben (László és mtsai, 2001). Az Akrix C- és az Akrix P-kimotripszinre az additívek hatása a glükóz kivételével általában hasonló volt mindegyik oldószerben. Az Akrix-enzimek esetében additívek alkalmazása nélkül az acetonitrilben volt a legnagyobb mértékű az α -kimotripszin inaktiválódása, viszont az additívek stabilizáló hatása ebben az oldószerben volt a legkifejezettebb. Így, acetonitrilben additívek nélkül az Akrix C-kimotripszin aktivitásának mindössze 34%-át őrizte meg 60 perc inkubálás után, additívek alkalmazásával átlagosan 75-80%-át és mind a négy additív gyakorlatilag hasonló mértékű stabilizáló hatást fejtett ki (18a. ábra). Akrix P-enzim ugyanakkor additívek nélkül aktivitásának csak 27%-át őrizte meg acetonitrilben, additívek (szorbit, PEG és laktóz) jelenlétében viszont 70-85%-át, sőt glükóz jelenlétében még kis mértékű aktiválódást (kb. 7%-os) is megfigyelhettünk a vizes kontrollhoz képest (18b. ábra). Etanolban és dioxánban a legtöbb esetben nagyon hasonló hatást fejtettek ki az egyes additívek, ez különösen az Akrix P-kimotripszin esetében volt szembetűnő.

A Szilokróm-enzim acetonitrilben additívek nélkül, aktivitásának 56%-át őrizte meg 60 perc inkubálás után. Additívekkel (a PEG kivételével) azonban jelentős stabilizáló hatás volt elérhető ebben az oldószerben, sőt minden esetben jelentős mértékű aktiválódást is megfigyeltünk (18c. ábra). Etanolban és dioxánban az egyes additívek hatása igen változatos volt. Összességében a laktóz fejtett ki legnagyobb mértékű stabilizáló hatást a Szilokróm-kimotripszinre mindhárom oldószerben.

Összefoglalva, az Akrix-enzim formáknál az additívek stabilizáló hatása kisebb mértékű volt a Szilokróm-enzimhez képest. Az acetonitril tartalmú elegyben tapasztalt nagy mértékű stabilizáló hatás Akrix-C-enzimnél szorbittal, Akrix P-enzimnél glükóz jelenlétében, Szilokróm-kimotripszinnél pedig laktózzal volt a legkifejezettebb mindegyik oldószerben.

4.3. KIMOTRIPSZINNEL MEGVALÓSÍTOTT SZINTETIKUS REAKCIÓK SZERVES OLDÓSZERES KÖZEGBEN

A nem hagyományos közegű biokatalízis dinamikusan fejlődő területe az enzimológiának. Ismert, hogy a hidrolitikus enzimek szerves oldószeres közegben észtereket, peptideket tudnak szintetizálni, átészteresítési és transzpeptidációs reakciókat katalizálnak (Moresoli és mtsai, 1991). Az α -kimotripszin szintetikus reakciókban való részvételére vonatkozó irodalmi adatok nagyobb hányadát képviselik a peptidszintézissel kapcsolatos vizsgálatok, ezért választottuk az α -kimotripszinnel kevésbé tanulmányozott észteresítési és átészteresítési reakció vizsgálatát munkánk során.

4.3.1. Észteresítési és átészteresítési reakciók vizsgálata

A direkt észteresítési reakciók vizsgálatához az N-acetil-L-tirozin (AT), valamint különböző szénatomszámú normál és elágazó láncú alkoholok között szerves oldószerek jelenlétében lejátszódó észterképződési folyamatot tanulmányoztuk. Az átészteresítések tanulmányozásához kiválasztott modellreakciónk az N-acetil-L-tirozin etil észter (ATEE) és valamely alkohol között lejátszódó reakció volt. A reakció során az enzimnek egy már meglévő észterkötést kell felszakítani és egy új észterkötést létrehozni.

Ahhoz, hogy egy biokatalitikus folyamat optimális körülményeit meg tudjuk határozni, ismernünk kell, hogy a reakcióelegy összetétele és a reakció körülményei hogyan befolyásolják az enzim működését. Hagyományos közegben az enzim aktivitását a hőmérséklet, a pH és a reaktánsok koncentrációi határozzák meg. Szerves oldószeres közegben ezen paraméterek mindegyike szintén befolyásolja az enzim működését, azonban további faktorok hatását is figyelembe kell vennünk, így a reakcióközeget adó szerves oldószert, valamint a rendszer víztartalmát.

4.3.1.1. Észteresítés és átészteresítés *normál láncú és elágazó alkoholokkal*

A különböző alkoholokkal végzett kísérleteinkhez 1-5 szénatomszámú primer, szekunder és terciér alkoholokat használtunk fel. Az észteresítés és az átészteresítés alkoholfüggését acetonban hajtottuk végre. A reakciókat 30°C-on 2,5% víztartalom mellett (0,05 M kálium foszfát puffer, pH 7,0) végeztük 3 órán keresztül. Eredményeinket a 2. táblázatban foglaltuk össze. Megállapítottuk, hogy a normál láncú primer alkoholok esetén a szénatomszám növekedésével az észteresítési reakció

kitermelése csökkent (László és Simon, 1998). A legnagyobb mértékű termékképződést metanollal kaptuk (42%). Ezzel szemben az átészteresítési reakcióra nézve ilyen egyértelmű összefüggést nem találtunk a kitermelés mértéke és az alkoholok szénatomszáma között, tehát a kitermelés nem, vagy csak kevésbé függött a primer alkohol szénláncának hosszúságától.

2. táblázat. N-acetil-L-tirozin észterek képződése N-acetil-L-tirozinból és különböző alkoholokból direkt észteresítéssel, valamint N-acetil-L-tirozin etil észterből és a megfelelő alkoholból átészteresítéssel acetonban (30°C, kálium-foszfát puffer (pH 7,0), 3 óra reakcióidő).

<i>Alkohol</i>	N-acetil-L-tirozin észter (%)	
	Átészteresítés	Észteresítés
metanol	86,0	42,0
etanol	-	35,6
1-propanol	85,3	30,0
1-butanol	80,8	25,3
1-pentanol	34,8	18,1
2-propanol (izopropanol)	19,4	14,7
2-butanol	8,6	10,6
tercier-butanol	1,7	0,0
tercier-pentanol	0,0	0,0
izobutanol	6,0	19,7
izopentanol	1,5	8,2

Így metanollal, 1-propanollal és 1-butanollal közel hasonló kitermeléssel zajlott az átészteresítési reakció (egyenként 86, 85,3 és 80,8% észterhozam), valamint 1-pentanolal már csak 34,8%-os volt a kitermelés. Szekunder alkoholokkal a primer alkoholokhoz képest kisebb hozamokat kaptunk (*átészteresítés* 2-propanollal 19,4%, 2-butanollal 8,6% termékhozam; *észteresítés* 2-propanollal 14,7%, 2-butanollal 10,6% termékhozam). A terciér alkoholok nem bizonyultak jó reakciópartnernek, hiszen terciér-pentanolal nem ment végbe egyik reakció sem, míg terciér-butanollal is csak az átészteresítés zajlott le, mindössze csupán 1,7% termék képződött a 3 óra reakcióidő alatt. Az izo-alkoholok közül az észteresítési reakcióra nézve a legjobb az izobutanol volt 19,7%-os kitermeléssel, az átészteresítési reakcióra nézve pedig izopropanol (2-propanol) (19,4% kitermelés). Izopentanolal mindkét típusú reakció 10% alatti észterhozamokat eredményezett. Mivel az észteresítés és az átészteresítés is metanollal ment végbe a legjobban, így a további kísérleteinkben az N-acetil-L-tirozin metanollal való észteresítését, valamint az N-acetil-L-tirozin etil észter metanollal való átészteresítését tanulmányoztuk részleteiben különböző szerves oldószerekben.

4.3.1.2. Észteresítés és átészteresítés *különböző oldószerekben*

Az α -kimotripszin által katalizált N-acetil-L-tirozin és metanol közötti direkt észteresítési, valamint az N-acetil-L-tirozin etil észterből és metanolból kiinduló átészteresítési reakciókat vizsgáltuk és hasonlítottuk össze különféle vízzel elegyedő (aceton, dioxán, acetonitril, metanol, THF, DMSO és DMF) és vízzel nem vagy csak korlátozottan elegyedő (toluol, etilacetát, ciklohexán, kloroform és széntetraklorid) szerves oldószerekben. Az N-acetil-L-tirozin metil észter (ATMeE) szintéziseket 30°C-on végeztük, a 3. táblázatban a 3 órás összehasonlító adatokat foglaltuk össze. A legmagasabb ATMeE hozamot az átészteresítéssel acetonban (86,0%), az észteresítéssel pedig etilacetátban (48,7%) értük el. Az összes többi oldószer közül az átészteresítés acetonitrilben (67,4%) és tetrahydrofuranban (38,6%), az észteresítés acetonban (40%) és acetonitrilben (35,2%) ment végbe a legnagyobb mértékben.

3. táblázat. N-acetil-L-tirozin metil észter (ATMeE) képződése N-acetil-L-tirozinból és metanolból direkt észteresítéssel, valamint N-acetil-L-tirozin etil észterből és metanolból átészteresítéssel különböző oldószerekben (30°C, 3 óra reakció idő).

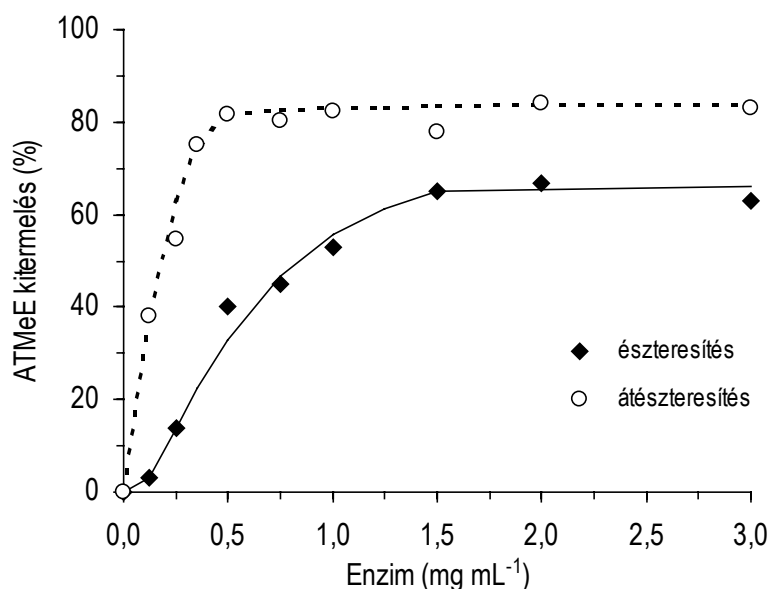
Oldószer	ATMeE kitermelés(%)		log P	ϵ
	Átészteresítés	Észteresítés		
Dimetil szulfoxid	0,0	0,0	-1,3	46,6
Dioxán	22,2	4,5	-1,1	2,2
Dimetilformamid	30,8	0,0	-1,0	37,0
Metanol	0,0	0,0	-0,8	32,6
Acetonitril	67,4	35,2	-0,3	36,2
Aceton	86,0	40,0	-0,2	20,7
Tetrahydrofuran	38,6	0,0	0,5	7,6
Etilacetát	28,5	48,7	0,7	6,2
Kloroform	21,5	0,0	2,0	4,6
Toluol	2,3	18,0	2,5	2,4
Széntetraklorid	12,7	0,0	3,0	2,2
Ciklohexán	4,1	1,5	3,2	2,0

Egyik reakció sem zajlott le metanolban és DMSO-ban, valamint a direkt észteresítés nem ment végbe további négy oldószerben, így DMF-ban, THF-ban, kloroformban és széntetrakloridban. Ezzel szemben az átészteresítés az előbb említett négy oldószer közül 30,8%-ban végbement DMF-ban és a már említett 38,6%-ban THF-ban, továbbá kisebb mértékben, de végbement kloroformban (21,5%) és széntetrakloridban (12,7%) is. A ciklohexán nem bizonyult az α -kimotripszin számára alkalmas közegnek észterszintézisek szempontjából, hiszen mindössze 1,5-4,1% közötti

ATMeE képződött a reakciók során. Nem találtunk egyértelmű összefüggést a kitermelés és az adott oldószer log P értéke között, bár kétségtelen, hogy a legnagyobb mértékű termékképződéseket mind a direkt észteressítéssel, mind pedig az átészteressítéssel a $-0,3 < \log P < 1,0$ oldószerekben, vagyis kevésbé poláros oldószerekben kaptuk, néhány kivételtől eltekintve. Ezenkívül szintén nem volt összefüggés az oldószer dielektromos állandója (ϵ) és a kitermelés között.

4.3.1.3. Az észterszintézis és az átészteressítés **enzim koncentráció** függése

Az előző kísérleti eredmények alapján a további vizsgálatokban, az N-acetil-L-tirozin metil észter (ATMeE) szintézisét direkt- és átészteressítéssel acetóban tanulmányoztuk részletesen. A további vizsgálatok célja az α -kimotripszin által katalizált észteressítés és átészteressítés körülményeinek optimalizálása volt.

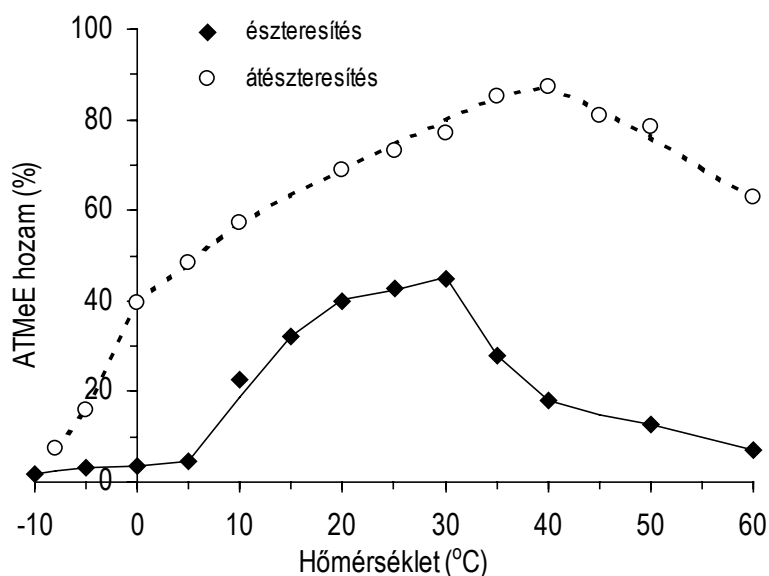


19. ábra. N-acetil-L-tirozin metil észter képződés enzim koncentráció függése direkt- és átészteressítési reakciókban (Reakcióidő: 3 óra, 30°C-on).

Kísérleteinkben az α -kimotripszin koncentrációját $0,1-3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ között változtattuk és 3 óra inkubálási idő után mértük a keletkezett N-acetil-L-tirozin metil észter mennyiségét. A 19. ábráról leolvasható, hogy az észteressítés és az átészteressítés kitermelése az enzim koncentrációval telítési görbe szerint változik. Az észterszintézis a maximális konverziót $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ enzim koncentrációnál éri el, az átészteressítési reakció pedig már $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ enzim koncentrációnál. Az enzim koncentráció további emelésével egyik reakció hozama sem növekszik.

4.3.1.4. A hőmérséklet és a pH hatása az észterszintézisre és az átészteresítésre

A hőmérséklet hatását -10 és $+60^{\circ}\text{C}$ közötti intervallumban (20. ábra) vizsgáltuk az N-acetil-L-tirozin metil észter szintézisére acetonban. Vizsgálatainkat $0,05$ mmol aminosav és 10% metanol szubsztrát koncentrációval végeztük 3 órán keresztül. Eredményeink alapján azt állapítottuk meg, hogy mind a direkt észterszintézis, mind az átészteresítés minden vizsgált hőmérsékleten végbement és a két reakció hőmérsékleti optimuma egymástól eltért.

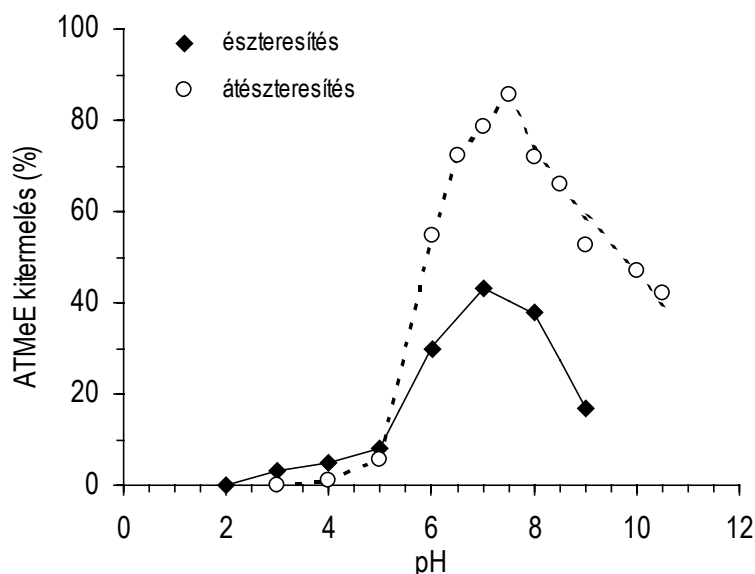


20. ábra. N-acetil-L-tirozin metil észter képződés hőmérséklet függése α -kimotripsinnel végzett direkt- és átészteresítési reakciókban (Reakcióidő: 3 óra)

Direkt észteresítés során 30°C -nál kaptuk a legmagasabb termékhozamot, átészteresítéskor pedig az optimum értéke 40°C volt. Az átészteresítésre kapott hőmérsékletfüggés görbe maximum jellege az észteresítéshez viszonyítva kevésbé kifejezett volt, hiszen széles hőmérsékleti tartományban ($+10$ és $+60^{\circ}\text{C}$ között) is jelentős kitermelést (60 - 85% észterhozam) értünk el.

A pH hatásának vizsgálatok a fenti reakciókat pH $2,0$ - $10,5$ közötti tartományban tanulmányoztuk 30°C -on a fentebb említett szubsztrát koncentrációk alkalmazásával. Megállapítottuk, hogy a két reakció pH optimuma nagyon közel esik egymáshoz, az észterképződési reakcióra nézve a optimális a pH $7,0$ alkalmazása, az átészteresítésre nézve pedig a pH $7,5$ (21. ábra). Az alacsonyabb pH értékek ($\text{pH} \leq 5$) nem kedveznek egyik reakciótípusnak sem, mivel egyáltalán nem tapasztaltunk

észteresítést pH 2,0-nél, átészteresítést pedig már pH 3,0-nál sem (László és Simon, 1998; Simon és mtsai, 2000).



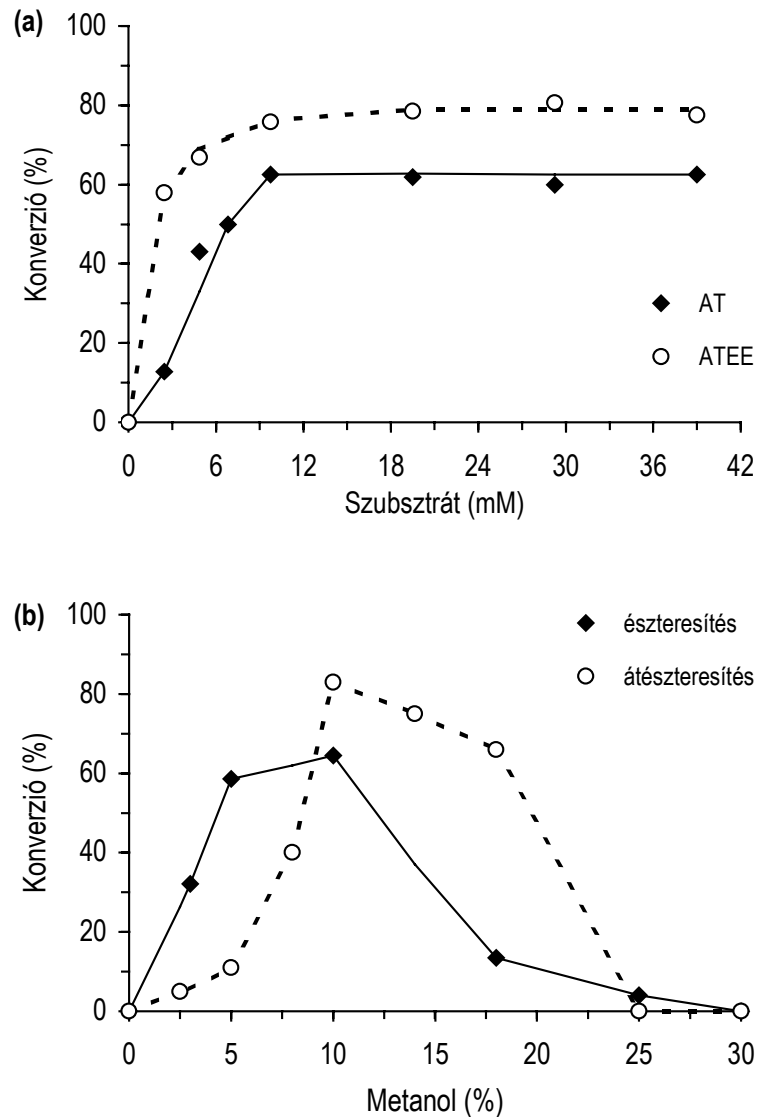
21. ábra. N-acetil-L-tirozin metil észter szintézis α -kimotripsinnel különböző pH mellett (Reakcióidő: 3 óra, 30°C-on).

4.3.1.5. A direkt észteresítés és az átészteresítés **szubsztrát koncentráció** függése

Az észteresítési és az átészteresítési reakciók szubsztrátkoncentráció függését vizsgáltuk acetonban 30°C-on, 2,5% víztartalom mellett (pH 7,0). Az enzimkoncentráció függés vizsgálataink alapján 1,5 mg mL⁻¹ enzim koncentrációt alkalmaztunk az észteresítésnél és 0,5 mg mL⁻¹ enzim koncentrációt az átészteresítés során, s a reakciókat 3 óráig végeztük. Eredményeink a 22. ábrán láthatóak. Az aminosav szubsztrátok esetében a következő eredményeket kaptuk: mindkét reakció esetén az aminosav szubsztrátból 9,75 mM koncentráció az optimális (9,75 mM AT az észteresítésre, és 9,75 mM ATEE az átészteresítésre nézve), a termék képződése pedig mindkét esetben telítési görbe szerint változik (22a. ábra).

Az alkohol szubsztrát koncentráció vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a metanol koncentrációjának emelésével mindkét reakció kitermelése növekszik egy maximum pontig (10% metanol), azonban tovább növelve a metanol mennyiségét a rendszerben, a termékképződés mértéke csökken, mígnem ha a reakcióelegy szerves oldószer tartalmának 25%-a metanol, a keletkezett metil észter mennyisége nagyon alacsony lett (4% az észteresítéssel), vagy egyáltalán nem keletkezett termék (átészteresítés) (22b. ábra). Ha a metanol mennyisége $\geq 30\%$, nem képződik észter,

illetve nem történik átészteresítés. Korábbi vizsgálataink alapján, amelyek a különböző oldószerek hatásának feltérképezésére irányultak, megállapítottuk, hogy amennyiben metanol a reakció teljes közege, egyik reakció sem játszódik le.



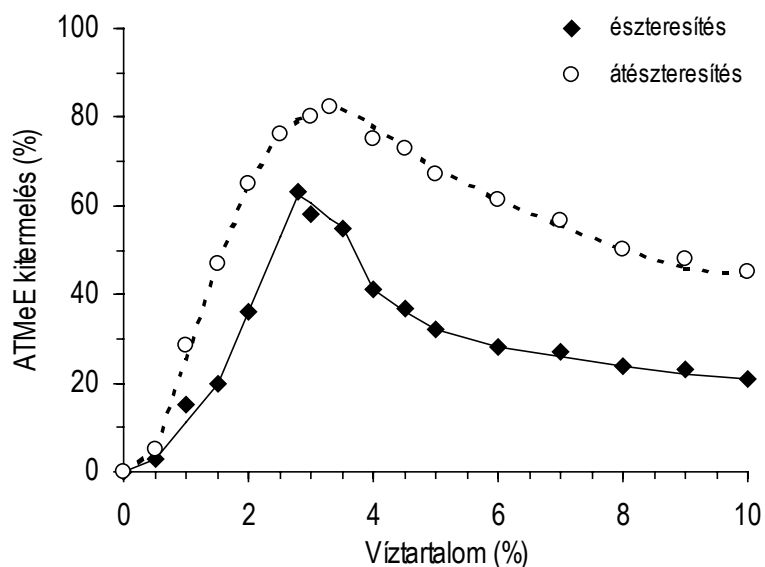
22. ábra. N-acetil-L-tirozin metil észter képződés szubsztrát koncentráció függése α -kimotripsinnel megvalósított direkt- és átészteresítési reakciókban. (a) aminosav szubsztrát (N-acetil-L-tirozin; AT a direkt észteresítési reakcióban és N-acetil-L-tirozin etil észter; ATEE az átészteresítési reakcióban), (b) alkohol szubsztrát (Reakcióidő: 3 óra, 30°C-on).

Így összegezve megállapíthatjuk, hogy a metanol gátló hatást fejtett ki egy bizonyos koncentráció felett az enzim működésére (László és Simon, 1998). Ezért, hogy a reakciók valós alkohol koncentráció függését tanulmányozhassuk, kiválasztottuk az 1-butanolt reakciópartnernek, mely nagyobb koncentrációban sem fejt ki gátló hatást az enzimre, és ezzel az alkohollal is végrehajtottuk az alkohol koncentráció függés

vizsgálatainkat. Ennek eredményeként azt állapítottuk meg, hogy mind az észterezés, mind az átészterezés telítési görbe szerint megy végbe a butanol koncentrációjának növekedésével, s gyakorlatilag mindkét reakció akkor megy végbe a legjobb kitermeléssel, ha a reakció közege is maga az adott alkohol, kivéve a metanol esetében (adatok nincsenek feltüntetve).

4.3.1.6. A reakcióelegy víztartalmának hatása az észterszintézisre és az átészterezésre

A szerves oldószeres közegű biokatalitikus folyamatok kritikus kérdése a víztartalom, mert minden határon túl nem növelhetjük a rendszer víztartalmát, ugyanis ezzel elősegítenénk a hidrolitikus reakciót, ami egyben a szintetikus folyamat háttérbe szorulásával járna. Ezért nagyon fontos az optimális víztartalom meghatározása. Kísérleteinkben a reakcióelegyek víztartalmát 0 és 10% között változtattuk (23. ábra), és a reakciókat 30°C-on az előzőekben megállapított optimális enzim- és szubsztrát koncentrációkkal hajtottuk végre. Víz nélküli rendszerben a vizsgált reakciók nem mentek végbe.



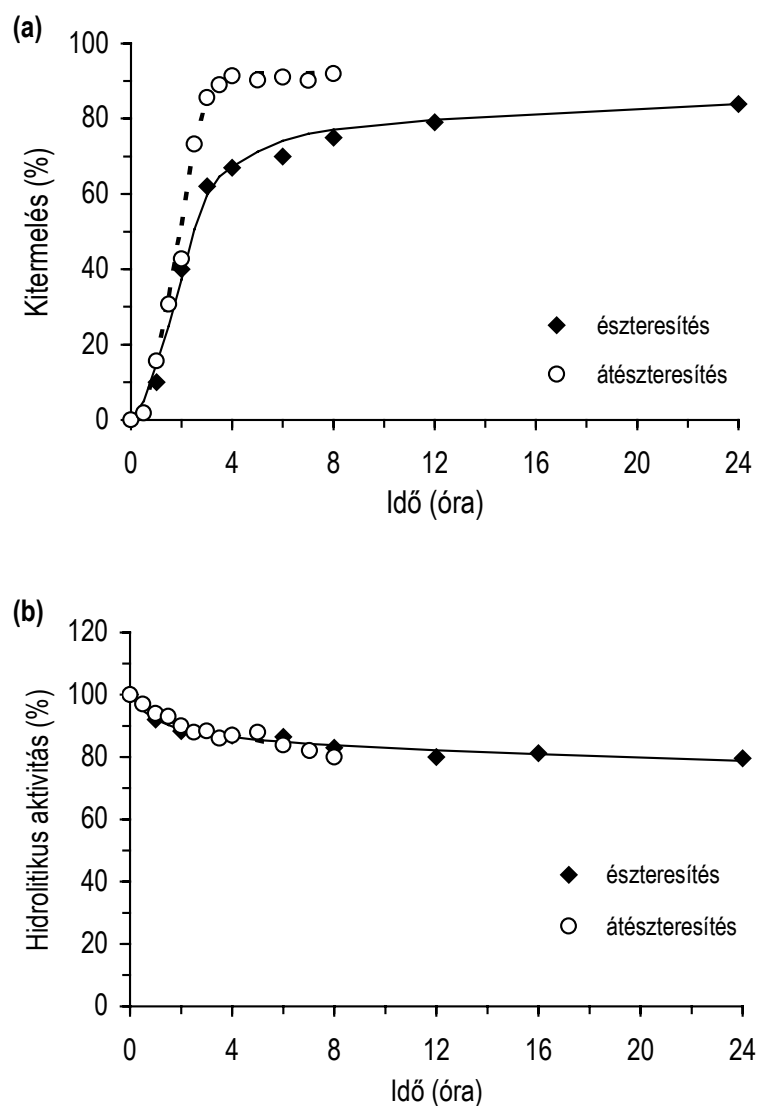
23. ábra. N-acetil-L-tirozin metil észter szintézis α -kimotripsinnel különböző víztartalom mellett (Reakcióidő: 3 óra, 30°C-on).

A direkt észterezés víztartalom függés görbéje éles maximumot mutat, s ha az optimálisnál több vizet teszünk a rendszerbe, akkor a konverzió csökken. Az észterszintézis során a legnagyobb mennyiségű terméket akkor kaptuk, amikor a reakcióelegy víztartalma 2,8% volt. Az átészterezési reakcióra nézve hasonló

eredményeket kaptunk, de az optimumgörbe nem mutat olyan éles maximumot, mint a direkt észteresítésnél. Az átészteresítési reakció optimuma 3,3% víztartalom. A víz mennyiségének e koncentrációk fölé emelésével a kitermelés csökken és 8-10% víz jelenlétében az észteresítés során kapott észter mennyisége már csak 20-25%, míg az átészteresítésé még 45-50%.

4.3.1.7. Az *N*-acetyl-L-tirozin metil észter szintézisek **időfüggése** optimális körülmények között

Az α -kimotripszin által katalizált AT és metanol között lejátszódó észterképződési reakció, és az ATEE és a metanol közötti átészteresítés időfüggését vizsgáltuk acetonban optimalizált körülmények között. A direkt észteresítést 30°C-on, pH 7,0-en, 2,8% víztartalom és 1,5 mg mL⁻¹ enzim koncentráció mellett, 0,05 mmol *N*-acetyl-L-tirozinnal és 10% metanollal végeztük (5,125 mL térfogatban). Az átészteresítési reakciót 40°C-on, pH 7,5-en, 3,3% víztartalom és 0,5 mg mL⁻¹ enzim koncentráció mellett, 0,05 mmol *N*-acetyl-L-tirozin etil észterrel és 10% metanollal hajtottuk végre. Mindkét reakció telítési görbe szerint ment végbe, bár kétségtelenül az átészteresítés sokkal rövidebb idő alatt érte el a maximumot (24a. ábra). Míg a direkt észteresítés gyakorlatilag 24 óra elteltével érte el a kitermelés maximumát (83,9% észter), s tovább már csak nagyon kis mértékben nőtt (3-4%) az észter mennyisége, addig az átészteresítési reakció már 4 óra múlva telítésben volt (91,4%). A vizsgálatokkal párhuzamosan megmértük az α -kimotripszin hidrolitikus aktivitásának változását is a reakcióelegyekben. Az enzim hidrolitikus aktivitása kis mértékben csökkent az idő előrehaladtával mindkét reakció során, s a 97,2% aceton tartalmú reakcióelegyben (a direkt észteresítési reakcióelegy) 7 nap elteltével is még több, mint 50%-át megőrizte az enzim kiindulási aktivitásának (adatok nincsenek feltüntetve). Az átészteresítési reakciót 8 órán keresztül vizsgáltuk, mivel a reakció már fele annyi idő alatt is elérte maximumát, s 8 óra elteltével az enzim hidrolitikus aktivitása a 96,7% aceton tartalmú reakcióelegyben még mindig gyakorlatilag 80% volt, míg ugyanennyi idő alatt a direkt észteresítési reakcióelegyben az enzim hidrolitikus aktivitása 83% volt (24b. ábra).



24. ábra. (a) N-acetil-L-tirozin metil észter képződés időfüggése α -kimotripszinnel direkt- és átészteresítési reakciókban, optimalizált körülmények között, (b) az α -kimotripszin hidrolitikus aktivitásának változása az észteresítés és az átészteresítés során 25°C-on.

4.3.2. Észteresítési és átészteresítési reakciók rögzített enzimekkel

A fenti észteresítési és átészteresítési reakciókat elvégeztük különböző hordozókhoz rögzített kimotripszinnel is. Vizsgálatainkhoz az α -kimotripszint a korábban leírtak szerint Akrilex C-100, Akrilex P-100 és p-benzokinonnal aktivált Szilokróm hordozókhoz rögzítettük kovalens kötással. Az így kapott enzimkészítményeket használtuk észteresítési és átészteresítési reakciókban. A reakcióelegyek 3,6 U rögzített enzimet tartalmaztak. A reakciókat 30°C-on 48 órán át kevertettük (450 rpm), különböző időpillanatokban (3, 6, 24 és 48 óra) mintát vettünk a

reakcióelegyekből és mértük az észter mennyiségét. Eredményeinket (24 órás adatok) az 4. táblázat foglalja össze. Az észteresítésre nézve a p-benzokinonnal aktivált Szilokróm volt a legjobb hordozó (31,3% ATMeE), míg az átészteresítés esetén az Akrilex P-100 hordozóra rögzített enzimmal kaptuk a legnagyobb kitermelést (50,5% ATMeE), bár a Szilokróm-kimotripsinnel is hasonlóan magas észterhozamot lehetett elérni (44,6% ATMeE). Az Akrilex C-100 hordozó egyik reakció szempontjából sem bizonyult kedvezőnek, hiszen mindkét reakció esetében csak 5-12% termékkepződést tapasztaltunk 24 óra alatt.

4. táblázat. N-acetil-L-tirozin metil észter képződése N-acetil-L-tirozinból és metanolból direkt észteresítéssel, valamint N-acetil-L-tirozin etil észterből és metanolból átészteresítéssel különböző rögzített α -kimotripszin formákkal acetonban 30°C-on (24 óra reakcióidő, a reakcióelegyekben 3,6 U enzimegység volt).

Enzim	ATMeE kitermelés(%)	
	Átészteresítés	Észteresítés
Akrilex C-kimotripszin	12,3	5,2
Akrilex P-kimotripszin	50,5	11,8
p-Szilokróm-kimotripszin	44,6	31,3

5. DISZKUSSZIÓ

A fehérjemolekulákat vizes oldatban egy hidrátburok veszi körül, és az enzim molekulák natív konformációját a H-hidak, elektrosztatikus- és hidrofób kölcsönhatások bonyolult hálózata biztosítja. A katalitikusan aktív konformáció fenntartásában a hidrofób kölcsönhatások játszzák a domináns szerepet (Tanford, 1978). A szerves oldószerek azáltal fejtik ki aktivitás/stabilitás csökkentő hatásukat, hogy a fehérje hidrátburokában lévő vízmolekulák egy részével helyet cserélve a szerves oldószer molekulái beépülnek az enzim hidrátburokába, vagy úgy befolyásolják a fehérje szerkezetét, hogy közvetlen kölcsönhatásba lépnek a fehérjék solvatációs helyeivel hidrofób kölcsönhatások, vagy akár hidrogénkötések révén. Továbbá az oldószer beépülhet az enzim szerkezetébe is, a szerkezeti vizet helyettesítheti, lazíthatja a hidrofób kölcsönhatásokat. Azok az oldószerek lesznek az enzim számára kedvezőek, melyek a legkevésbé kedvezőtlen hatást fejtik ki az enzim katalitikusan aktív konformációjára, vagyis úgy helyettesítik a vízmolekulákat a fehérje hidrátburokában, hogy ezzel nem módosítják jelentősen a fehérjében a hidrofób kölcsönhatásokat (Khmelnitsky és mtsai, 1988). Egyes oldószerek (pl. DMSO, DMF) olyan mértékben megváltoztathatják (csökkentik) az enzim molekulák hidratáltsági állapotát, mely lehetetlenné teszi a katalitikusan aktív konformáció fennmaradását, s ennek eredményeként az enzim denaturálódik, aktivitását veszti. Valójában tehát a megfelelő kölcsönhatások megváltozásán keresztül a hidrátburok sérülése lehet az egyik fő oka a fehérjék szerves oldószerekben megfigyelhető inaktiválódásának (Arakawa és Goddette, 1985; Khmelnitsky és mtsai, 1991).

Mivel a fehérjék stabilitása erősen függ hidratáltságuktól és a szerves oldószerek jelentősen befolyásolják a fehérjék hidratáltsági állapotát és szerkezetét, így ezen keresztül tudnak hatást gyakorolni az enzimek aktivitására/stabilitására.

5.1. STABILITÁSVIZSGÁLATOK OLDOTT ENZIMMEL

A kimotripszin stabilitását vizsgáltuk különböző vízzel elegyedő (etanol, dioxán, aceton, acetonitril és DMSO) és vízzel nem elegyedő (toluol és etilacetát) szerves oldószerekben.

A vízzel elegyedő oldószerek közül a legjobb stabilitást az enzim dioxánban mutatta, míg DMSO-ban rövid időn belül inaktiválódott. Etanolban, dioxánban, acetonban és acetonitrilben az enzim aktivitása a növekvő oldószer koncentrációval

először csökkent, elérve egy minimum értéket (50% oldószer koncentrációnál), majd ezt követően a növekvő oldószer koncentrációkkal emelkedő aktivitás értékeket kaptunk. Ezekben az oldószerekben az enzim magasabb oldószer koncentrációk esetében is meglepően jó stabilitást mutatott. Hasonló jelenséget írtak le Moszolov és munkatársai (1968) tripszinnel, ahol 50-60% dioxán tartalmú elegyekben tapasztalták az enzim aktivitásának minimumát és magasabb oldószer koncentrációknál ismét magasabb aktivitás értékeket kaptak.

Kísérleteinkben a DMSO a másik négy oldószerrel eltérően viselkedett, ugyanis 50% oldószer jelenlétében az enzim aktivitását már 5 perc alatt teljesen elveszítette. Khmelnitsky és mtsai (1988) szerves oldószeres savas foszfatáz aktivitására kifejtett hatását tanulmányozva, ehhez hasonló eredményeket kaptak DMF alkalmazásakor. Kísérleteinkben a savas foszfatáz enzim gyakorlatilag 60% DMF tartalmú rendszerben csaknem teljesen inaktív volt, s magasabb oldószer koncentrációknál már egyáltalán nem mutatott katalitikus aktivitást. Szubtilizinnel végzett vizsgálatokban kimutatták, hogy DMSO-ban az enzimben mind az α -hélix, mind a β -lemez szerkezet mennyisége drasztikusan lecsökkent a vizes közegben leírtakhoz képest (α -hélix 34% \rightarrow 6%; β -lemez: 19% \rightarrow 5%). S emellett még mintegy 27%-nyi denaturált β -lemez struktúrát is találtak az enzimben (Xu és mtsai, 1997).

Vizsgálatainkban a fehérjeszerkezet változása okozta enzim aktivitás csökkenés elért egy minimum pontot, mely fölötti oldószer koncentrációk alkalmazásánál már aktivitás növekedést tapasztaltunk. Magasabb oldószer koncentrációk esetén az oldószernek a fehérje hidrátburkával, solvatációs helyeivel létrejövő kedvező kölcsönhatásai (pl. hidrogénkötések) számának növekedése jelentősen elősegíti az enzim katalitikus aktivitásának, s egyben az aktív konformációnak a megőrzését (Partridge és munkatársai, 1999). Másrészt viszont Simon és mtsai (2001) leírták tripszin és α -kimotripszin esetében etanolban, dioxánban és acetonitrilben, hogy a fehérjék másodlagos szerkezete az oldószer koncentrációjától függően jelentősen megváltozik. A vizes környezetben dominánsan β -lemezekből felépülő α -kimotripszinben például 50% etanolt tartalmazó elegyben jelentősen megnövekszik az α -helikális struktúrák százalékos aránya. 50% acetonitril tartalmú elegyben viszont még jelentősebb az α -hélixek számának növekedése, miközben igen drasztikusan lecsökken a β -lemezek mennyisége. Emellett a 80% acetonitril-víz rendszerben már a vizes közeghez hasonló másodlagos szerkezeti összetétel jellemző az α -kimotripszinre. Ez mindenképpen alátámasztja azt a feltételezést, hogy nagyobb oldószer koncentrációk

alkalmazásakor egy aktív, a natívhoz hasonló fehérjeszerkezet alakul ki, s ez okozza az 50% oldószer tartalmú elegyekben megfigyelthez képest magasabb enzimaktivitásokat.

Összefoglalva tehát, vizsgálatainkban az enzim stabilitása a vízzel elegyedő oldószerekben, a legkedvezőbb oldószertől kiindulva a következőképpen alakult: dioxán > acetón > etanol > acetonitril > DMSO. Nem találtunk összefüggést az enzim stabilitása és az illető oldószer log P értéke között, viszont korreláció van az oldószer dielektromos állandója és az enzim adott oldószerben megfigyelt stabilitása között. Eszerint minél nagyobb az oldószer dielektromos állandója (dioxán < acetón < etanol < acetonitril < DMSO), annál kevésbé kedvező az illető oldószer az enzim stabilitása szempontjából.

Battistel és Bianchi (1993) ribonukleáz A-val végeztek stabilitás vizsgálatokat szerves oldószerekben és tanulmányozták, hogy a közeg fizikai-kémiai paraméterei milyen korrelációt mutatnak az enzim stabilitásával. Megállapították, hogy az oldószer Hildebrand oldékonysági paramétere (a párolgáshővel arányos, erősen függ az oldószer molekulák közötti poláros kölcsönhatásoktól), valamint dipólus momentuma (egy molekula elektrosztatikus asszimetriája) és az enzim stabilitása között nincs egyértelmű összefüggés. Ugyanakor az oldószer log P értéke (hidrofóbicitás mértéke) és az enzimstabilitás között gyenge korrelációt véltek felfedezni, de egyértelműen megállapították, hogy a közeg dielektromos állandója az enzim stabilitásával legjobban összevethető paraméter. Ez feltételezi, hogy az elektrosztatikus erők fontos szerepet játszanak a fehérjék stabilizálásában szerves oldószerekben.

A vízzel nem elegyedő oldószerekkel (toluol és etilacetát) végzett kísérleteink azt mutatták, hogy ezen oldószereknek a kimotripszin stabilitására kifejtett hatása sokkal kedvezőbb volt, mint a vízzel elegyedőké. Az etilacetát-víz elegyekben gyakorlatilag nem csökkent a kimotripszin stabilitása, s az inkubálási idő kezdetén kis mértékben még növekedett is. Toluolt tartalmazó rendszerekben pedig kis mértékű (10-15%) aktivitás csökkenést figyeltünk meg. Egyes szerzők szerint akár több tízszeres is lehet az enzimek aktivitás növekedése egyes oldószerekben a vizes rendszerben megfigyelthez képest (Singh és Wang, 1979; Sakurai és mtsai, 1981). Irodalmi adatok tanuskodnak arról, hogy az enzimek konformáció-stabilitása erősen poláros oldószerekben kedvezőtlenül alakulhat, ellenben hidrofób oldószerekben jobb stabilitási eredményeket kaphatunk (Brink és mtsai, 1988; Bell és mtsai, 1995). Ennek oka az, hogy ezek az oldószerek kevésbé tudnak kölcsönhatásba lépni a vizes fázisban lévő fehérje molekulákkal, lévén, hogy korlátozott a vízben való oldékonyságuk, így

denaturáló hatásuk is kevésbé tud érvényesülni. Valójában az enzim számára egy kétfázisú rendszerben a denaturációra potenciális veszély, a folyadék-folyadék határfelületen állhat fenn (Brink és mtsai, 1988; Ghatorae és mtsai, 1994).

Az inaktiválódási kinetikákra vonatkozó vizsgálatainkból kitűnik, hogy a szerves oldószerek nem változtatták meg az inaktiválódás lefolyását a vizes közegben ismert, kétlépcsős mechanizmushoz képest (Kumar és Hein, 1970). Kb. 30 perc alatt az enzim gyorsan elveszítette aktivitásának nagyobb százalékát, majd ezt követően lassabban, de fokozatosan csökkent az aktivitása. Lozano és mtsai (1996) Celitre adszorbeáltatott α -kimotripszin stabilitását vizsgálták vízzel elegyedő oldószerekben (pl. DMF, DMSO, THF), és szintén az enzim kétlépcsős inaktiválódását tapasztalták a vizsgált oldószerekben.

5.2. ENZIMSTABILIZÁLÁSI VIZSGÁLATOK ÉRTÉKELÉSE

5.2.1. Enzimrögzítési kísérletek értékelése

A kimotripsint kovalens kötással rögzítettük különböző hordozókhoz. Hordozóként poliakrilamid alapú gyöngypolimer anyagokat (Akrilex C-100 és P-100) és szilika alapú, p-benzokinonnal aktivált Szilokrómot használtunk. A különféle rögzített enzimformák mindegyike katalitikus aktivitással rendelkezett, de az egy gramm gélen kötött enzimegységek száma, a kötődött fehérje mennyisége és az aktivitás a hordozótól függően eltéréseket mutatott. Az inaktiválódás mértéke a p-benzokinonnal aktivált Szilokrómhoz való kapcsoláskor volt a legnagyobb. Így bár fehérjekötő kapacitás szempontjából ez a gél bizonyult az egyik legjobbnak, aktivitásra nézve a legkevésbé hatásosnak számított a vizsgált hordozók közül. A legnagyobb aktivitású rögzített enzimet a karbodiimiddel aktivált Akrilex C-100-hoz való kötással kaptunk ($204,1 \text{ U g}^{-1}$ száraz gél). Az enzimek kovalens kötéskor tapasztalható aktivitás veszteségének 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 (Slegers és munkatársai, 1986; Martinek és munkatársai, 1977).

Fischer és munkatársai (1980) különböző szilika származékokhoz és poliakrilamidhoz kötötték a kimotripsint. A poliakrilamidhoz kötött α -kimotripszin katalitikus aktivitása ($2,7 \text{ U g}^{-1}$ száraz gél) bizonyult a legjobbnak a különböző szilika származékokhoz képest. Összehasonlítva a poliakrilamidhoz kötött α -kimotripszint, valamint a szilikához kereszt kötött kimotripszint megállapították, hogy bár a kötődött

fehérje mennyisége közel azonos volt, a poliakrilamid-kimotripszin a rendszerbe vitt aktivitásának 95%-át megőrizte, míg a szilikához keresztköve rögzített kimotripszin csak 33%-át. Ezzel szemben Kotormán és mtsai (1994) glükóz-6-foszfát dehidrogenáz különféle Akrilex, valamint Szilokróm és Sorsilen hordozókhoz rögzítésével azt tapasztalták, hogy a különféle poliakrilamid hordozókhoz a rendszerbe vitt aktivitásnak 40-50%-a rögzült, míg a Szilokróm és a Sorsilen hordozókhoz a felvitt aktivitás 85-99%-a.

5.2.2. Rögzítés stabilizáló hatásának értékelése

A különböző rögzített enzimformák stabilitását tanulmányoztuk etanolban, acetonitrilben és dioxánban. Mindhárom oldószerben összehasonlítottuk az oldott és a rögzített enzimek stabilitásait. Megállapítottuk, hogy mindegyik rögzített enzim stabilabb volt valamennyi oldószerben az oldott enzimhez képest. Etanolban a három rögzített enzim hasonló stabilitást mutatott és ebben az oldószerben volt a legnagyobb mértékű a rögzítéssel elért stabilizáló hatás. Acetonitrilben és dioxánban is a Szilokrómhoz rögzített kimotripszin volt a legstabilabb. Eredményeink összhangban vannak más enzimekre vonatkozó adatokkal, melyek szerint a rögzítés növeli az enzimek stabilitását hagyományos közegben, csakúgy mint kevés vizet tartalmazó, szerves oldószeres közegben (Blanco és mtsai, 1992b; Clark, 1994).

Az oldott proteázok esetében tapasztalt aktivitás veszteség egyik lehetséges oka az autolízis, melyet az oldat pH-ja és a hőmérséklet is befolyásol (Kumar és Hein, 1970). Ha rögzítünk egy proteázt, az megakadályozhatja az önmérsztést úgy, hogy megvédi az enzimmolekulákat egymástól, s ezáltal az enzim stabilitása növekedhet. Másrészt az enzimek szerves oldószer okozta inaktiválódása gyakran fehérje "unfolding"-gal kezdődik, vagyis a fehérje kitekeredésével, aktív konformációjának elvesztésével indul. Ezért, mivel egy adott hordozóhoz többpontos kovalens kötéssel rögzített enzim nagyfokú konformációs rigiditással bír, így következképpen megőrzi aktivitásának nagy részét (Mozhaev, 1998).

Az Akrilex hordozók két típusa között nem találtunk nagyobb eltérést, bár a rögzítéskor alkalmazott aktiválószer eltérő volt és ezáltal az enzim azonos oldalláncon, de más funkciós csoportokon keresztül kötődik a hordozókhoz, azonban úgy tűnik nagyobb szerepet játszik a hordozó alaptípusa. Ezért mivel mindkét gél poliakrilamid típusú, így nagy mértékű hasonlóságot tapasztaltunk a rögzített kimotripszin stabilitásában. A Szilokróm hordozó bizonyult a leghatásosabbnak az α -kimotripszin

rögzítésére, ugyanis az enzim e hordozóhoz kötődve mutatott legnagyobb mértékű stabilizálódást mindegyik oldószer esetében. Adlercreutz (1991) szerint az enzimaktivitás szerves közegben függ a hordozó vízmegkötő képességétől, és azt tapasztalta, hogy nagyobb enzimaktivitás érhető el, ha kis vízmegkötő képességű hordozóra rögzítjük az enzimet. Ezzel jó egyezésben vannak eredményeink, hiszen amíg az Akrilex hordozók nagy vízmegkötő képességűek, addig az enzim számára legjobb Szilokróm hordozó vízmegkötő képessége kicsi.

5.2.3. Additívek stabilizáló hatásának értékelése

Vizsgálataink során az Akrilex C-100-hoz, Akrilex P-100-hoz és p-benzokinonnal aktivált Szilokróm hordozóhoz rögzített α -kimotripsint szerves oldószeres közegbe helyeztük (etanol, dioxán és acetonitril), s különböző additíveket adtunk a rendszereinkhez. Az alkalmazott additívek ún. polihidroxi vegyületek voltak: glükóz, laktóz, szorbit és polietilén glikol. Vizsgálataink során megállapíthattuk, hogy az additívek szerves oldószeres közegekben vagy nem befolyásolták az enzimaktivitásokat, vagy stabilizálták a rögzített enzimeket a szerves oldószerekben. Az Akrilex C-100-ra rögzített kimotripszin esetében a szorbit, az Akrilex P-100-nál a glükóz, a Szilokróm-enzimnél pedig a laktóz bizonyult a leghatékonyabb stabilizálónak.

Az egyes additívek stabilizáló hatása általában jelentős volt, de a stabilizálás mértéke lényegesen eltért az egyes rögzített enzimformák esetében a különböző oldószerekben. A polihidroxi vegyületek stabilizáló hatásának mechanizmusa molekuláris szinten nem ismert, de feltételezhetően azáltal fejtik ki stabilitást növelő hatásukat, hogy kölcsönhatásba lépnek a rendszerben lévő vízmolekulákkal, saját hidratációjukhoz vizet vonnak el a környezetükből, csökkentik a vízaktivitást, módosíthatják a közeg fizikai-kémiai tulajdonságait, s ezáltal megváltoztathatják (növelik) az enzimek stabilitását is. Hatásuk függ az additív természetétől és koncentrációjától is (Combes, 1992; Mejri és Mathlouthi, 2001), mely magyarázatul szolgál arra, miért fejtenek ki egyes esetekben különböző hatást a fentebb említett additívek.

Az additívek hatása - talán csak a glükózt kivéve - hasonló volt az Akrilex-C- és az Akrilex-P-kimotripszinre mindegyik oldószerben, azonban stabilizáló hatásuk gyengébb volt a Szilokróm-enzimet tartalmazó rendszerekhez képest. Megállapíthatjuk, hogy az additívek eltérő hatása a rögzített enzimek stabilitására összefüggésbe hozható a hordozó karakterével. Az Akrilex hordozókhöz kötött enzimek hasonló

viselkedésének oka valószínűleg azzal van összefüggésben, hogy az Akrilex C és P szerkezetileg hasonló, poliakrilamid alapú, hidrofil, nagy vízmegkötő képességű hordozók. A kis mértékű különbségek oka pedig az, hogy más-más funkciós csoportok vesznek részt a rögzítésben. Ha az enzimet a szilika-alapú Szilokróom hordozóhoz rögzítettük, mely alacsony vízmegkötő képességű, azt figyelhettük meg, hogy az aditívek stabilizáló hatása sokkal kifejezettebb volt, mint az Akrilex-enzimek esetében. A hordozó vízmegkötő képessége tehát fontos tényező az enzim szerves közegben mutatott stabilitása szempontjából, hiszen az enzim mikro környezetében lévő víz mennyisége jelentősen befolyásolja az enzim katalitikus tulajdonságait.

Másrészről figyelembe kell vennünk, hogy az oldószer tulajdonságai is befolyásolhatják az aditívek stabilizáló hatását. Aditív alkalmazása nélkül mindegyik rögzített enzimforma inaktiválódása acetónitrilben volt a legnagyobb, ugyanakkor az aditívek stabilizáló hatása éppen ebben az oldószerben volt a legnagyobb mértékű. Általában megállapítottuk, hogy az aditívek stabilizáló hatásának mértéke hasonló volt etanolban és dioxánban, és az Akrilex-enzimek számára elsősorban a glükóz és a szorbit volt a legjobb stabilizálószer, míg a Szilokróom-enzim számára a laktóz.

Adlercreutz (1993) hasonlóan a szorbitot találta a Celitre kötött α -kimotripszin számára hatásosnak diizopropil éterben. Nyilvánvaló, hogy a fehérjék stabilitását komplex rendszerben kell értelmeznünk, mely tartalmazza magát a fehérjét, s a rendszer egyéb összetevőit, így a hordozót, az aditívet, a szerves oldószert és a vizet. A poliolok stabilizáló hatását annak következményeként kell tekintenünk, hogy azok megváltoztatják a víz eloszlását a rendszerben, így befolyásolhatják az enzim számára elérhető vízmolekulák számát, és ezzel az enzim stabilitását (Öste-Triantafyllou és mtsai, 1995).

5.3. ÉSZTERESÍTÉSI ÉS ÁTÉSZTERESÍTÉSI REAKCIÓK ÉRTÉKELÉSE

N-acetil-L-tirozin és alkoholok közötti direkt észteresítési reakciót, valamint N-acetil-L-tirozin etil észter és alkoholok közötti átészteresítést tanulmányoztuk szerves oldószerekben. Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy az átészteresítési reakció lényegesen gyorsabban ment végbe, mint a direkt észteresítés, ami annak tulajdonítható, hogy átészteresítéskor egy, már eleve aktivált szubsztrát molekulából indulunk ki (ATEE), s így a reakció lejátszódásához szükséges aktiválási energia jóval kisebb, mint direkt észter szintézisekor. Mivel az AT észteresítése és az ATEE átészteresítése metanollal ugyanazon átmeneti terméken (N-acetil-L-tirozin-enzim intermedier)

keresztül megy végbe, és a dezacilálási lépések is ugyanazok a két esetben, ezért Kise és Hayakawa (1991) szerint a két reakció sebessége közötti eltérés abból adódik, hogy a katalízis acilálási folyamata gyorsabb átészteresítéskor. Vagyis a szubsztitúció (átészteresítés) gyorsabban megy végbe, mint a kondenzáció (észteresítés), mert az észter szubsztrát gyorsabban acilálja az enzimet, mint a sav szubsztrát.

5.3.1. Szintetikus reakciók alkohol szubsztrát függése

A különféle normál láncú és elágazó alkoholokkal végzett kísérletek arra az eredményre vezettek, hogy habár az észteresítés és az átészteresítés különböző alkoholokkal eltér egymástól, általánosságban elmondhatjuk, hogy az elágazó láncú alkoholok kevésbé kedvező szubsztrátjai ezeknek a reakcióknak.

Shih és mtsai (1997) N-védett aminosavak és szekunder alkoholok közötti észterképződést vizsgáltak különféle szerves oldószerekben nagyszámú enzimmel és megállapították, hogy bár a kitermelés nagy mértékben függ attól, milyen biokatalizátorról van szó, de általában alacsony hozamokat kaptak a legtöbb enzimmel. Az elágazó alkoholok elsősorban szterikus okok miatt többnyire nem kedvező szubsztrátok az enzimek számára, másrészt alkoholos hidroxilcsoportjuk oxigénatomjának csökkent nukleofilitása csökkenti az észter kialakulásának lehetőségét (Shih és mtsai, 1997). A direkt észteresítés során azt tapasztaltuk, hogy a normál láncú primer alkoholok esetén a kitermelés csökkent a primer alkohol molekulában lévő szénatomok számának növekedésével. Ezek alapján feltételezhető, hogy a hosszabb szénláncú alkoholok kevésbé jól tudnak beilleszkedni a szubsztrátkötő zsebbe, s ezáltal kevésbé reaktívak. Ismert tény, hogy az enzimek nagy mértékben rigidek szerves oldószerekben (Broos és mtsai, 1995) és a szerkezeti inflexibilitás is megakadályozhatja, hogy az enzim aktív centruma elfogadja a hosszabb láncú alifás alkoholokat.

5.3.2. Észteresítési és átészteresítési reakciók függése az oldószertől

Mivel egy szerves oldószeres közegű enzimátikus reakcióban nagy jelentősége van a megfelelő oldószer kiválasztásának, hiszen a nem helyesen megválasztott oldószer inaktiválhatja az enzimet, így mindkét reakciót tanulmányoztuk különböző hidrofil és hidrofób szerves oldószerekben is. A vízzel elegyedő oldószerek közül az aceton volt a legjobb közeg az α -kimotripszin számára. Ugyanakkor metanolban és DMSO-ban egyáltalán nem képződött észter.

Kise és Shirato (1988) azt találták, hogy kimotripszin katalizálta N-acetil-L-triptofán és tirozin etil észterek képződése a legnagyobb kitermeléssel acetonban és etanolban ment végbe. Phillips és mtsai (1990) N-acetil-L-triptofán észteresítését vizsgálva különféle alkoholokban, mint reakcióközegben és egyben szubsztrátban α -kimotripszinnel, nem tapasztaltak termékképződést metanolban és tercier-butanolban, csakúgy, mint Kise és Shirato (1988) DMSO-ban, DMF-ban vagy dimetilacetamidban, valamint Kise és Hayakawa (1991) N-acetil-tirozin észteresítését vizsgálva metanolban és DMF-ban. Zaks és Klibanov (1988a) feltételezték, majd Phillips és mtsai (1990) bebizonyították különböző metanol:etanol összetételű elegyek alkalmazásával, hogy a metanol erős inhibitora a különféle enzimeknek (pl. szubtilizin, α -kimotripszin), s valószínűleg a fehérje dehidratációja által fejt ki gátló hatását. Mindezekkel összhangban vannak eredményeink is, melyekben a metanol koncentráció függését tanulmányoztuk és azt találtuk, hogy amennyiben a reakcióelegy metanol tartalma $\geq 25-30\%$, egyáltalán nem képződik termék, melynek nyilvánvaló oka az előzőek szerint a metanol enzimaktivitást gátló hatása. N-acetil-L-arginin és etanol közötti tripszinnel végrehajtott észteresítési reakciót vizsgálva acetónitrilben hasonló megfigyelést írtunk le, hiszen 13% etanol koncentráció felett a kitermelés mértéke már jelentősen csökkent, tehát az etanol is egy adott koncentráció felett gátló hatást fejtett ki az enzim aktivitására (Simon és mtsai, 2000).

Moresoli és mtsai (1992) fenilalanin propil észter 1,4-butándiollal való átészteresítését tanulmányozták DMSO-t tartalmazó közegben kimotripszinnel. Azzal a céllal alkalmazták a DMSO-t, hogy az mint poláros szerves oldószer, csökkenti a rendszerben a víz koncentrációját, s ezáltal csökkenti a hidrolízist, ami pedig az átészteresítési reakció hozamát növeli. Megállapították, hogy 20%-nál nagyobb mennyiségben alkalmazva a DMSO-t, az átészteresítési reakció produktivitása csökkent, s ezt azzal magyarázták, hogy a DMSO gátló hatást fejt ki az enzimre, az acil-enzim intermedier keletkezésére.

Vizsgálatainkban nem találtunk összefüggést az alkalmazott oldószer polaritása és log P értéke között. Castro (1999) szerint feltételezhető, hogy nemcsak az oldószer polaritása, hanem a reakcióelegy más fizikai-kémiai paraméterei, és az enzim mikrokörnyezete is befolyással van az enzim szintetáz aktivitására.

5.3.3. Észteresítési és átészteresítési reakciók egyéb körülményeinek optimalizálása

A direkt- és az átészteresítési reakciók enzim-, szubsztrát koncentráció, pH, hőmérséklet és víztartalom függését tanulmányoztuk, és megállapítottuk, hogy jelentős különbségek vannak az enzim koncentrációk, valamint a hőmérsékleti optimum között a kétféle reakció esetén. Ellenben nagyon hasonló eredményeket kaptunk a direkt- és átészteresítésre az optimális alkohol- és aminosav szubsztrát koncentrációra, pH-ra és víztartalomra.

Az észteresítési és az átészteresítési reakcióban is az optimális aminosav:alkohol mol arány 1:246 volt. A szerves oldószeres közegekben megvalósított szintetikus reakciókban alkalmazott szubsztrát koncentrációk nagyon változatos képet mutatnak, és nagy mértékben függenek a vizsgált enzim milyenségétől, illetve a vizsgált reakciótól és maguktól a szubsztrátoktól is. Kimotripszin katalizálta észteresítésekben Kise és Shirato (1988) 1: 171, Phillips és mtsai (1990) 1:2500, Blanco és mtsai (1992a) 1:40, Wehtje és mtsai (1992) 1:85 aminosav:alkohol mol arányokat alkalmaztak. Shih és mtsai (1997) 1:11 aminosav:alkohol arányokkal hajtottak végre direkt észteresítéseket a legkülönbélebb enzimekkel (pl. pepszin, lipáz, tripszin). Tripszines észterszintézisekben 1:2000 aminosav:alkohol arányokat alkalmaztunk (Simon és mtsai, 2000). A reakciók során az aminosav szubsztrát mennyisége 5 mM volt, ezzel szemben az etanolt az aminosav szubsztráthoz viszonyítva nagy feleslegben alkalmazva (10 M) értünk el jelentős konverziót. Kawashiro és mtsai (1996) különféle N-trifluoracetyl-fenilalanin észterek és 1-propanol között lejátszódó átészteresítési reakciókat vizsgálták acetónitrilben és toluolban kimotripszinnel és szubtilizinnel és ehhez az aminosav:alkohol arány 1:100 volt. Affleck és mtsai (1992) szubtilizinnel végeztek átészteresítéseket THF-ban és az aminosav:alkohol arányokat 1:20-1:100 között változtatták.

A közeg pH-ja jelentősen befolyásolja az enzimek aminosav oldalláncainak protonáltsági állapotát, s ezáltal az enzim katalitikus aktivitását. A pH függés vizsgálatok azt mutatták, hogy a szerves oldószeres közegekben megvalósított észteresítés és átészteresítés optimális pH értéke nagyon hasonló egymáshoz (pH 7,0 és 7,5). Ezek a pH értékek az enzim vizes közegben megfigyelt katalitikus aktivitásának optimális pH értékével (pH 7,0) is megegyeznek vagy ahhoz közel hasonlóak. Hasonló pH optimum értékekről számolnak be Nakamoto és mtsai (1979) egyéb észterek képződésére is α -kimotripszinnel. Szilikához rögzített kimotripszinnel megvalósított átészteresítési reakciót vizsgáltak Moresoli és mtsai (1991). A maximális észterhozamokat

pH 6,2-6,4-nél kapták. Azonban a vizes közegben tapasztalt pH optimumoktól eltérő eredményekről is tanuskodnak irodalmi adatok, így Castro (2000) glicerinben vizsgálta az α -kimotripszin aktivitásának pH függését, és azt figyelte meg, hogy az optimum, pH 10 körül van, ami jóval magasabb a vizes közegben tapasztaltnál. Mitin és mtsai (1997) papainnal katalizált észterszintézis optimális körülményeit vizsgálták glicerinben, és a papain vizes közegben ismert pH optimum (pH 6-7) értékétől jelentősen eltérő pH optimumot kaptak szerves oldószerben (pH 3,2). Korábbi vizsgálataink tripszinnel azt mutatták, hogy az acetonitrilben végrehajtott észterszintézis optimális pH értéke a kimotripszinnel megvalósított észteresítésekhez hasonlóan pH 7,0-nél volt (Simon és mtsai, 2000).

Hőmérséklet függés vizsgálatainkban eltérés mutatkozott a direkt és az átészteresítés optimális értékeiben: a direkt észteresítésre 30°C, az átészteresítésre 40°C volt az optimális. Papain katalizálta glicerin észter képződésre a legjobb eredményeket 40-50°C-on kapták (Mitin és mtsai, 1997). Acetonitrilben a karboxipeptidáz A számára 30°C volt az optimális hőmérséklet dipeptid szintéziskor (Vértesi és Simon, 1998).

Az optimális víztartalom beállítása talán a legfontosabb a szerves oldószeres reakciókban, hiszen ha az optimális mennyiségű víznél több van jelen a rendszerben, a reakció egyensúlyi állapota megváltozik és előtérbe kerülnek a hidrolitikus reakciók (Wehtje és mtsai, 1993). Vizsgálatainkban 3% körüli optimális víztartalmat állapítottunk meg mindegyik reakcióra (észteresítés 2,8%, átészteresítés 3,3%). Hasonló eredményeket kaptak Kise és Shirato (1988) α -kimotripszin katalizálta N-acetil-triptofán etanollal való észteresítésére, ahol is 2,5% körüli víz jelenléte volt optimális. Tripszinnel végzett kísérleteinkben 2,87% optimális víztartalmat állapítottunk meg az észteresítési reakció során (Simon és mtsai, 2000). Ismert tény, hogy az α -kimotripszin-katalizálta szintetikus reakciók szerves oldószerekben igényelnek kevés vizet a termékképződéshez, ugyanis vizet nem tartalmazó közegben nem mennek végbe szintézisek (Kise és Hayakawa, 1991). Ez utóbbit igazolják eredményeink is, ugyanis vizet nem tartalmazó reakcióelegyben nem kaptunk termékeket. Az optimális víztartalom értékek enzimenként többnyire eltérnek, de általában minden esetben 10% alatti víztartalom az optimális. Papainnal pl. éppen 10% vizet tartalmazó elegyet találták legjobbnak az észteresítésre (Mitin és mtsai, 1997). Potier és mtsai (2000) *Bacillus subtilis* proteináz-N enzimmel átészteresítéseket tanulmányoztak DMSO-ban és

DMF-ban, s a legnagyobb termékhozamokat 7% vizet tartalmazó DMF-ban érték el, amennyiben a víz mennyiségét 7% fölé emelték, csökkent a kitermelés.

5.3.4. Észteresítés és átészteresítés rögzített enzimekkel

Az észteresítési és átészteresítési reakciókat végrehajtottuk rögzített kimotripszinnel is. Ehhez a kimotripszint Akrilex C-100, Akrilex P-100 és p-benzokinonnal aktivált Szilokróm hordozóhoz rögzítettük. Eredményeink szerint az átészteresítési reakcióban az Akrilex P-100-hoz és a Szilokrómhoz rögzített enzimek egyformán jó kitermelést adtak, az észteresítési reakcióban viszont a Szilokróm-kimotripszin volt a legjobb katalizátor. Összességében a rögzített enzimekkel jó észterhozamokat állítottunk elő. A hordozó milyensége, illetve a rögzítési eljárás is befolyásolja azonban a kötődött enzim katalitikus aktivitását. Kise és mtsai (1987) α -kimotripszint rögzítettek különböző hordozókhoz és peptidszintézist vizsgáltak a kapott rögzített enzimekkel acetonitrilben. Nagy eltérések voltak a termékhozamokban az egyes hordozók esetében, ugyanis amíg DEAE-Sephadex-kimotripszinnel 1%, AE-cellulóz-kimotripszinnel 2% termékhozamot kaptak, addig kitin-kimotripszinnel 38%-ot, és ha oldott formában alkalmazták az enzimet, akkor 17% peptidhozamot tudtak elérni. Látható tehát, hogy a rögzített enzimek egy része az oldottnál jobb, más része viszont rosszabb kitermelést valósított meg. A hordozó befolyásolja a szubsztrátok, termékek és a víz megoszlását a reakcióelegyben és ezáltal közvetett módon hat az enzim működésére is (Adlercreutz, 1991).

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink során az α -kimotripszin stabilitását és működését tanulmányoztuk különböző szerves oldószeres közegben. Az enzim kovalens kémiai módosítását (rögzített formák előállítás) és adalékanyagok hozzáadását alkalmaztuk az enzim stabilitásának megőrzésére. Vizsgáltuk az enzim szintetáz aktivitását észterésítési és átészterésítési modell reakciókon keresztül, kevés vizet tartalmazó szerves oldószerekben.

Vizsgálataink során kapott eredményeinket a következőkben foglaljuk össze:

1. Az α -kimotripszin aktivitása vízzel elegyedő oldószerekben eltérően alakult. Etanolban, dioxánban, acetonban és acetonitrilben a koncentráció növekedésével egy minimum görbe szerint változott az enzim aktivitása, míg dimetil szulfoxidot tartalmazó elegyekben az oldószer koncentráció emelésével fokozatosan csökkent, majd 50% dimetil szulfoxid koncentrációnál az enzim inaktiválódott. A vízzel elegyedő oldószerekben az enzim stabilitása a következő sorrendben csökkent: dioxán > aceton > etanol > acetonitril > DMSO. Az oldószer dielektromos állandója és az enzim adott oldószerben megfigyelt stabilitása között fordított arányosság állt fenn.

Vízzel nem elegyedő oldószerekben (toluol, etilacetát) az α -kimotripszin nagyobb stabilitást mutatott, mint a vízzel elegyedőkben.

2. A vizsgált szerves oldószerekben az enzim inaktiválódása megőrizte a vizes közegben ismert kétlépcsős jelleget.
3. Az enzimet sikeresen rögzítettük különböző hordozókhoz, és az Akrilex C-100-hoz rögzítve $204,1 \text{ U g}^{-1}$, Akrilex P-100-hoz $50,1 \text{ U g}^{-1}$, a p-benzokinonnal aktivált Szilokrómhhoz rögzítve pedig $26,7 \text{ U g}^{-1}$ száraz gél aktivitású enzimet állítottunk elő. Megállapítottuk, hogy a kötődött fehérje és az aktivitás szempontjából is az Akrilex C-100 volt a legjobb hordozó az α -kimotripszin rögzítésére.
4. A különböző rögzített enzimformákat teszteltük stabilitás szempontjából 50% acetonitrilben, etanolban és dioxánban. Mindegyik rögzített enzim nagyobb

stabilitást mutatott a vizsgált oldószerekben, mint az oldott forma, vagyis a rögzítéssel sikerült az α -kimotripszin stabilitását növelnünk.

Oldószerenként eltérő mértékű stabilizáló hatást fejtett ki a különféle hordozókra való rögzítés, s ezek közül a Szilokróm hordozó alkalmazása volt a legjobb az α -kimotripszin stabilitása szempontjából. Etanolban tapasztaltuk a legnagyobb mértékű stabilitás fokozódást az oldott enzimhez képest mindhárom hordozó esetében (60 perces inkubálás után maradék aktivitás: oldott enzim 13%, rögzített enzimek 85%).

Összehasonlítva az egyes hordozókat, azt figyeltük meg, hogy etanolban szinte egyáltalán nem volt különbség az egyes hordozókra való rögzítéssel elért stabilizálás között. Dioxánban, valamint acetonitrilben pedig hasonló stabilitást mutattak az Akrix C és P-re rögzített kimotripszinek.

5. Tanulmányoztuk polihidroxi vegyületek hatását is a rögzített enzimformák stabilitására szerves oldószerekben. Az additívek (glükóz, szorbit, laktóz és a polietilén glikol 8000) hatását 50% acetonitril, etanolt vagy dioxánt tartalmazó közegben vizsgáltuk. Az additívek, legnagyobb stabilizáló hatás eléréséhez alkalmazott koncentráció értékei: glükóznál 180 g L^{-1} , szorbittal 182 g L^{-1} , laktózzal 137 g L^{-1} , polietilén glikollal 90 g L^{-1} voltak. Megállapítottuk, hogy csaknem mindegyik additív mindhárom oldószerben stabilizáló hatást fejtett ki a rögzített enzimekre. Az Akrix-enzimeknél az additívek stabilizáló hatása kisebb mértékű volt a Szilokróm-enzimhez képest. Az additívek hatása az Akrix C- és az Akrix P-kimotripszinre a glükóz kivételével általában hasonló volt mindegyik oldószerben. Etanolban és dioxánban a legtöbb esetben nagyon hasonló hatást fejtettek ki az egyes additívek. Az acetonitril inaktíválta a legnagyobb mértékben az α -kimotripszint (60 perc inkubálás után Akrix C-enzim aktivitása 34%, Akrix P-enzim 27%, Szilokróm-enzim 56%), viszont az additívek stabilizáló hatása éppen acetonitrilben volt a legnagyobb mértékű (60 perc inkubálás után Akrix C-enzim aktivitása 75-80%, Akrix P-enzim 70-85%). Szilokróm-kimotripszinnél az additívekkel acetonitrilben a polietilén glikol kivételével jelentős aktiválódást is tapasztaltunk. Az acetonitril tartalmú elegyben tapasztalt nagy mértékű stabilizáló hatás Akrix-C-enzimnél szorbittal (80%), Akrix P-enzimnél glükóz jelenlétében (107%), Szilokróm-kimotripszinnél pedig

laktózzal volt a legkifejezettebb. Ez utóbbi esetben az enzim jelentős aktiválódását tapasztaltuk.

A stabilizálószer jelenlétében a 60 perces inkubálás során egy kivételtől eltekintve nem, vagy csak 30%-kal csökkent az enzim aktivitása, vagyis az oldószer okozta inaktiválódást additívek alkalmazásával sikerült nagymértékben kivédeni.

6. Az α -kimotripszin szintetáz aktivitását is vizsgáltuk szerves oldószerekben. Ehhez két modell reakciót használtunk fel, egyrészt az N-acetil-L-tirozin alkoholokkal való direkt észterezését, másrészt az N-acetil-L-tirozin etil észter alkoholokkal való átészterezését. Mindkét reakció típus esetén összehasonlítottuk a reakciók alkohol és oldószerfüggését, a pH, hőmérséklet, szubsztrát és enzim koncentráció, valamint a víztartalom szerepét a termékképződésre. Hasonlóság mutatkozott a direkt- és átészterezés között az optimális körülmények közül az alkohol és aminosav szubsztrát koncentrációban, pH-ban és víztartalomban. Mindkét reakció esetén a maximális konverziót 10% alkohol- és 9,75 mM aminosav szubsztrát koncentrációknál kaptuk. Az optimális pH és víztartalom tekintetében csak nagyon kis eltérést tapasztaltunk, az észterezés pH 7,0-en és 2,8% víztartalom mellett, az átészterezés pedig pH 7,5-en és 3,3% víztartalomnál ment végbe maximális konverzióval. Lényeges eltéréseket találtunk az optimális hőmérséklet és enzim koncentráció esetében, ugyanis amíg az észterezésnél 30°C-on és 1,5 mg mL⁻¹ enzimkoncentrációval, addig az átészterezésnél 40°C-on és 0,5 mg mL⁻¹ enzimkoncentrációval értük el a maximális kitermelést. Meghatároztuk a két reakciónál a maximális észterhozamok eléréséhez szükséges időt, melyben jelentős eltérést figyeltünk meg az átészterezés javára (direkt észterezés: 24 óra, átészterezés: 4 óra). Vizsgáltuk még a reakcióelegyekben az enzim hidrolitikus aktivitásának változását is a reakciók során, és megállapítottuk, hogy a maximális észterhozam eléréséig (direkt észterezés: 83,9%, átészterezés: 91,4%), mindkét esetben az enzim kiindulási hidrolitikus aktivitásának mintegy 80%-át megőrizte.
7. Összehasonlítottuk a különböző hordozókra (Akrilex C-100, Akrilex P-100 és p-benzokinonnal aktivált Szilokrómmal) rögzített α -kimotripszin által katalizált észterezés és átészterezés reakciókat. Megállapítottuk, hogy a rögzített enzimekkel jelentős észterhozamok érhetőek el. Az észterezésre a p-benzokinonnal

aktivált Szilokróm volt a legjobb hordozó (31,3% kitermelés), míg az átészteresítés esetén az Akrix P-100 hordozóra rögzített enzimmel kaptuk a legnagyobb kitermelést (50,5%) az oldott enzimre optimalizált körülmények között.

Kísérleti eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy a szerves oldószeres közegben megvalósított enzimreakciókban milyen nagy fontosságú a megfelelő oldószer kiválasztása, mind az enzim stabilitása, mind pedig a reakció hatékonysága szempontjából. Az α -kimotripsinnel végzett észteresítési és átészteresítési reakciók körülményeinek optimalizálása alapul szolgálhat a nem hagyományos közegű biokatalízis közelebbi megismeréséhez. A stabilizálási kísérleteink eredményei pedig hozzájárulhatnak a szerves oldószeres enzimreakciók szélesebb körű alkalmazásához.

7. SUMMARY

We investigated the activity and stability of α -chymotrypsin in various organic solvent systems. Different methods (immobilization, additives) were applied to increase the stability of the enzyme. Both the esterification and transesterification reactions of the α -chymotrypsin were studied in different organic media.

Results are summarized as follows:

1. Activity of α -chymotrypsin differed in water-miscible organic solvents. The enzymatic activity changed according to a minimum curve with increasing concentration of ethanol, dioxane, acetone or acetonitrile. In case of dimethyl sulfoxide, enzymatic activity decreased by increasing the amount of the organic solvent and at 50% dimethyl sulfoxide concentration α -chymotrypsin was totally inactivated. Among water-miscible organic solvents the stability of the enzyme decreased in the following order: dioxane>acetone>ethanol>acetonitrile>DMSO. Dielectric constant of the solvent is inversely proportion to the stability of the enzyme.

The stability of the enzyme was higher in water-immiscible organic solvents (ethyl acetate or toluene) than in water-miscible ones.

2. The inactivation of the enzyme retained its two steps characteristics in the investigated organic solvents just as in water.
3. The enzyme was immobilized successfully on all the supports investigated: Akrix C-100 (activity: 204.1 U g⁻¹ solid support), Akrix P-100 (activity: 50.1 U g⁻¹ solid support) and Szilokróm activated with p-benzoquinone (activity: 26.7 U g⁻¹ solid support). We concluded that the highest immobilized activity and immobilized protein amount was achieved when the enzyme was attached to Akrix C-100.
4. Stability of different forms of immobilized enzymes was tested in 50% acetonitrile, ethanol or dioxane. Each of the α -chymotrypsin forms were more stable in all three solvents than the soluble enzyme, thus we concluded that immobilization increased

the stability of the enzyme in all of these cases. Immobilization on various supports influenced the stability of the enzyme differently. The enzyme was the most stable on Szilokróm. The highest increase in stability of different immobilized enzyme forms was observed in ethanol.

Using ethanol as a solvent we could not detect any difference in the stability of α -chymotrypsin on the three supports investigated. In dioxane and acetonitrile the stability of Akrix P- and C-bound α -chymotrypsin was similar.

5. The effect of polyhydroxy compounds was investigated on the stability of immobilized α -chymotrypsin forms (Akrix C-, Akrix P- or Szilokróm-chymotrypsin) in organic solvents. Effects of additives (glucose, sorbitol, lactose or polyethylene glycol 8000) were examined in media containing 50% acetonitrile, ethanol or dioxane. The highest stabilizing effect was shown in case of 180 g L^{-1} glucose, 182 g L^{-1} sorbitol, 137 g L^{-1} lactose, 90 g L^{-1} polyethylene glycol. Almost all the additives had stabilizing effect on the immobilized enzyme forms in all solvents. Additives stabilized the Szilokróm-enzyme more than the Akrix-enzymes. Effects of additives were similar on two type Akrix-bound enzyme in each solvents, except of glucose. Effects of additives were similar on all support-bound enzyme forms in ethanol and dioxane. The enzymes were most inactivated by acetonitrile (after 60-min incubation, activity of Akrix C-enzyme was 34%, Akrix P-enzyme 27%, Szilokróm-enzyme 56%), however the stabilizing effect of the additives was strongest exactly in this solvent (after 60-min incubation, activity of the Akrix C-enzyme was 75-80%, Akrix P-enzyme 70-85%). Szilokróm-chymotrypsin was significantly activated by the additives (except of polyethylene glycol) in acetonitrile. The large stabilizing effect in acetonitrile was achieved with sorbitol in case of Akrix C-bound enzyme, with glucose in case of Akrix P-chymotrypsin and with lactose in case of Szilokróm-enzyme. The enzymatic activity did not decreased more than 30% during 60 minutes incubation in the presence of additives, thus inactivation caused by the organic solvents was successfully prevented by polyhydroxy compounds.
6. The synthetic activity of α -chymotrypsin was also investigated in organic solvents. Two model reactions were studied: direct esterification between N-acetyl-L-tyrosine

and alcohols and transesterification between N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester and alcohols. We compared the dependence of the reactions on the alcohol- and solvent type, temperature, pH, water content, substrate concentration and enzyme concentration. The optimal alcohol and amino acid concentration, pH or water content were similar in both types of reactions. In both reactions 10% alcohol and 9.75 mM amino acid concentration was the optimal. There was a small difference in the optimal pH and water content between the both types of reactions, because for esterification pH 7.0 and 2.8% water content and for transesterification pH 7.5 and 3.3% water content were optimal to reach the highest yield of ester. However, there was a considerable difference in the optimal temperature and enzyme concentration between direct- and transesterification. Maximal conversion was achieved at 30°C and with 1.5 mg mL⁻¹ enzyme concentration in case of direct esterification and at 40°C and with 0.5 mg mL⁻¹ enzyme concentration in case of transesterification.

Transesterification reached the saturation point more rapidly (4 hours) than direct esterification (24 hours).

The hydrolytic activity of the enzyme was also studied in the reaction mixtures and it was found that the enzyme retained 80% of its starting activity by the time it reached the maximal yield of ester in case of either in direct esterification (83.9% ester yield) or transesterification (91.4% ester yield).

7. It was found that immobilized enzymes yielded considerable amount of esters. For direct esterification the best catalyst was the Szilokróm-bound α -chymotrypsin (31.3% ester yield) and for transesterification the Akrix-P-enzyme (50.5% ester yield).

Our results call attention to the importance of choosing appropriate organic solvent for enzymatic reactions for both enzyme stability and reaction efficiency. Optimization of the conditions of direct- and transesterification reactions may serve as a basis of studying biocatalysis in non-conventional media. Results of stabilization experiments contribute to wide-range use of enzymatic reactions in organic media.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Adlercreutz, P. (1991) On the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media. Support effects at controlled water activity. *Eur. J. Biochem.* **199**, 609-614
- Adlercreutz, P. (1993) Activation of enzymes in organic media at low water activity by polyols and saccharides. *Biochim. Biophys. Acta* **1163**, 144-148
- Adlercreutz, P. (1994) Biocatalysis in non-conventional media. In: *Applied Biocatalysis* (Eds. Cabral, J.M.S., Best, D., Boross, L., and Tramper, J.), Harwood Academic Publishers, Switzerland, 279-298
- Affleck, R., Xu, Z.F., Suzawa, V., Focht, K., Clarke, D.S., Dordick, J.S. (1992) Enzymatic catalysis and dynamics in low-water environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1100-1104
- Alcántara, A.R., Sinisterra, J.V., Torres, C., Guisan J.M., Gil H., Williams, A. (1992) Peptide synthesis in organic-aqueous media catalysed by α -chymotrypsin immobilised over different supports. In: *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (Eds. Tramper, J. Vermúe, M.H., Beftink, H.H., and von Stockar, U.), Elsevier, Amsterdam, 443-450
- Alcántara, A.R., Sinisterra, J.V., Torres, C., Romanelli, P., Williams, A. (1993) Immobilisation of α -chymotrypsin on soluble acrylic microgels; activity and stabilisation. In: *Stability and Stabilization of Enzymes* (Eds. Tweel, W.J.J., Harder, A., and Buitelaar, R.M.), Elsevier, Amsterdam, 167-174
- Ampon, K., Salleh, A.B., Teoh, A., Wan Yunus, W.M.Z., Razak, C.N.A., Basri, M. (1991) Sugar esterification catalysed by alkylated trypsin in dimethylformamide. *Biotechnol. Lett.* **13**, 25-30
- Arakawa, T., Goddette, D. (1985) The mechanism of helical transition of proteins by organic solvents. *Arch. Biochem. Biophys.* **240**, 21-32
- Athès, V., Combes, D. (1998) Effect of high hydrostatic pressure on enzyme stability. In: *Stability and Stabilization of Biocatalysts* (Eds. Ballesteros, A., Plou, F.J., Iborra, J.L., and Halling, P.J.), Elsevier, Amsterdam, 205-210
- Back, J.F., Oakenfull, D., Smith, M.B. (1979) Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry* **18**, 5191-5196
- Bagi, K., Simon, L.M. (1999) Comparison of esterification and transesterification of fructose by porcine pancreas lipase immobilized on different supports. *Biotechnol. Tech.* **13**, 309-312
- Barros, R.J., Wehtje, E., Adlercreutz, P. (1998) Mass transfer studies on immobilized alpha-chymotrypsin biocatalysts prepared by deposition for use in organic medium. *Biotechnol. Bioeng.* **59**, 364-373
- Battistel, E., Bianchi, D. (1993) Influence of the solvent properties on protein stability in organic media. In: *Stability and Stabilization of Enzymes* (Eds. Tweel, W.J.J., Harder, A., and Buitelaar, R.M.), Elsevier, Amsterdam, 13-20
- Bell, G., Halling, P.J., Moore, B.D., Partridge, J., Rees, D.G. (1995) Biocatalyst behaviour in low-water systems. *Trends Biotechnol.* **13**, 468-473
- Bemquerer, M.P., Adlercreutz, P., Tominaga, M. (1994) Pepsin-catalyzed peptid synthesis in organic media: studies with free and immobilized enzyme. *Int. J. Peptide Prot. Res.* **44**, 448-456
- Bettelheim, F.R., Neurath, H. (1955) The rapid activation of chymotrypsinogen. *J. Biol. Chem.* **212**, 241-253

- Bjarnason, J.B., Ásgeirsson, B., Kristjánsson, M.M., Guðmundsdóttir, Á., Fox, J.W., Chlebowski, J.F., Craik, C.S. (1993) Characteristics, protein engineering and applications of psychrophilic marine proteinases from Atlantic cod. In: *Stability and Stabilization of Enzymes* (Eds. Tweel, W.J.J., Harder, A., and Buitelaar, R.M.), Elsevier, Amsterdam, 205-214
- Blanco, R.M., Guisán, J.M., Halling, P.J. (1992a) The equilibrium and kinetics of N-acetyl-tryptophan phenylethyl ester synthesis by agarose-chymotrypsin in organic media. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 1092-1096
- Blanco, R.M., Halling, P.J., Bastida, A., Cuesta, C., Guisán, J.M. (1992b) Effect of immiscible organic solvents on activity/stability of native chymotrypsin and immobilized-stabilized derivatives. *Biotechnol. Bioeng.* **39**, 75-84
- Blow, D.M. (1971) The structure of chymotrypsin. In: *The Enzymes*, 3rd Ed. (Ed. Boyer, P.D.), Academic Press, New York, 3, 185-208
- Branden, C., Tooze, J. (1991) An example of enzyme catalysis: serine proteases. In: *Introduction to protein structure*, Garland Publishing Inc., New York, 231-246
- Brandt, J., Andersson, L.O., Porath, J. (1975) Covalent attachment of proteins to polysaccharide carriers by means of benzoquinone. *Biochim. Biophys. Acta* **386**, 196-202
- Brink, L.E.S., Tramper, J., Luyben, K.Ch.A.M., Van't Riet, K. (1988) Biocatalysis in organic media. *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 736-743
- Broos, J., Visser, A.J.W.G., Engbersen, J.F.J., Verboom, W., van Hoek, A. (1995) Flexibility of enzymes suspended in organic solvents probed by time-resolved fluorescence anisotropy. Evidence that enzyme activity and enantioselectivity are directly related to enzyme flexibility. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 12657-12663
- Carrea, G., Ottolina, G., Riva, S. (1995) Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends Biotechnol.* **13**, 63-70
- Castro, G.R. (1999) Enzymatic activities of proteases dissolved in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 689-694
- Castro, G.R. (2000) Properties of soluble α -chymotrypsin in neat glycerol and water. *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 143-150
- Čeřovsky, V., Jakubke, H.D. (1994) Acyl transfer reactions catalyzed by native and modified α -chymotrypsin in acetonitrile with low water content. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 596-601
- Chen, K.Q., Arnold, F.H. (1991) Enzyme engineering for nonaqueous solvents: random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media. *Biotechnology N.Y.* **9**, 1073-1077
- Chen, K.Q., Robinson, A.C., Van Dam, M.E., Martinez, P., Economou, C., Arnold, F.H. (1991) Enzyme engineering for nonaqueous solvents. II. Additive effects of mutations on the stability and activity of subtilisin E in polar organic media. *Biotechnol. Prog.* **7**, 125-129
- Chibata, I. (1978) *Immobilized enzymes, research and development*. Halsted Press, New York, 1-15
- Clark, D.S. (1994) Can immobilization be exploited to modify enzyme activity? *Trends Biotechnol.* **12** 439-443
- Combes, D. (1992) Biocatalysis in non-conventional media: effect of enzyme microenvironment. In: *Biocatalysis in Non-Conventional Media*. (Eds. Tramper, J., Vermüe, M.H., Beftink, H.H., and von Stockar, U.), Elsevier, Amsterdam, 45-52

- Corey, R.B., Battfay, O., Brueckner, D.A., Mark, F.G. (1965), Preliminary X-ray diffraction studies of crystal forms of free and inhibited chymotrypsin. *Biochim. Biophys. Acta* **94**, 535-545
- De Filippis, V., De Antoni, F., Frigo, M., Polverino de Laureto, P., Fontana, A. (1998) Enhanced protein thermostability by Ala→Aib replacement. *Biochemistry* **37**, 1686-1696
- Desnuelle, P. (1960) Chymotrypsin. In: *The Enzymes.*, 2nd Ed. (Ed. Boyer, E.D., Lardy, H. and Myrbäck, K.), Academic Press, New York, **4**, 93-118
- Dong, A., Meyer, J.D., Kendrick, B.S., Manning, M.C., Carpenter, J.F. (1996) Effect of secondary structure on the activity of enzymes suspended in organic solvents. *Arch. Biochem. Biophys.* **334**, 406-414
- Dong, A., Matsuura, J., Manning, M.C., Carpenter, J.F. (1998) Intermolecular β -sheet results from trifluoroethanol-induced nonnative α -helical structure in β -sheet predominant proteins: infrared and circular dichroism spectroscopic study. *Arch. Biochem. Biophys.* **355**, 275-281
- Dordick, J.S. (1989) Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 194-211
- Fischer, J., Ulbrich, R., Ziemann, R., Flatau, S., Wolna, P., Schleiff, M., Pluschke, V., Schellenberger, A. (1980) Thermal inactivation of immobilized enzymes: a kinetic study. *J. Solid-Phase Biochem.* **5**, 79-96
- Fischer, K. (1935) Neues Vefahren zur massanalytischen Bestimmung des Wassergehaltes von Flüssigkeiten und festen Körpern. *Angew. Chem.* **48**, 394-396
- Fitzpatrick, P.A., Steinmetz, A.C.U., Ringe, D., Klibanov, A.M. (1993) Enzyme crystal structure in a neat organic solvent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8653-8657
- Gaertner, H.F., Puigserver, A.J. (1992) Increased activity and stability of poly(ethylene glycol)-modified trypsin. *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 150-155
- Ghatorae, S., Guerra, M.J., Bell, G., Halling, P.J. (1994) Immiscible organic solvent inactivation of urease, chymotrypsin, lipase and ribonuclease: separation of dissolved solvent and interfacial effects. *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 1355-1361
- Gloger, M., Tischer, W. (1983) Determination of the catalytic activity of immobilized enzymes. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd Ed. (Ed. Bergmeyer, H.U.), Verlag Chemie, Weinheim, **1**, 142-163
- Goldstein, L., Manecke, G. (1976) The chemistry of enzyme immobilization. In: *Applied Biochemistry and Bioengineering* (Eds. Wingard, L.B., Katchalski-Katzir, E., Goldstein, L.), Academic Press, New York, **1**, 23-126
- Gololobov, M.Yu., Stepanov, V.M., Voyushina, T.L., Morozova, I.P., Adlercreutz, P. (1994) Side reactions in enzymatic peptide synthesis in organic media: Effects of enzyme, solvent, and substrate concentrations. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 522-528
- Gorman, L.A.S., Dordick, J.S. (1992) Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* **39**, 392-397
- Gray, C. (1988) Additives and enzyme stability. *Biocatalysis* **1**, 187-196
- Gupta, M.N. (1992) Enzyme function in organic solvents. *Eur. J. Biochem.* **203**, 25-32
- Gupta, M.N., Tyagi, R., Sharma, S., Karthikeyan, S., Singh, T.P. (2000) Enhancement of catalytic efficiency of enzymes through exposure to anhydrous organic solvent at 70°C. Three-dimensional structure of a treated serine proteinase at 2.2 Å resolution. *Proteins* **39**, 226-234
- Halling, P.J. (1990) High-affinity binding of water by proteins is similar in air and in organic solvents. *Biochim. Biophys. Acta* **1040**, 225-228

- Halling, P.J. (1994) Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 178-206
- Heras, A., Martin, M.T., Acosta, N., Debailon-Vesque, F. (1992) Influence of the solvent and the solid support on the microenvironment of immobilized α -chymotrypsin. In: *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (Eds. Tramper, J., Vermüe, M.H., Beftink, H.H., and von Stockar, U.), Elsevier, Amsterdam, 339-346
- Inman, J.K. (1974) Covalent linkage of functional groups, ligands and proteins to polyacrylamide beads. In: *Methods in Enzymol.* (Eds. Jakoby, W.B. and Wilchek, V.), Academic Press, New York, **34**, 30-58
- Kálmán, M., Szajáni, B., Boross, L. (1983) A novel polyacrylamide-type support prepared by p-benzoquinone activation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **8**, 515-522
- Katchalski-Katzir, E. (1993) Immobilized enzymes-learning from past successes and failures. *Trends Biotechnol.* **11**, 471-478
- Kawasaki, Y., Takahashi, Y., Nakatani, M., Murakami, M., Dosako, S., Okai, H. (1994) Enzymatic functions of fatty acid-modified chymotrypsin and trypsin in aqueous-organic media. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 512-516
- Kawashiro, K., Sugahara, H., Tsukioka, T., Sugiyama, S., Hayashi, H. (1996) Effect of ester moiety of substrates on enantioselectivity of protease catalysis in organic media. *Biotechnol. Lett.* **18**, 1381-1386
- Khmelnitsky, Y.L., Levashov, A.V., Klyachko, N.L., Martinek, K. (1988) Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 710-724
- Khmelnitsky, Y.L., Belova, A.B., Levashov, A.V., Mozhaev, V.V. (1991) Relationship between surface hydrophilicity of a protein and its stability against denaturation by organic solvents. *FEBS Letters* **284**, 267-269
- Kise, H., Hayakawa, A., Noritomi, H. (1987) Enzymatic reactions in aqueous-organic media. IV. Chitin- α -chymotrypsin complex as a catalyst for amino acid esterification and peptide synthesis in organic solvents. *Biotechnol. Lett.* **9**, 543-548
- Kise, H., Shirato, H. (1988) Enzymatic reactions in aqueous-organic media. V. Medium effect on the esterification of aromatic amino acids by α -chymotrypsin. *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 582-585
- Kise, H., Hayakawa, A. (1991) Immobilization of proteases to porous chitosan beads and their catalysis for ester and peptide synthesis in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 584-588
- Klibanov, A.M. (1989) Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 141-144
- Kotormán, M., Simon, L.M., Szajáni, B. (1994) Coenzyme production using immobilized enzymes. III. Immobilization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from Bakers' yeast. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 974-978
- Krishna, N., Lemuel, B., Wingrad, J. (1985) p-Benzoquinone activation of metal oxide electrodes for attachment of enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* **7**, 283-286
- Kumar, S., Hein, G.E. (1970) Concerning the mechanism of autolysis of α -chymotrypsin. *Biochemistry* **9**, 291-297
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K. (1985) On optimizing organic solvents in multi-liquid-phase biocatalysis. *Trends Biotechnol.* **3**, 251-252
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. (1987) Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 81-87

- Landsteiner, K., van der Scheer, J. (1936) On cross reactions of immunase sera to azoproteins. *J. Exp. Med.* **63**, 325-339
- László, K., Simon, L.M. (1998) α -Chymotrypsin-catalysed synthesis of N-acetyl-L-tyrosine esters in organic media. In: *Stability and Stabilization of Biocatalysts* (Eds. Ballesteros, A., Plou, F.J., Iborra, J.L., and Halling, P.J.), Elsevier, Amsterdam, 713-718
- László, K., Szava, A., Simon, L.M. (2001) Stabilization of various α -chymotrypsin forms in aqueous-organic media by additives. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **16**, 141-146
- Liu, F., Zhuo, R.X. (1993) A convenient method for the preparation of temperature-sensitive hydrogels and their use for enzyme immobilization. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **18**, 57-65
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- Lozano, P., Combes, D., Iborra, J.L. (1994) Effect of polyols on alpha-chymotrypsin thermostability: a mechanistic analysis of the enzyme stabilization. *J. Biotechnol.* **35**, 9-18
- Lozano, P., Diego, T., Iborra, J.L. (1995) Effect of water-miscible aprotic solvents on kytorphin synthesis catalyzed by immobilized α -chymotrypsin. *Biotechnol. Lett.* **17**, 603-608
- Lozano, P., Diego, T., Iborra, J.L. (1996) Influence of water-miscible aprotic solvents on α -chymotrypsin stability. *Biotechnol. Prog.* **12**, 488-493
- Lozano, P., Diego, T., Iborra, J.L. (1997) Hydrophobicity and water activity relationships of water-miscible aprotic solvents on kytorphin synthesis catalyzed by α -chymotrypsin. *Biotechnol. Lett.* **19**, 1005-1009
- Månsson, M.O., Ståhl, M., Mosbach, K. (1992) Induced stereo and substrate selectivity of bio-imprinted α -chymotrypsin in anhydrous organic media. In: *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (Eds. Tramper, J., Vermüe, M.H., Beftink, H.H., and von Stockar, U.), Elsevier, Amsterdam, 321-327
- Martinek, K., Klibanov, A.M., Goldmacher, V.S., Tchernysheva, A.V., Mozhaev, V.V., Berezin, I.V., Glotov, B.O. (1977) The principles of enzyme stabilization. II. Increase in the thermostability of enzymes as a result of multipoint noncovalent interaction with a polymeric support. *Biochim. Biophys. Acta* **485**, 13-28
- Matthews, B.W. (1993) Structural and genetic analysis of protein stability. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 139-160
- Mattiasson, B., Mosbach, K. (1971) Studies on a matrix-bound three-enzyme system. *Biochim. Biophys Acta* **235**, 253-257
- Mejri, M., Pauthe, E., Larreta-Garde, V., Mathlouthi, M. (1998) Effect of polyhydroxylic additives on the catalytic activity of thermolysin. *Enzyme Microb. Technol.* **23**, 392-396
- Mejri, M., Mathlouthi, M. (2001) Effect of small carbohydrates on the catalytic activity of a protease and two glycohydrolases. *Carbohydr. Polym.* **45**, 161-167
- Meyer, J.D., Kendrick, B.S., Matsuura, J.E., Ruth, J.A., Bryan, P.N., Manning, M.C. (1996) Generation of soluble and active subtilisin and alpha-chymotrypsin in organic solvents via hydrophobic ion pairing. *Int. J. Pept. Protein Res.* **47**, 177-181
- Mitin, Y.V., Braun, K., Kuhl, P. (1997) Papain catalyzed synthesis of glyceryl esters of N-protected amino acids and peptides for the use in trypsin catalyzed peptide synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* **54**, 287-290

- Moresoli, C., Flaschel, E., Renken, A. (1991) Transesterification of phenylalanine by means of chymotrypsin in a continuous fixed bed reactor. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 703-707
- Moresoli, C., Zaza, P., Flaschel, E., Renken, A. (1992) Transesterification of phenylalanine by means of chymotrypsin in the presence of dimethylsulfoxide. *Biocatalysis* **5**, 203-211
- Mori, T., Nilsson, K., Larsson, P.O., Mosbach, K. (1987) Amino acid ester synthesis by immobilized α -chymotrypsin. *Biotechnol. Lett.* **9**, 455-460
- Moszolov, V.V., Afanaszjev, P.V., Dolgih, M.Sz., Lusnyikova, E.V. (1968) Properties of trypsin and chymotrypsin in aqueous-dioxane mixtures. *Biokhimiya* **33**, 1030-1038
- Mozhaev, V.V. (1998) Engineering stability of enzymes in systems with organic solvents. In: *Stability and Stabilization of Biocatalysts* (Eds. Ballesteros, A., Plou, F.J., Iborra, J.L., and Halling, P.J.), Elsevier, Amsterdam, 355-363
- Murooka, Y., Nishiya, Y., Toyama, M., Aoike, M., Yamashita, M., Hirayama, N. (1998) Improvement of thermal stability of a diagnostic enzyme, *Streptococcus* cholesterol oxidase, by random and site-directed mutageneses and a structural interpretation. In: *Stability and Stabilization of Biocatalysts* (Eds. Ballesteros, A., Plou, F.J., Iborra, J.L., and Halling, P.J.), Elsevier, Amsterdam, 295-302
- Nakamoto, Y., Karube, I., Kobayashi, I., Nishida, M., Suzuki, S. (1979) Amino acid esterification by α -chymotrypsin immobilized in spiropyran membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* **193**, 117-121
- Nilsson, K., Mosbach, K. (1984) Peptide synthesis in aqueous-organic solvent mixtures with α -chymotrypsin immobilized to tresyl chloride-activated agarose. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 1146-1154
- Norde, W., Zoungrana, T. (1998) Activity and structural stability of adsorbed enzymes. In: *Stability and Stabilization of Biocatalysts* (Eds. Ballesteros, A., Plou, F.J., Iborra, J.L., and Halling, P.J.), Elsevier, Amsterdam, 495-504
- Nordvi, B., Holmsen, H. (1992) Effect of polyhydroxy compounds on the activity of lipase from *Rhizopus arrhizus* in organic solvent. In: *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (Eds. Tramper, J., Vermüe, M.H., Beeftink, H.H. and von Stockar, U.), Elsevier, Amsterdam, 355-361
- Noritomi, H., Almarsson, Ö., Barletta, G.L., Klibanov, A.M. (1996) The influence of the mode of enzyme preparation on enzymatic enantioselectivity in organic solvents and its temperature dependence. *Biotechnol. Bioeng.* **51**, 95-99
- Otamiri, M., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1992) Complex formation between chymotrypsin and ethyl cellulose as a means to solubilize the enzyme in active form in toluene. *Biocatalysis* **6**, 291-305
- Öste-Triantafyllou, A., Wehtje, E., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1995) Effects of sorbitol addition on the action of free and immobilized hydrolytic enzymes in organic media. *Biotechnol. Bioeng.* **45**, 406-414
- Öste-Triantafyllou, A., Wehtje, E., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1997) How do additives affect enzyme activity and stability in nonaqueous media? *Biotechnol. Bioeng.* **54**, 67-76
- Panintrarux, C., Adachi, S., Araki, Y., Kimura, Y., Matsuno, R. (1995) Equilibrium yield of n-alkyl-beta-D-glucoside through condensation of glucose and n-alcohol by beta-glucosidase in biphasic system. *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 32-40
- Paradkar, V.M., Dordick, J.S. (1994) Aqueous-like activity of α -chymotrypsin dissolved in nearly anhydrous organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 5009-5010

- Partridge, J., Moore, B.D., Halling, P.J. (1999) α -Chymotrypsin stability in aqueous-acetonitrile mixtures: is the native enzyme thermodynamically or kinetically stable under low water conditions? *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **6**, 11-20
- Phillips, R.S., Matthews, M.S., Olson, E., Von Tersch, R.L. (1990) Structural and stereochemical studies of esterification of aromatic amino acids by α -chymotrypsin in alcohol solvents. *Enzyme Microb. Technol.* **12**, 731-735
- Potier, P., Bouchu, A., Descotes, G., Queneau, Y. (2000) Proteinase N-catalysed transesterification in DMSO-water and DMF-water: preparation of sucrose monomethacrylate. *Tetrahedron Lett.* **41**, 3597-3600
- Pourplanche, C., Hertmanni, P., Larreta-Garde, V. (1992) Comparative influence of microenvironment on the activity of two enzymes: lipoxygenase and thermolysin. In: *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (Eds. Tramper, J., Vermüe, M.H., Beeftink, H.H., and von Stockar, U.), Elsevier, Amsterdam, 275-282
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J. (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* **290**, 205-218
- Reslow, M., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1987) Organic solvents for bioorganic synthesis. 1. Optimization of parameters for a chymotrypsin catalyzed process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1-8
- Rocha, J.M.S., Gil, M.H., Garcia, F.A.P. (1998) Effects of additives on the activity of a covalently immobilised lipase in organic media. *J. Biotechnol.* **66**, 61-67
- Rony, P.K. (1971) Multiphase catalysis. II. Hollow fiber catalysts. *Biotechnol. Bioeng.* **13**, 431-436
- Sakurai, H., Shinohara, K., Hisabori, T., Shinohara, K. (1981) Enhancement of adenosine triphosphatase activity of purified chloroplast coupling factor 1 in aqueous organic solvent. *J. Biochem.* **90**, 95-102
- Schmitke, J.L., Stern, L.J., Klibanov, A.M. (1997) The crystal structure of subtilisin Calsberg in anhydrous dioxane and its comparison with those in water and acetonitrile. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4250-4255
- Schwert, G.W., Takenaka, Y. (1955) A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 570-575
- Sergeeva M.V., Paradkar V.M., Dordick J.S. (1997) Peptide synthesis using proteases dissolved in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* **20**, 623-628
- Shih, I.L., Chiu, L.C., Lai, C.T., Liaw, W.C., Tai, D.F. (1997) Enzymes catalyzed esterification of N-protected amino acids with secondary alcohols. *Biotechnol. Lett.* **19**, 857-859
- Sigler, P.B., Blow, D.M., Matthews, B.W., Henderson, R. (1968) Structure of crystalline-chymotrypsin. II. A preliminary report including a hypothesis for the activation mechanism. *J. Mol. Biol.* **35**, 143-164
- Simon, L.M., Heinrichova, K., Veszeka, I., Szajáni, B. (1990) Effects of polyethylene terephthalate on yeast alcohol dehydrogenase. *Acta Biochim. Biophys. Hung.* **25**, 1-7
- Simon, L.M., László, K., Vértési, A., Bagi, K., Szajáni, B. (1998) Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **4**, 41-45
- Simon, L.M., Kotormán, M., Marácz, K., László, K. (2000) N-acetyl-L-arginine ethyl ester synthesis catalysed by bovine trypsin in organic media. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **10**, 565-570
- Simon, L.M., Kotormán, M., Garab G., Laczkó I. (2001) Structure and activity of α -chymotrypsin and trypsin in aqueous organic media. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 1367-1371

- Singh, T.J., Wang, J.H. (1979) Stimulation of glycogen phosphorylase kinase from rabbit skeletal muscle by organic solvents. *J. Biol. Chem.* **254**, 8466-8472
- Slegers, G., De Laet, S., Lambrecht, R.H., Block, C. (1986) Co-immobilized pyruvate kinase and lactate dehydrogenase as recycling system for ATP. *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 153-156
- Stryer, L. (1988) Mechanism of enzyme action. In: *Biochemistry*, 3rd Ed., W.H. Freeman and Company, New York, 201-232
- Szajáni, B., Ivony, K., Boross, L. (1980) Comparative studies on soluble and immobilized pig kidney aminoacylase. *J. Appl. Biochem.* **2**, 72-80
- Tai, D.F., Chiu, L.C., Huang, C.C., Liaw, W.C. (1993) Aspergillus protease-catalyzed esterification at pH > 7. *J. Chinese Chem. Soc.* **40**, 309-313
- Tanford, C. (1978) The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* **200**, 1012-1018
- Tewart, Y.B., Schantz, M.M., Pandey, P.C., Rekharsky, M.V., Goldberg, R.N. (1995) Thermodynamics of the hydrolysis of N-acetyl-L-phenylalanine ethyl ester in water and in organic solvents. *J. Phys. Chem.* **99**, 1594-1601
- Timasheff, S.N. (1998) Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. In: *Adv. Protein Chem.* **54**, Academic Press, New York, 355-432
- Turková, J., Vaněk, T., Turková, R., Veruovič, B., Kubánek, V. (1982) Chymotrypsin adsorbed to a polyethylene terephthalate support (Sorsilen) as a suitable model for the investigation of enzymatically catalyzed organic syntheses in nonaqueous media. *Biotechnol. Lett.* **4**, 165-170
- Ulbrich-Hofmann, R., Golbik, R., Damerau, W. (1993) Fixation of the unfolding region – a hypothesis of enzyme stabilization. In: *Stability and Stabilization of Enzymes* (Eds. Tweel, W.J.J., Harder, A., and Buitelaar, R.M.), Elsevier, Amsterdam, 497-504
- Ulbrich-Hofmann, R., Mansfeld, J., Fittkau, S., Damerau, W. (1995) Structural flexibility in extremely stable carrier-bound chymotrypsin. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **22**, 75-94
- Vazquez-Duhalt, R., Fedorak, P.M., Westlake, D.W.S. (1992) Role of enzyme hydrophobicity in biocatalysis in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 837-841
- Vértesi, A., Simon, L.M. (1998) Carboxypeptidase A-catalyzed dipeptide synthesis in organic media. *J. Biotechnol.* **66**, 75-82
- Vértesi, A., Simon, L.M., Kiss, I., Szajáni, B. (1999) Preparation, characterization and application of immobilized carboxypeptidase A. *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 73-79
- Wang, P., Sergeeva, M.V., Lim, L., Dordick, J.S. (1997) Biocatalytic plastics as active and stable materials for biotransformations. *Nature Biotechnol.* **15**, 789-793
- Wehtje, E., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1992) Stabilization of adsorbed enzymes used as biocatalysts in organic solvents. In: *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (Eds. Tramper, J., Vermüe, M.H., Beftink, H.H. and von Stockar, U.), Elsevier, Amsterdam, 377-382
- Wehtje, E., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1993) Reaction kinetics of immobilized α -chymotrypsin in organic media. 1. Influence of solvent polarity. *Biocatalysis* **7**, 149-161
- West, J.B., Scholten, J., Stolowich, N.J., Hogg, J.L., Scott, A.I., Wong, C.H. (1988) Modification of proteases to esterases for peptide synthesis: methylchymotrypsin. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 3709-3710

- Weston, P.D., Avrameas, S. (1971) Proteins coupled to polyacrylamide beads using glutaraldehyde. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 1574-1580
- Wiseman, A. (1975) *Handbook of enzyme technology*. Halsted Press, New York
- Wong, C.H., Chen, S.T., Hennen, W.J., Bibbs, J.A., Wang, Y.F., Liu, J.L.C., Pantoliano, M.W., Whitlow, M., Bryan, P.N. (1990) Enzymes in organic synthesis: use of subtilisin and a highly stable mutant derived from multiple site-specific mutations. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 945-953
- Wright, H.T., Kraut, J., Wilcox, P.E. (1968) Comparison of the γ -, δ - and π -chymotrypsin family with α -chymotrypsin. *J. Mol. Biol.* **37**, 363-366
- Wu, Z.P., Hilvert, D. (1989) Conversion of a protease into an acyl transferase: selenosubtilisin. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 4513-4514
- Xu, K., Griebenow, K., Klibanov, A.M. (1997) Correlation between catalytic activity and secondary structure of subtilisin dissolved in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **56**, 485-491
- Yamane, T., Ichiryu, T., Nagata, M., Ueno, A., Shimizu, S. (1990) Intramolecular esterification by lipase powder in microaqueous benzene: factors affecting activity of pure enzyme. *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 1063-1069
- Yennawar, N.H., Yennawar, H.P., Farber, G.K. (1994) X-ray crystal structure of gamma-chymotrypsin in hexane. *Biochemistry* **33**, 7326-7336
- Zaks, A., Klibanov, A.M. (1988a) The effect of water on enzyme action in organic media. *J. Biol. Chem.* **263**, 8017-8021
- Zaks, A., Klibanov, A.M. (1988b) Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.* **263**, 3194-3201
- Zhang, T., Baase, W.A., Shoichet, B.K., Wilson, K.P., Matthews, B.W. (1995) Enhancement of protein stability by the combination of point mutations in T4 lysozyme is additive. *Protein Eng.* **8**, 1017-1022
- Zhen, Y., Domach, M., Auger, R., Fang, X.Y., Russell, A.J. (1996) Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisin. *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 82-89

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, *Lehocziné Dr. Simon Máriának*, hogy lehetőséget nyújtott a dolgozat elkészültéhez és értékes tanácsaival munkámat mindvégig segítette.

Köszönettel tartozom *Ábrahámné Dr. Gulyás Magdolnának* a Biokémiai Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette, hogy munkámat a Biokémiai Tanszéken végezhessem.

Szeretnék külön köszönetet mondani *Balázs Ágnesnek* a Biokémiai Tanszék laboratóriumi asszisztensének, hogy oly sokat segített a dolgozat gyakorlati részének kivitelezésében.

Köszönöm a Biokémiai Tanszék valamennyi *munkatársának*, hogy mindenkor segítségemre voltak.

Végül köszönöm férjemnek *Varanka Zsoltnak*, hogy mindvégig mellettem állt, s ötleteivel segítséget nyújtott a gyakorlati munka kivitelezéséhez, a publikációk megírásához. S utoljára megköszönöm egész *családomnak*, hogy mellettem voltak és támogattak a dolgozat elkészültében.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AE	aminoetil-
Aib	α -amino-izovajsav
Arg	arginin
Asn	aszparagin
Asp	aszparaginsav
AT	N-acetil-L-tirozin
ATEE	N-acetil-L-tirozin etil észter
ATMeE	N-acetil-L-tirozin metil észter
CMC	1-ciklohexil-3(2-morfolinoetil) karbodiimid metil-p-toluol szulfonát
CPG	controlled porous glass: meghatározott pórusú üveg
Cys	cisztein
DEAE	dietil-aminoetil-
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetil szulfoxid
EDC	1-etil-3(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid
Gln	glutamin
His	hisztidin
Ile	izoleucin
IR	infra red: infravörös
Leu	leucin
PEG	polietilén glikol
Phe	fenilalanin
Ser	szerin
THF	tetrahidrofurán
Trp	triptofán
Tyr	tirozin