

AMINOACILÁZ HATÁSMÉCHANIZMUSÁNAK ÉS IPARI
ALKALMAZHATÓSÁGÁNAK VIZSGÁLATA

Doktori értekezés

Kiss Jánosné /Deér Aranka/

JATE Biokémiai Tanszék

Szeged

1980.

TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
I. Bevezetés	1.
II. Irodalmi áttekintés	3.
1. Az aminoaciláz előfordulása az élővilágban..	3.
2. A sertésvese aminoaciláz izolálása és tisztítása.....	5.
3. Az enzim fizikai és kémiai sajátosságai	6.
4. A sertésvese aminoaciláz szerkezete	7.
5. Az aminoaciláz reakciómechanizmusa	10.
6. Az enzim immobilizálása és ipari alkalmazása	13.
III. Anyagok és módszerek	15.
1. Felhasznált anyagok	15.
2. Az oldatok fehérjetartalmának meghatározása.	15.
3. Az aminoaciláz katalitikus aktivitásának mérése	15.
4. Az enzim spontán hőinaktiválódásának mérése	18.
5. EDTA-gátlás pH függésének meghatározása	19.
IV. Kísérleti eredmények	20.
1. A sertésvese aminoaciláz tisztítása	20.
1/1. Tisztítás karboximetul-cellulózon	20.
1/2. DEAE-cellulóz ioncserés kromatográfia	20.
2. Az enzinkatalizist befolyásoló tényezők vizsgálata	24.
2/1. A pH hatása a reakciósebességre	24.
2/2. A hőmérséklet hatása a reakciósebességre..	26.
2/3. Az enzim hőinaktiválódásának kinetikája..	26.
2/4. A szubsztrát-koncentráció hatása a reakció sebességére	29.
3. Az enzim aktiv centrumának vizsgálata	32.
3/1. Kísérletek aktiv szerin csoport kimutatására	32.
3/2. K_M , V_{max} pH-függése	33.
3/3. EDTA-gátlás pH-függése	43.



4.	Következtetések a katalizált reakció kémiai mechanizmusára. Az aminoaciláz és a karboxipeptidáz A közötti rokonság kimutatása	47.
5.	Az enzim ipari alkalmazása, az immobilizálás feltételeinek kidolgozása	53.
5/1.	Kinetikai vizsgálatok Akrilex-P gélek Akrilex-C készítményekké alakítására	53.
5/2.	Különböző Akrilex C gélek duzzadásának vizsgálata	57.
5/3.	Aminoaciláz kötése Akrilex C készítményekhez	62.
5/4.	Az immobilizálás feltételeinek vizsgálata	64.
5/5.	Az immobilizált enzim jellemzése	70.
V.	Összefoglalás	75.
VI.	Irodalomjegyzék	78.

I. BEVEZETÉS

A biokémiában a 60-as években kezdődő és napjainkban is tartó ugrásszerű fejlődéséhez nagymértékben hozzájárult az enzimkatalizálta reakciók tanulmányozása. Ezek a kutatások kiterjednek az enzimfehérjék felépítésének, térszerkezetének felderítésén kívül az aktiv centrum, valamint az általuk katalizált reakció kémiai mechanizmusának vizsgálatára is. Mivel napjainkban az ipar is egyre szélesebb területen alkalmazza a biológia, ezen belül az enzimekkel, mint biokatalizátorokkal végzett kutatások eredményeit, még inkább hangsúlyt kapnak az enzimreakciók felderítésére irányuló törekvések.

A disszertáció témája az aminoaciláz, amely a hidrolitikus enzimek közé tartozik, a nem peptid kötés természetű C-N kötések hasítását katalizálja, alkalmas a szintetikusan előállított N-acil aminosavak rezolválására is.

Az aminoacilázt már a múlt század végén tanulmányozták, de részletesebb vizsgálata csak a negyvenes években indult meg. Napjainkban már ismert, hogy az enzim két alegységből áll, meghatározták aminosav-összetételét és szubsztrát-specifitását. Atomabszorpciós mérésekkel kimutatták, hogy az enzim alegységenként egy Zn^{2+} iont tartalmaz. Az aktiv centrum felderítésére végzett

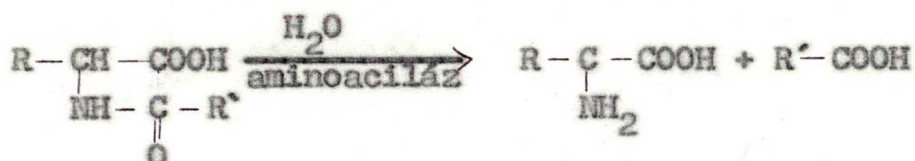
kémiai módosítások még nem tartalmaznak elegendő megbízható adatot arra vonatkozólag, hogy mely aminosavaknak van esszenciális szerepe a katalitikus aktivitásban. Az enzim által katalizált reakció kémiai mechanizmusára vonatkozóan ugyancsak kevés irodalmi adat áll rendelkezésükre.

Munkánk célja ezért az volt, hogy további vizsgálatokat végezzünk az enzim aktív centrumának felderítésére. Felvilágosítást kívántunk nyerni arra nézve, hogy a katalitikus aktivitásért mely aminosav, illetve aminosavak felelősek, valamint mely aminosav oldallánc vehet részt a Zn^{2+} ion koordinációs kötésében. Az irodalmi adatok és a mérési eredmények alapján megkíséreltünk párhuzamot vonni az aminoaciláz és az oxopeptidázok közé tartozó, Zn^{2+} ion tartalmu karboxipeptidáz A aktív centruma és kémiai hatásmechanizmusa között.

Mivel az aminoaciláz kötött formája ipari szempontból is igen jelentős, célul tűztük ki az enzimimmobilizálás optimális körülményeinek kidolgozását hazai alapanyag hordozóra.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az aminoacilázok az élővilágban elterjedt hidrolitikus enzimek. A nem peptid-kötés természetű C-N-kötések hasítását katalizálják. A sertésvese aminoaciláz /EC. 3.5.1.14./ az alifás aminosavak /kivételesen az aszparaginsav/ acilezett származékainak dezacilezését, valamint egyes dipeptidok hasítását katalizálja. Az enzim által katalizált reakció általános egyenlete:



Az aminoacilázok jellemző tulajdonsága az aminosavak optikai izomerjeivel szembeni nagyfokú specifikusság. Nagy gyakorlati jelentőségük miatt a 60-as években intenzív kutatómunka indult meg az enzim jellemzésére, aktiv centrumának felderítésére, valamint immobilizált formájának előállítására és ipari alkalmazására.

1./ Az aminoaciláz előfordulása az élővilágban

Az aminoacilázokat a legkülönbözőbb élő szervezetekből mutatták ki. Pl. a baktériumok közül az *Escherichia coli*-ből izolált enzim az N-acetil-L-ornitin és az N-acetil-L-metionin hidrolizisét katalizálja. Általában a többi bakteriális eredetű aminoaciláz szélesebb specifitású.



Két penész törzsből, a *Penicillium vinaceus*-ből és egy *Aspergillus*-ból Michi és Tsuda /1958/ mutattak ki aminoaciláz aktivitást. Számos magasabbrendű növényi szövetek extraktumából mérték aciláz aktivitást.

Az állati szervezetekből preparált aminoacilázra vonatkozó irodalom jelentős része a sertésvesére vonatkozik, de más fajokból, mint pl. a tonhalból is sikerült aminoaciláz izolálni. Szewczuk /1971/ az N-klór-acetil- -L-glutamil- -naftilamid szintetikus szubsztrátot használva vizsgálta a Co^{2+} aktiválta aciláz előfordulását galamb, patkány, tengerimalac, nyul és emberi szövetek homogenizátumaiban. A legmagasabb aktivitást valamennyi faj esetében a vesében észlelte. Alacsonyabb az aktivitás a májban, a lépben, tüdőben és a belekben. Legalacsonyabb a szív és vázizomban. Az egészséges ember vizelete és vérszéruma nem tartalmaz aciláz aktivitást, de pl. májbetegség /virsos májgyulladás/ esetében a szérumban kimutatható. /Nozdrin-Plotnicki, Jankovcki, 1976./

Ziomek és munkatársai /1979/ a különböző elektroforetikus vándorlásuk alapján választották szét a Co^{2+} -aktiválta acilázok különböző molekuláris formáit. Emberi méh miómából izoláltak és tisztottak Co^{2+} -aktiválta acilázt Tyron és munkatársai /1979/.

Lorentz és társai /1975/a/b/ egy új eljárást dolgoztak ki különböző betegségekben szenvedő emberek szérum aminoaciláz aktivitásának meghatározására.

Az aminoaciláz élettani szerepéről gyakorlatilag semmit sem tudunk. Lugay és Aronson /1964/ a *Parkinsonia aculeata* L. magjából izolálta az enzimet. Vizsgálatuk során felvetették annak a lehetőségét, hogy az aminoacilázok a fehérjeszintézisben résztvevő N-formil-metionin ciklikus regenerálását végzik. Feltételezésüket arra alapozták, hogy az enzim ugynevezett fiziológiai hatásfoka $/K_M, v_{max}/$ az N-formil-metionin szubsztrát esetében a legkedvezőbb. Pier Point /1973/ vizsgálatai szerint azonban az enzim az N-formil-metionint hidrolizálja, de az N-formil-peptideket nem. Ezt Moravcsik és munkatársai /1974/ vizsgálatai is alátámasztják, mely szerint a tiszta enzim csak a dipeptidek hidrolizisét katalizálja.

2./ A sertésvese aminoaciláz izolálása és tisztítása

Az aminoacilázra vonatkozó első irodalmi adat 1881-től Shmiederberg-től származik, de csak az 1940-es években kezdtek részletesebben foglalkozni az enzim tanulmányozásával. Fodor és kutató csoportja /1949/ a sertésvese vizes extraktumának etanolos frakcionálásával állították elő az enzimet. Birnbaum és munkatársai /1952/ nevéhez fűződik az az izolálási eljárás, mely a vizes extraktum pH-, ammoniumsulfátos és acetonos frakcionálásán alapszik. Ezzel az eljárással a korábbi preparátumokhoz viszonyítva magasabb specifikus aktivitású enzimet lehetett előállítani, mintegy 30-szoros tisztulást értek el a kiindulási anyaghoz viszonyítva. A Bruns és Schulcze /1962/ által kidolgozott tisztítási eljárás aceton helyett etanolt alkalmazott, majd DEAE cellulóz ioncserés

kromatográfia alkalmazásával a korábbinál lényegesen tisztább aminoacilázt nyertek.

A 70-es években Kördel és Schneider /1976/ Sephadex G-150 kromatográfia és DEAE-ioncserés kromatográfia kombinált alkalmazásával elektroforetikusan homogén aminoacilázt állítottak elő.

Ipari célokra alkalmas /főleg immobilizált enzim előállítására/ izolálást Szajáni /1979/ dolgozott ki. Különböző emlős fajok /ló, marha, nyul, sertés/ veséjéből oly módon izolálták az enzimet, hogy a szerv vizes kivonatát 70 C°-on 10 percig hőkezelték, majd a denaturált fehérjék eltávolítása után az oldatban maradt fehérjét ammoniumsulfáttal frakcionálták. A dializissel sómentesített enzimet liofilizált formában hozták forgalomba. Ezzel az eljárással egyszerűen lehet ipari célokra alkalmas enzimet előállítani, amely kromatográfiás módszerekkel tovább tisztítható.

3./ Az enzim fizikai és kémiai sajátosságai

Az aminoaciláz molekulaszálya Tsen U Tsi és munkatársai /1958/ szerint 119.000, Bruns és Schulze /1962/ szerint 76.500, Kördel és Schneider /1976/ gélfiltrációval meghatározott értéke 86.000.

Az enzim abszorpció maximuma 280 nm-nél van. Fajlagos extinkciója $E_{1\text{cm}}^{1\%} /280/ = 20,5$, moláris extinkciós koefficiense $1,15 \times 10^5 / \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Izoelektromos pontja 5,1 /Kördel és Schneider 1967/. Bruns és Schulze által meghatározott

szedimentációs konstansa : $S_{20} = 5,5 \times 10^{-3} \text{ sec}$

diffúziós konstansa : $D_{20} = 7,02 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$

4./ A sertésvese aminoaciláz szerkezete

Az utóbbi években német kutatók - elsősorban Kördel és Schneider /1976/ - foglalkoztak behatóan az aminoaciláz primer szerkezetének és aktív centrumának felderítésével. Meghatározták az enzim aminosav összetételét. Méréseik szerint az enzim 772 aminosavból áll, melynek molekulásúlya 85,500. 12 triptofán, 24 hisztidin és 12 cisztein oldal-láncot találtak. Az enzim negyedleges szerkezetét SDS jelenlétében gélelektroforézissel határozták meg. 43.000 molekulásúlynak megfelelő erős és 86.000 Ms-nak megfelelő gyenge csíkot kaptak anélkül, hogy az enzimet előzőleg merkaptoetanollal vagy perhangyasavval kezelték volna. Ennek megfelelően a molekula két alegységből áll, melyek nincsenek diszulfid hidakkal összekapcsolva.

Az enzim mindkét alegysége két különböző reaktivitású -SH csoportot és két diszulfid kötést tartalmaz, melyek közül az egyik könnyen hasítható SH- reagensekkel, a másik csak perhangyasavas oxidációval.

A két SH- csoport kémiai módosításával az aminoaciláz elveszti katalitikus aktivitását. A két diszulfid kötés felszakítása szintén inaktíválja az enzimet. Ez arra enged következtetni, hogy dimer enzimnek két aktív centruma van, amely egy esszenciális -SH és egy diszulfid kötést tartalmaz. Feltételezhető, hogy mindegyik alegységnek egy aktív centruma van.

A pH függés vizsgálatainak alapján az esszenciális -SH csoport ciszteinhez rendelhető / $pK = 8,36$ /. Kördel és Schneider /1975/ szubsztrátspecifitásra vonatkozó és kompetitív inhibitorokkal végzett kísérleteikből azt a következtetést lehet levonni, hogy az aminoaciláznak erős hidrofób kötőhelye van. Az esszenciális -SH csoport valószínűleg a hidrofób környezetben vagy ahhoz közel található. Az aminoacilázt triptofán reagenssel módosítva /1 H-diazotetrazol és N-bróm szukcinimid/ elveszti aktivitását. Az enzim szubsztrátjai és inhibitorai nem védik a két reaktív triptofánt a módosító reagensekkel szemben. Az enlitett szerzők 1977-ben megjelent munkájukban ismertetik az aciláznak metilénkék és oxigén jelenlétében végrehajtott besugárzással történő inaktiválódását. A teljes reakcióperiódus alatt az elbomlott hisztidin-triptofán arány 2:1 volt /amely megfelel az aminosav összetétel alapján meghatározott 24 hisztidin és 12 triptofán aminosav oldatláncnak molekulánként/, tehát a két aminosav megközelítően egyformán aktív. A fotooxidáció pH függéséből kimutatták, hogy 4 molekula hisztidinvesztés után az enzim teljesen inaktiválódik. Dietilpirokarbonáttal inidazol reagenssel módosítva az enzimet, bebizonyosodtak arról, hogy a hisztidinnak esszenciális szerepe van a katalitikus aktivitásban. Mindezeket a kísérleti eredményeket csak bizonyos fenntartással fogadhatjuk el, mivel az alkalmazott módszerek /besugárzás metilénkék és oxigén jelenlétében/ az enzim szempontjából durva behatásnak tekinthetők és kontroll kísérletek sem támasztják alá a mérési eredmények jogosságát.

Löffler és munkatársai /1975/, később Frey és munkatársai /1977/ kísérletei szerint az enzim TPCK-val is inaktiválható. Az inaktiválódás pH függéséből egy olyan aminosó csoport jelenlétére következtettek, amely a szubsztrát karboxilát anionjának megkötésében vehet részt. Ezt támasztották alá Szajáni és munkatársai /1978/ TNBS-sel végzett inhibíciós vizsgálatai, amelyek arra utalnak, hogy az ES-komplex kialakulásában egy szabad aminosó csoport is közrejátszik.

A 40-es évekből számos irodalmi adat található arra vonatkozóan /Maschmann 1941; Johnson 1942; Smith 1949/, hogy a különböző peptidázokra a Co^{2+} ionnak és egyéb bivalens kationoknak aktiváló hatása van. Rao /1952/, Marschall /1956/ és munkatársaik különböző reaktivitású klóracetil- és glicil-aminósav hidrolízisét tanulmányozták kobaltklórriddal előinkubált aminoacilázzal. Az így előállított kobalt-aktivált aminoaciláz /aciláz-I A/ reaktivásban és sztereospecifitásban különbözik az aciláz-I-től. Minden szubsztrátra meghatározott Michaelis konstans értékét kisebbnek, a $v_{\max}$ értékét pedig közel azonosnak találták a kobalt-aktivált aminoaciláz és az aminoaciláz esetében. Meg kell azonban jegyezni, hogy az említett szerzők vizsgálatainak nem eléggé egzaktak.

Kördel és munkatársai /1977/b/ kísérletei szerint az aminoaciláz kelátképző ágensekkel /EDTA, o-fenantrolin/ inkubálva elveszti aktivitását, majd Zn^{2+} hozzáadásával

visszanyeri. Hasonló eredményre jutottak Szajáni és munkatársai /1980/, akik az inaktív apoenzimhez Co^{2+} -t adva is azonos reaktiválódást tapasztaltak.

Az aminosziláz fémion tartalmát Kördel és munkatársai mellett Moravcsik és kutató csoportja is meghatározta / $1,9 \pm 0,5$ atom Zn/86.000 g értéket kaptak/. Az enzim tehát alegységenként 1 atom Zn-t tartalmaz.

Az irodalmi adatokat összefoglalva, tehát a sertésvese aminosziláz két alegységből áll és két aktív helyet tartalmaz. Alegységenként egy cinkatom és egy -SH- csoport esszenciális az enzim aktivitásához. A kémiai módosítás eredménye: két triptofán molekula és egy szabad aminos csoportot tartalmazó oldallánc része a kötőhelynek. Valószínűleg négy hisztidin oldallánc vesz részt a fémionok megkötésében. Az -SH reagensek inaktiválják az enzimet két diszulfid-híd megszüntetésével, amelyek az aktív konformáció fenntartásában vesznek részt. A szubsztrátok szabad karboxilcsoporttal kell, hogy rendelkezzenek. Valószínűleg ez a szabad karboxilcsoport létesít kapcsolatot a szabad aminos csoporttal rendelkező aminosav-oldallánccal.

5./ Az aminosziláz reakciómechanizmusa

A sertésvese aminosziláz az acilezett alifás aminosavak /kivéve aszparaginsav/ hidrolizisét katalizálja, ezenkívül dipeptidek is lehetnek az enzim szubsztrátjai.

Az enzim szubsztrátspecifitás vizsgálatára már Birnbaum és munkatársai /1952/ végeztek kísérleteket. Az N-acetil-D-aminósavak enzimés hidrolizise egyáltalán nem, vagy csak igen kis sebességgel megy végbe.

Adott acil-gyök esetében a hidrolízis sebessége az aminosav természetétől függően változik. Legnagyobb hidrolízis sebességet L-metionin acilezett származékainál tapasztaltak /Marschall és társai 1956/.

Az enzimés hidrolízis sebességére nagy hatással van a C-terminális aminosav oldallánc hossza és térkitöltése. Az alkil oldallánc növelésével - a hidrofob kölcsönhatás erősödése következtében - a hidrolízis sebessége nő. Valinnál maximumot ér el. Tovább növelve a szénlánc hosszát, a hidrolízis sebessége csökken. Aromás aminosavak acilszármazékainak hidrolizise lényegesen kisebb sebességgel megy végbe /Greenstein 1957/.

Mounter és munkatársai /1958/ egyenes és elágazó szénláncu szubsztrátok esetében mérték a reakció sebességét, és a 6 szénatomos aminosavnál tapasztalták a maximális értéket. Megállapították, hogy az elágazó szénláncu vegyületek hidrolizise kisebb sebességgel megy végbe - sztérikus akadályok miatt -, mint az alifás aminó⁸avak megfelelő származékai.

Az acil aminosavak α -hidrogénjét metilcsoportra cserélve a hidrolízis sebességének csökkenését eredményezi. /Baker és munkatársai 1952/ Az amid-kötés alkil csoporttal

való szubsztitúciója pedig meggátolja a dezacilezést /Greenstein 1957/.

Azonos aminosav esetében a hidrolízis sebesség változik az N-acilgyök természetétől függően. Ha az acil-gyök alkil-karbonsavaktól származik, a lánchossz növekedésével csökken a dezacilezés sebessége /Moravcsik és mtsai 1971/.

Ütvös és mtsai /1977/ az acil-résztől függő legnagyobb sztereospecifitást a dipeptidok hidrolízise esetén tapasztaltak. A homológ sorba tartozó vegyületek sztereospecifitásában lényeges különbség mutatkozik. Ez a különbség elsősorban a D-konfigurációjú acil-csoportot tartalmazó szubsztrátok eltérő reaktivitásából származik. A katalitikus hely közelében a szterikus gátlásbeli effektusok fokozottabb mértékben érvényesülnek.

Az enzim által katalizált reakció mechanizmusát illetően már Fu és Birnbaum /1954/ felvetették, hogy az enzim-szubsztrát komplex kialakulásában nagy szerepe van az asszimetria szénatomhoz kapcsolódó atomnak, illetve atomcsoportoknak. Később Moravcsik és munkatársai /1971-1977/ vizsgálták részletesen az enzim-szubsztrát komplex kialakulását befolyásoló tényezőket. Megállapításuk szerint az enzim és a szubsztrát két ponton lép kölcsönhatásba egymással. Az egyik a C-terminális aminosav, a másik a szubsztrát és az enzim hidrofób kölcsönhatása. Véleményük szerint a dipeptidok kötésében a hidrofób kölcsönhatásnak nincs szerepe. Ezzel ellentétes Kördel és Schneider /1977/ elképzelése. Szerintük

a dipeptidek N-terminális aminosava az enzim egy erősebb hidrofób részletéhez kötődik.

6./ Az enzim immobilizása és ipari alkalmazása

Az aminoacilázok jellemző tulajdonsága az aminosavak optikai izomerjeivel szembeni nagyfokú specifikusság. Az aminosavak optikai izomerjei iránti nagy kereslet és a világszerte megnövekedett igények - a szintetikusan előállított N-acetil racemátok enzimesszétválasztására terelte a figyelmet. A szétválasztás immobilizált aminoacilázokkal történhet ipari méretekben.

Az első irodalmi adatok a 60-as évekből valók, főleg Japán szerzők munkái /Kirimura és Yoshida 1966, Tosa és munkatársai 1966, 1967/. Kutatómunkájuk eredményeképpen a 70-es években felépült az immobilizált enzimen alapuló ipari eljárás kísérleti üzeme racem aminosavak optikai izomereire való szétválasztására /Chibata és munkatársai 1972/. Ezeknél az eljárásoknál főleg mikrobiális eredetű aminoacilázokat alkalmaztak. A sertésveséből izolált enzim immobilizálására csak kevés irodalmi adat ismeretes.

Az első, DEAE-cellulózra immobilizált sertésvese aminoacilázát /Mitz és Schlueter 1959/ állították elő. Jódacetyl-cellulózra, illetve üveggorra kovalens kötéssel keresztül immobilizált aminoacilázát Ohno és Stahman /1971/, valamint Maskova és munkatársai /1973/ készítettek.

Az immobilizált aminoacilázok gyakorlati alkalmazásával kapcsolatban a legjelentősebb munkát Chibata japán kutató és munkatársai végezték. Ioncserélő szorbensre /elsősorban DEAE-Sephadexre/ immobilizálták az enzimet. L-dihidroxil-fenilalanin, illetve L-metionin termelésre létrehoztak az immobilizált aminoacilázon alapuló ipari eljárást.

Gyakorlati szempontból még jelentős Marconi /1975/ cellulózotriacetátra, valamint Yokote és munkatársai /1975/ alkilaminó-üvegre immobilizált aminoacilázának ipari alkalmazása.

Hazánkban a Reanal Finomvegyszergyár kapcsolódott bele az aminosavak optikai izomerjeinek immobilizált aminoacilázzal történő elválasztásába ipari méretekben. A gyár olyan immobilizált enzim előállítására törekedett, amely a katalitikus aktivitás magas értéke mellett megfelelő stabilitással is rendelkezik, és így ipari célokra alkalmazható. Ennek a célnak megvalósítása érdekében számos hordozót és kapcsolási eljárást próbáltak ki. A legjobb eredményeket egy polianionos karakterű, poliakrilamid alapvázú hordozó vízoldható karbodiimidés aktiválása révén kaptak /Szajáni és munkatársai 1979/. Ebbe a munkába kapcsolódott be tanszékünk is. Feladatunk a megfelelő tulajdonságú poliakrilamid gél előállítása, a gél tulajdonságainak, valamint a gélhez történő aminoaciláz immobilizálás feltételeinek vizsgálata volt.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1./ Felhasznált anyagok

Az aminoaciláz sertésveséből izolált, sómentes liofilizált készítmény, a Reanal Finomvegyszergyár Biokémiai Laboratóriumában preparálták. Specifikus aktivitása 2000-3000 EU/mg, 298 K-en, pH=7,0-nál N-acetil-L-metionin szubsztráttal.

A kísérlet során felhasznált vegyszerek közül a Servacell DEAE-32, a TNBS, az EDTA, ninhidrin és a metilcelloszolv Merck gyártmány volt. Az összes többi vegyszer Reanal készítmény volt és további tisztítás nélkül került felhasználásra.

2./ Az oldatok fehérjetartalmának meghatározása

A nativ enzim fehérjetartalmát a 280 nm-en mért extinkció mérés alapján határoztuk meg. Az enzim fajlagos extinkciója $E_{1\%}^{1\text{cm}} / 280 \text{ nm} = 20,5$, moláris extinkciós koefficiense $1,15 \times 10^5 / \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Az immobilizált enzim fehérjetartalmát indirekt módon, a reakcióelegybe vitt és az immobilizálási eljárás után a felüluszóban, illetve a mosófolyadékban maradt fehérjekoncentráció különbségeként határoztuk meg.

3./ Az aminoaciláz katalitikus aktivitásának mérése

Az aktivitás meghatározása történhet mind a dezacilezési folyamat előrehaladtának /N-acil-aminósav mennyiségének csökkenése/, mind pedig a termék /aminósav/ keletkezésének nyomonkövetésével.

Az aminóaciláz aktivitását általában specifikus szubsztrátjával, az N-acetil-L-metioninnal szemben mérik, s az enzim egy 1 mg-ja által időegység alatt elbontott μM acetil-metionin mennyiségével adják meg. Meghatározására több módszer ismeretes:

a./ Az amid-kötés hidrolitikus hasítása közvetlen spektrofotometriásan mérhető a 238 nm-es abszorpció csökkenése révén /Mitz e Schloeter 1955/.

Az oldott enzim aktivitásának meghatározásakor 1,6 ml 0,015 M N-acetil-L-metionin /0,1 M foszfát pH=7,0/ szubsztráthoz 0,1 ml megfelelő hígítású /kb. 1 mg/ml/ enzimoldatot mérünk. VSU2-P /Carl Zeiss Jéna/ spektrofotométeren szubsztrát összehasonlítóval szemben 2 percig, 15 másodpercenként mérjük az extinkció értékét 238 nm-en. Meghatároztuk az 1 percre eső extinkció csökkenés értékét. Az N-acetil-L-metionin moláris extinkciós koefficiensének $/\epsilon = 1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}/$ ismeretében a következő egyenlettel számítható az enzim specifikus aktivitása:

$$\text{EU/mg} = \frac{E_{238}/\text{perc} \times 1,7}{0,018 \times 0,1 \text{ mg fehérje}} \quad / \mu\text{M}/\text{perc} \times \text{mg}/$$

Tehát 1 EU/mg annak az enzimnek a specifikus aktivitása, amelynek 1 mg-je 1 perc alatt 1 μM -nyi N-acetil-L-metionint bont.

b./ Meghatározhatjuk az enzim aktivitását a katalizált reakció során felszabaduló aminosav mennyiségének mérésével is. A reakció-elegyből megfelelő időközökben vett aliquotok-

ból - hőkezeléssel történő leállítás után - ninhidrines módszerrel, mely eljárás Moor és Stein /1948/ dolgozták ki.

A standard reakcióelegy 1,0 ml 0,1 M N-acetil-L-alanin vagy 0,015 M N-acetil-L-metionin /0,1 M pH=7,0 foszfát pufferben/ tartalmazott, amelyhez a nativ enzimből 0,1 ml-t adtunk.

Az inkubálási időket a várható aktivitásnak megfelelően választottuk meg. A reakció leállítása 10 perces forró vízfürdőben való hőkezeléssel történt. Lehűlés után ebből az oldatból 0,1 ml aliquotokkal végeztük el a ninhidrides analízist 1,0 ml ninhidrin oldat hozzáadásával. A kémcsöveket alufóliával lezárva 20 percig forró vízfürdőn inkubáltuk. Ezután a még forró oldathoz 5 ml n-propanol:víz 1:1 elegyét adva 15 perc állás után 570 nm-en mértük az extinkció értékét. Metionin, illetve alaninból standard kalibrációs görbét készítettünk, melynek segítségével meghatároztuk az oldatok aminosav koncentrációját.

A katalitikus reakció során keletkező aminosavat a TNBS-sel történő reakciójával is meghatározhatjuk. Ezt a kolorimetriás eljárást Mokrasch és munkatársai dolgozták ki aminok, aminosavak és proteinek keverékének meghatározására. A standard reakcióelegy és körülménye a ninhidrines analízisnél leírtakkal azonos volt. A reakció leállítása úgy történt, hogy a reakcióelegyből 0,1 ml aliquotot 0,9 ml 0,1 M-os $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -hoz adtuk és 10 percig forró vízfürdőn hőkezeltük. Ehhez az oldathoz lehűlés után 0,1 ml 0,03 M TNBS-t adva 10 percig 40°-on inkubáltuk. 2 ml 0°-os



metanol hozzáadása után 420 nm-en mértük az extinkciót. Az aminosavak TNBS-sel felvett standard kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg az adott idő alatt az enzim által elbontott szubsztrát mennyiségét.

Minden aktivitási érték meghatározásához kinetikai görbét vettünk fel. 0-15 percig /3 percenkénti mintavétel/ határoztuk meg a felszabaduló aminosav mennyiségét. Mind a TNBS-sel, mind a ninhidrinnel történő aktivitási mérési módszer esetében az enzim specifikus aktivitását az alábbi egyenlettel számítottuk ki:

$$\text{EU/mg} = \frac{\mu\text{M aminosav} \times \text{hígulás}}{\text{reakcióidő/perc} \times \text{enzim mg}} \quad / \mu\text{M/perc} \times \text{mg}/$$

c./ Meghatározhatjuk az enzim aktivitását az N-acil-aminósav hidrolizise során felszabadult aminosav pH-stat rendszerben luggal való titrálással. Ezt az eljárást tanácsunkon dolgoztuk ki az enzimaktivitás lugos pH tartományban való meghatározására.

4./ Az enzim spontán hőinaktiválódásának mérése

Az enzim spontán hőinaktiválódását különböző hőmérsékleteken végeztük el. 0,9 ml 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ puffert /pH=7,0/ az adott hőfokon 5 percig előinkubáltuk, és ehhez adtuk az 1 mg/ml koncentrációju enzimoldat 0,1 ml-ét. Ebből a reakcióelegyből 0,1 ml aliquotokkal 303 K-en mértük a különböző időkben kivett enzim-minta maradék aktivitását TNBS-sel történő aminosav meghatározással.

5./ EDTA-gátlás pH függésének meghatározása

Az enzimnek EDTA-val történő gátlásakor a reakcióelegy aminosziláz koncentrációja minden esetben $5,85 \times 10^{-5}$ M, az EDTA-é 10^{-1} M-os volt. Az alkalmazott puffer 0,1 M foszfát volt, melyet különböző pH értékekre állítottunk be. Ebben a pufferben oldottuk az enzimet, illetve az EDTA-t is. Oldás után ismételtén a kívánt pH értékre állítottuk az oldatokat. 1 ml EDTA oldathoz 1 ml enzimoldatot mértünk és 310 K-en inkubáltuk. Rögtön az összeöntéskor /0 perc/, majd különböző időkben 0,1 ml mintát vettünk ki 0,9 ml jeges pufferbe /0,1 M pH= 7,0 foszfát puffer/. Az aktivitásokat ebből a hígítással és hűtéssel leállított reakcióelegyből TNBS-sel történő aktivitás méréssel határoztuk meg 303 K-en. Minden pH értéken azonos enzinkoncentrációban EDTA-nélküli kontrollokat készítettünk.

IV. KISÉRLETI EREDMÉNYEK

1./ A sertésvese aminoaciláz tisztítása

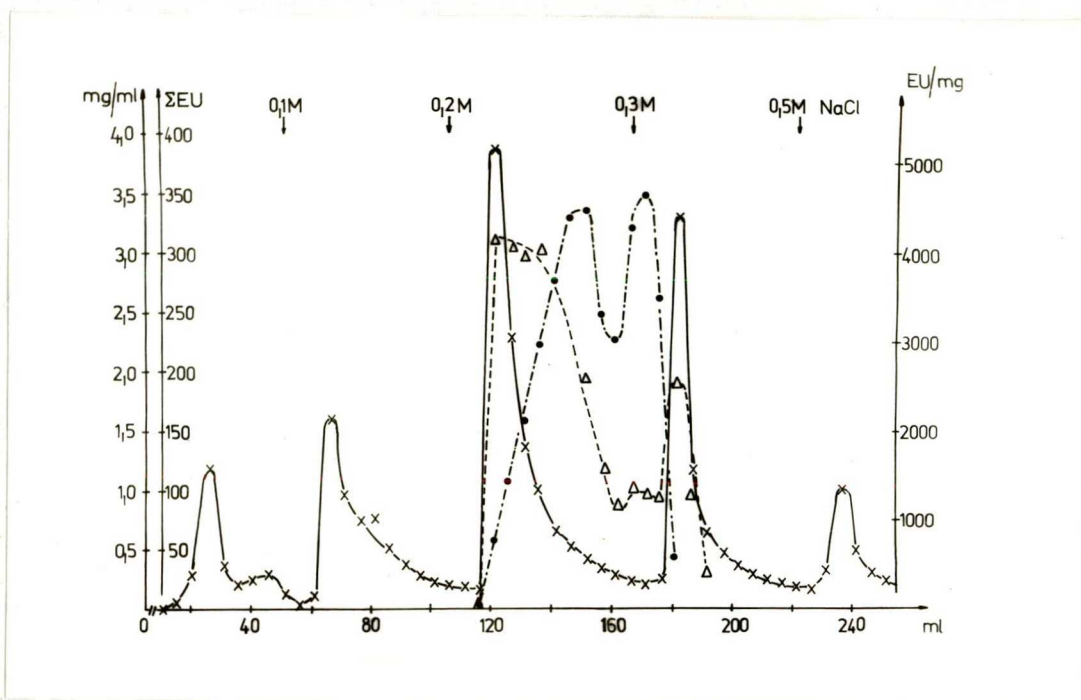
Kísérleteinkhez használt aminoaciláz a Reanal Finomvegyszergyárban Szajáni /1979/ által kidolgozott módszerrel izolálták. Ez a preparátum ipari felhasználásra /pl. immobilizálás útján/ közvetlenül is alkalmas, azonban a biokémiai jellemzéséhez csak további tisztítási lépések után volt felhasználható.

1/1. Tisztítás karboximetil-cellulózon

Első tisztítási lépésként az enzimet egy 0,1 M pH=7,0 foszfát pufferrel ekvibrált karboximetil-cellulóz oszlopra vittük fel. A nem kötődött fehérjéket a fenti pufferrel kimostuk, mértük a frakciók fehérjetartalmát és aktivitását. Az alkalmazott körülmények között az aminoaciláz a kationcserélőn nem kötődik, a pufferes mosással a frakciókban visszamérhető volt az összes felvitt fehérje és enzimaktivitás.

1/2. DEAE-cellulóz ioncserés kromatográfia

A részlegesen tisztított liofilizált aminoacilázt 0,05 M pH=7,5 TRISZ/HCl pufferben feloldottuk és a fenti pufferrel ekvibrált Servacell DEAE-32 oszlopon kromatografáltuk. Egy 25 cm³-es /1,4 x 16,7 cm/ ioncserélő oszlopra 200 ng enzimoldatot vittünk fel. Az alkalmazott körülmények között a fehérjék mintegy 90 %-a megkötődött. Az eluciót lépcsős NaCl koncentráció gradienssel végeztük /1. ábra/.



1. ábra

A sertésvese aminoaciláz tisztítása DEAE-cellulózon lépcsős
NaCl koncentráció gradienssel

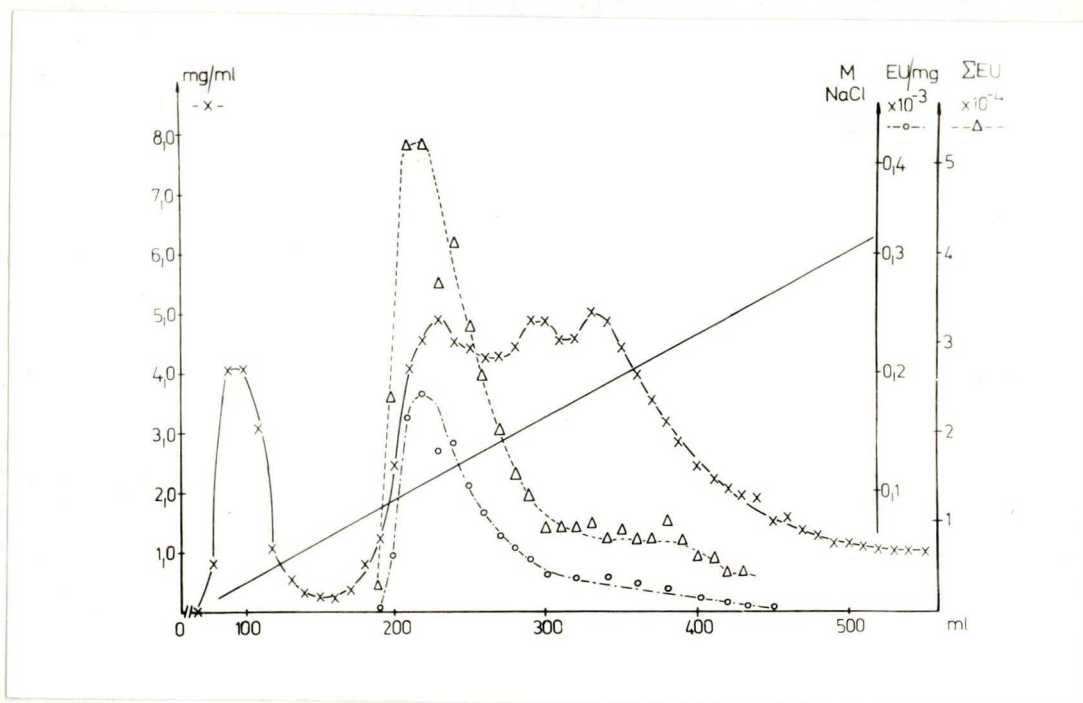
x-x : fehérjetartalom mg/ml, $\Delta - - \Delta$ EU, $\bullet - \bullet - \bullet$ EU/mg

Az oszlop térfogata 25 cm^3 / $1,4 \times 16,7 \text{ cm}$ /

Az eluálást 50 mM pH=7,5 TRIS/HCl pufferben oldott 0,1-0,5 M
NaCl-dal végeztük.

Az enzim 0,2 M NaCl-dal már eluálható, de csak nagy térfogattal, míg a 0,3 M NaCl az összes még kötődött enzimet eluálja. A preparátumot szennyező sárgás festékanyag a DEAE cellulózon igen erősen adszorboálódik /a festékanyag koncentrációját abszorpciós maximuma alapján nem lehetett meghatározni, mert a spektrum nem tartalmazott egyetlen jellemző csucst sem/.

Meg kell jegyeznünk, hogy a legnagyobb specifikus aktivitás nem esik egybe a fehérje és az enzimaktivitás maximum helyével. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az enzim tisztulása lépcsőzetes elució során csak részleges. Ezért célszerűnek látszott lineáris NaCl koncentráció gradiens alkalmazása. A 0,1 M pH=7,5 TRISZ/HCl pufferben feloldott liofilizált enzimet először Sephadex G-25-ön kromatografáltuk az esetleg még jelenlévő $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eltávolítása céljából. A sómentes enzimoldatból 500-700 mg fehérjét vittünk fel egy 97 cm^3 -es, $2 \times 32 \text{ cm}$ / a fenti pufferrel egyensúlyba hozott DEAE-cellózoszlopra. A nem kötődött fehérjéket pufferrel kimostuk, majd lineáris NaCl-gradienssel /0-0,4 M/ eluáltuk az enzimet /200 ml puffer - 200 ml 0,4 M NaCl tartalmu puffer/ 30 ml/óra eluálási sebességgel. 10 ml-es frakciókat szedtünk, melyeknek mértük aktivitását és fehérjetartalmát. A NaCl koncentrációját vezetőképességn mérés alapján határoztuk meg /2. ábra/.



2. ábra

Az aminoaciláz ioncserés kromatográfiája DEAE-cellulózon,
lineáris NaCl koncentráció gradienssel

x-x Fehérjetartalom mg/ml, Δ-Δ-Δ EU, o-o-o-o : EU/mg

Az oszlop térfogata 97 cm³ / 2 x 32 cm/

Az eluciót 0-0,4 M NaCl tartalmu 0,1 M pH=7,5 TRIS/HCl
pufferrel, 30 ml/óra elútlási sebességgel végeztük.

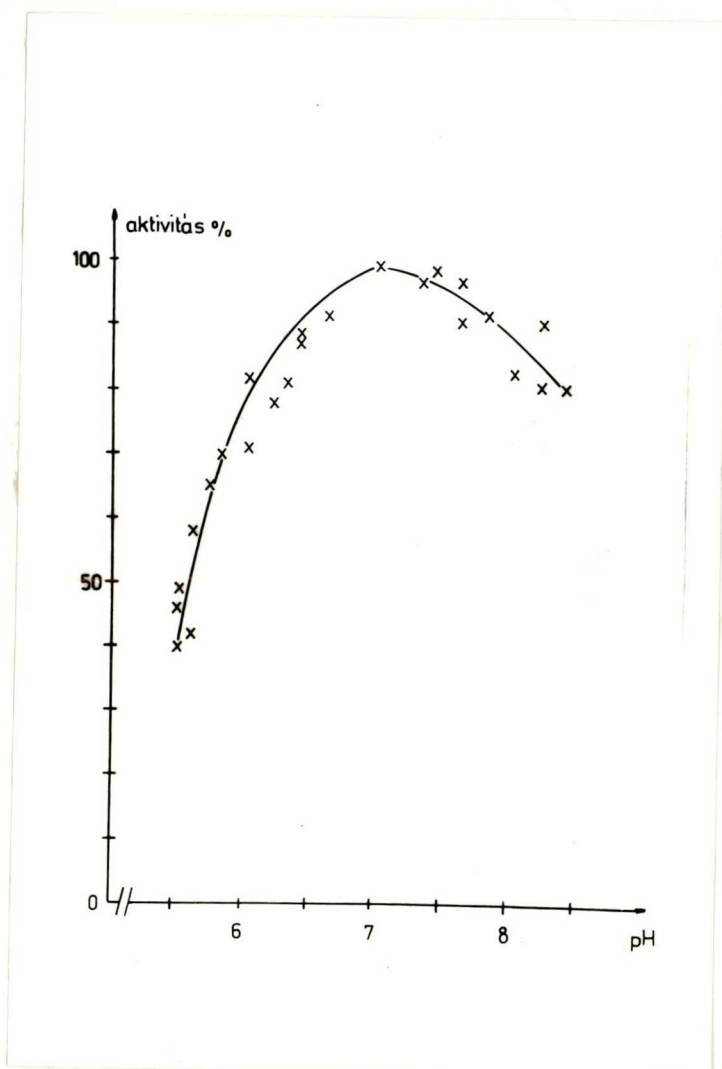
A fehérje a sógradienssel történő elució hatására három csucsban jelenik meg, melyek közül az első tartalmazza az enzimaktivitás 80 %-át. Ezekben a frakciókban az enzim specifikus aktivitása 4.500-5.000 EU/mg, amely 5,5-szörös tisztulást jelent. Az összegyűjtött aktív frakciókat szilárd ammóniumsulfáttal telítettük /266 g só/l oldat/ és 277 K-en tároltuk.

Az így nyert preparátum hónapokig nem veszített aktivitásából. Felhasználás előtt Sephadex G-25-ön kromatografáltuk az ammóniumsulfát eltávolítása céljából.

2./ Az enzinkatalizist befolyásoló tényezők vizsgálata

2/1. A pH hatása a reakciósebességre

Az enzinkatalizis optimális pH-jának meghatározásakor a szubsztrát pH-ját 303 K-en állítottuk be a kívánt értékre, és mértük a reakció kezdeti sebességét pH= 5,5-9,0 tartományban. A vizsgálatok során 0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ puffert használtunk. Az enzim aktivitás változását a pH függvényében a 3. ábrán tüntettük fel. A sertésvese aminoaciláz által katalizált reakció optimális pH-ja 7,0. A reakcióelegy savanyítására az enzim aktivitása nagyobb mértékű csökkenést mutat, míg az optimumtól lúgosabb pH tartományban kisebb mértékű az aktivitás csökkenés.



3. ábra

Az aminoaciláz aktivitásának pH függése 303 K-en

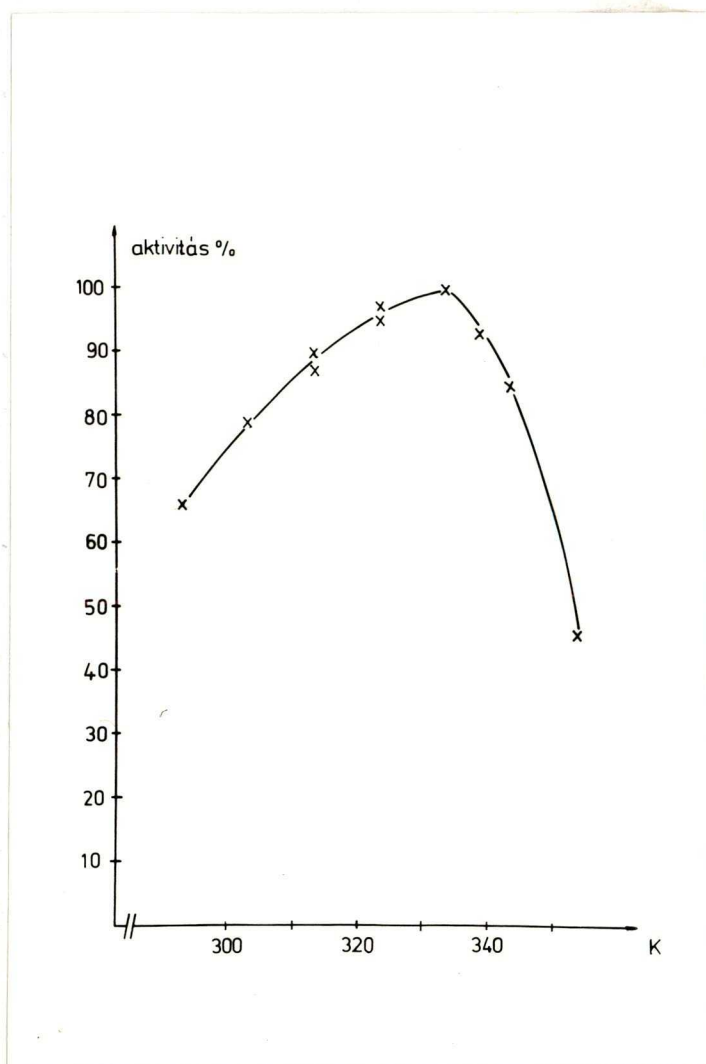
Az alkalmazott puffer 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ volt.

2/2. A hőmérséklet hatása a reakciósebességre

Az aminoaciláz által katalizált reakció hőmérséklet-függését 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pufferben pH=7,0 értéken határoztuk meg. A reakcióelegy hőmérsékletét 293-353 K között változtattuk és mértük az enzim aktivitását /4. ábra/. 15 perces reakcióidőt választva, az aktivitás hőmérséklet-függésének maximum pontja 333 K környezetében mérhető. Ennél magasabb hőmérsékleten az enzim denaturációja jelentősen felgyorsul, 353 K-en a maximális aktivitásnak már csak 45 %-a mérhető.

2/3. Az enzim hőinaktiválódásának kinetikája

A sertésvese aminoaciláz spontán hőinaktiválódásának sebességét 313 és 358 K közötti hőmérsékleteken, pH=7,0 értéken határoztuk meg. Az adott hőmérsékleten különböző inkubációs időkhöz tartozó maradék aktivitásokat 0,1 M foszfátpufferben, N-acetil-L-alanin szubsztráttal mértük meg 303 K-en. Az adott hőfokon 0 percig inkubált enzim aktivitását 100 %-nak véve, a maradék aktivitások %-át az előinkubációs idő függvényében az 5. ábrán tüntettük fel. Mint látható, az enzim 313 K-en 60 perc alatt sem veszít az aktivitásából, 323 K-en ugyanennyi idő alatt az aktivitás 35 %-kal csökkent, de 16 óra múlva is még 33 % maradék aktivitás tapasztalható. 303 K-en a hőinaktiválódás nem követ látszólagos elsőrendű kinetikat, míg az ettől magasabb hőmérsékleteken a féllogaritmikus ábrázolásban minden esetben a látszólagos elsőrendű kinetikának megfelelően egyenest kaptunk.

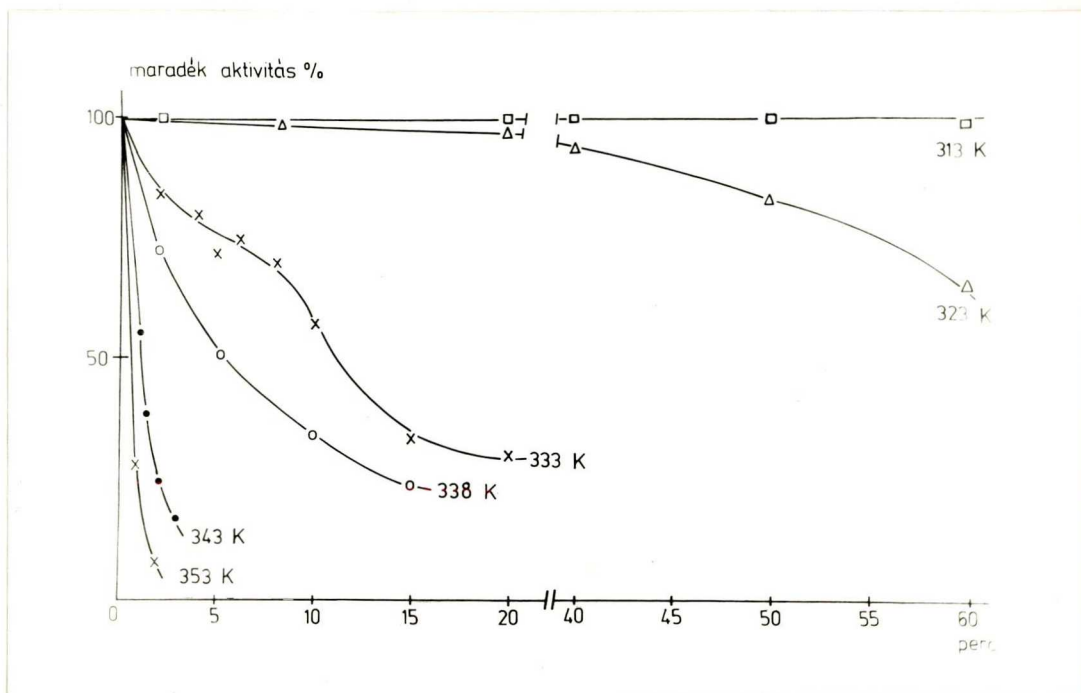


4. ábra

A hőmérséklet hatása az aminoaciláz aktivitására

A kísérleteket 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{HPO}_4$ pH=7,0 pufferben végeztük, az inkubálási idő 15 perc volt.





5. ábra

A hőmérséklet hatása az aminosziláz aktivitására

A maradék aktivitások százaléka az előinkubálási idő függvényében.

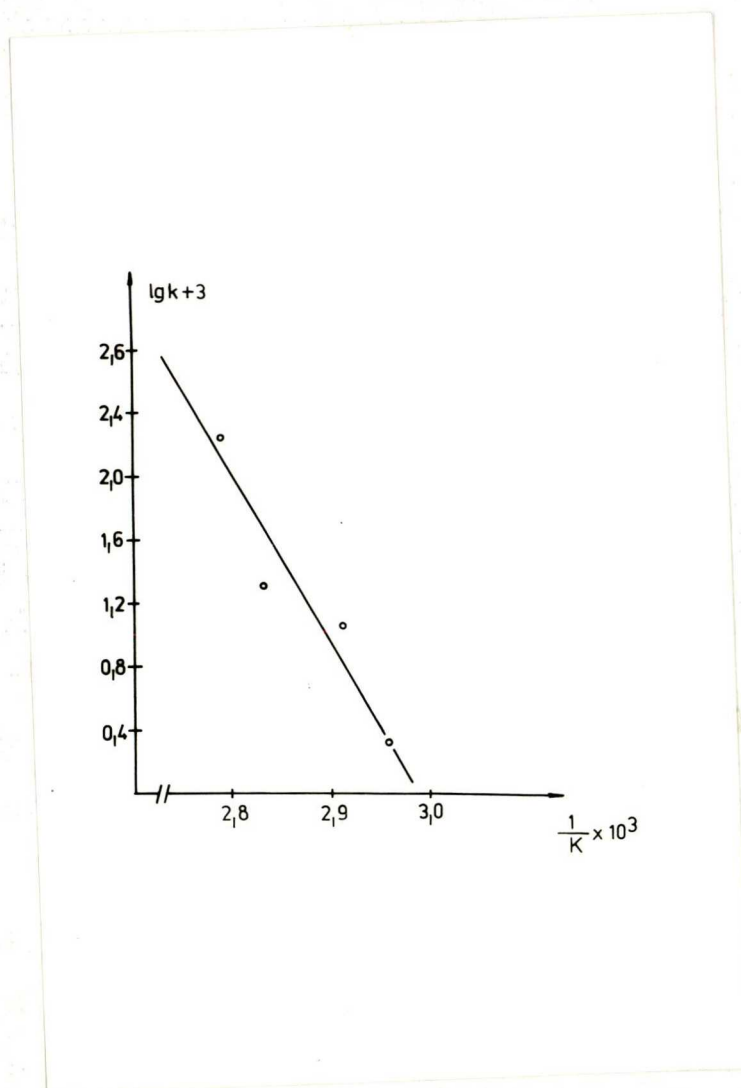
Az enzimet 313-353 K közötti hőmérsékleten, 0,1 M foszfát-pufferben inkubáltuk.

Ernek oka valószínűleg az lehet, hogy a dimer enzim disz-szociál és a dimer, illetve monomer hőstabilitása eltérő.
/Szajáni 1979/.

A $k = \ln 2 / \tau_{1/2}$ összefüggés alapján meghatároztuk a hőinaktiválódás sebességi állandóit és ezeknek logaritmusát ábrázoltuk az abszolút hőmérséklet reciprokanak függvényében /6. ábra/. Az Arrhenius összefüggés $\Delta H = -2,303 \times R \times T_g$ segítségével az aminoaciláz spontán hőinaktiválódásának aktiválási energiáját $2,07 \times 10^5$ J/M értéknek határoztuk meg.

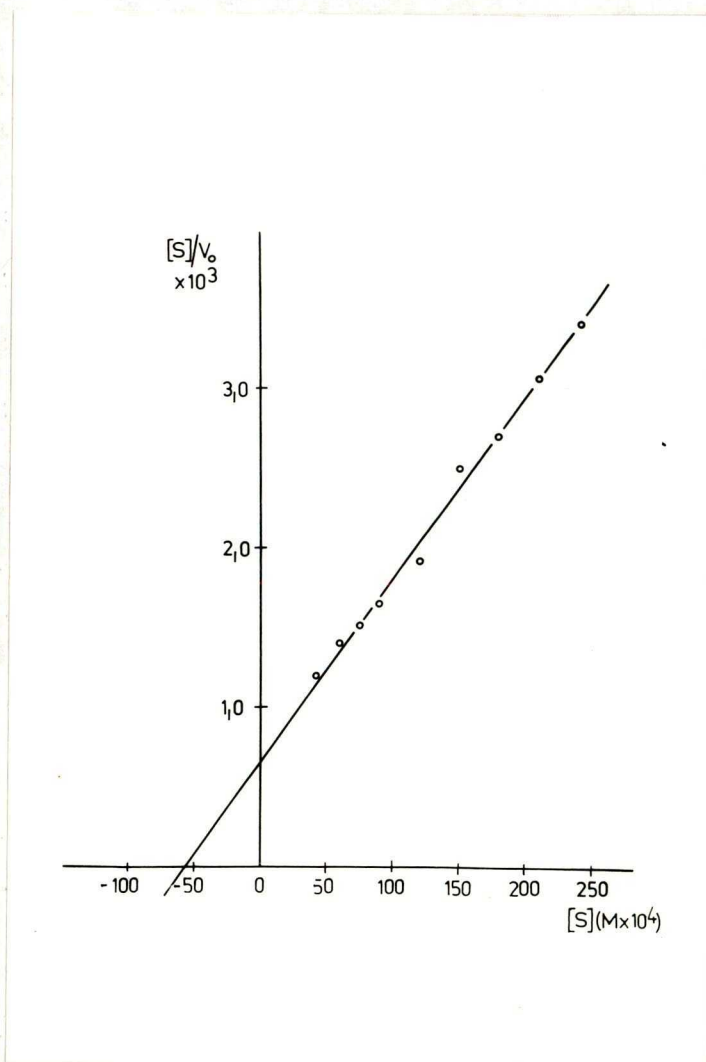
2/4. A szubsztrát-koncentráció hatása a reakció sebességére

A katalizált reakció kinetikai állandóinak K_M és v_{max} meghatározását az enzim szintetikus szubsztrájtára, az N-acetil-L-metioninra határoztuk meg, 0,1 M foszfát pufferben /pH=7,0/. Az enzimaktivitásokat 303 K hőmérsékleten mértük. A Hanes-féle grafikus ábrázolással /7. ábra/ az abszcisza tengely metszetéből meghatározott Michaelis konstans értéke $K_M = 5,4 \times 10^{-5}$ M-nak adódott, amely jó egyezést mutat Kördel és Schneider /1976/ által meghatározott értékkel.



6. ábra

Az aminoaciláz spontán hőinaktiválódás aktiválási
energiájának meghatározása Arrhenius összefüggés
alapján $\Delta H = 2,07 \times 10^5 \text{ J/M}$



7. ábra

A szubstrátkoncentráció hatása a reakció sebességére.
Hanes-féle ábrázolás a kinetikai konstansok meghatározására

3./ Az enzim aktiv centrumának vizsgálata

3/1. Kísérletek aktiv szerin csoport kimutatására

Az endonukleázok egy része szerin-enzim. Felmerült a kérdés, hogy az aminoaciláz a tripszinhez és a kimotripszinhez hasonlóan tartalmaz-e szeril oldalláncot az aktiv centrumban. Ezért megvizsgáltuk, hogy az enzim fenil-metil-szulfonil-fluoriddal /PMSF/ gátolható-e?

A kísérletet 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH=7,5 pufferben 303 K-en végeztük el. Mivel a PMSF acetonitriles oldatát használtuk, a kontroll kísérletekben az enzimhez PMSF nélküli, azonos mennyiségű acetonitrilt adtunk. A fehérje-koncentráció az egyes kísérletsorozatokban $1,17 \times 10^{-6}$, illetve $1,17 \times 10^{-5}$ M, a PMSF koncentrációja 10^{-5} - 10^{-3} M volt. 10 perces inkubálás után visszamértük a minták maradék aktivitását. A mérési eredményeket az 1. táblázat foglalja össze.

I. táblázat

Fenil-metil-szulfonil-fluorid hatása a sertésvese aminoaciláz aktivitására

Enzimkoncentráció M x 10^5	P M S F koncentráció M	Maradék aktivitás %
0,117	10^{-5}	84,2
	10^{-4}	90,3
	10^{-3}	91,6
1,17	10^{-4}	102,7
	10^{-3}	93,1

Az alkalmazott körülmények között az enzim aktivitása nem tért el lényegesen a kontrolltól, még 10, illetve 100-szoros feleslegben alkalmazott FMSF koncentráció jelenlétében sem. Összehasonlításként megemlítjük, hogy a kimotripszinnek FMSF-fel M/M arányban való inaktiválódásának sebességi állandója $k=14,9 \text{ Mxsec}^{-1}$ 298 K-en, pH=7,0-nél /Fahrney és Gold 1969/.

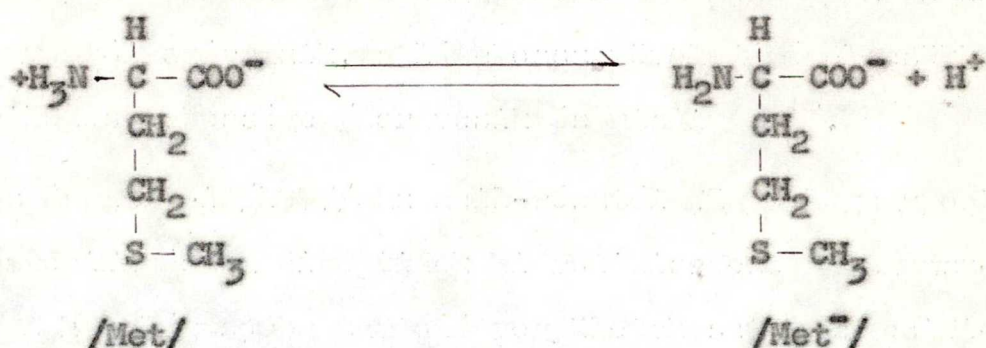
Ezen eredmények alapján arra következtetünk, hogy az aminoaciláz aktív centruma nem tartalmaz szeril oldalláncot, s így a közvetlen analógia az aminoaciláz és a főbb endopeptidázok /kimotripszin, tripszin/ hatásmechanizmusa között nagy valószínűséggel kizárható.

3/2. K_M , $v_{\max}$ pH-függése

Az aminoaciláz enzimológiai vizsgálatához szükség volt az aktivitás lugosabb pH tartományban történő meghatározására. Mivel a magas OH^- ion koncentráció erősen befolyásolja mind a ninhidrinnel, mind a TNBS-sel történő aktivitásmérést, ezért szükségesnek látszott egy olyan módszer kidolgozása, amely alkalmas a lugosabb pH tartományban mért enzimaktivitás meghatározására.

Az enzim által katalizált reakció során egy savas /N-acetil-L-metionin szubsztrát esetében ecetsav/ és egy bázisos /metionin/ vegyület képződik. Ez alapul szolgálhat egy titrimetriás mérési módszer kidolgozásához. Megfelelő pH értékeknél - ahol a keletkező komponensek egyike csak részlegesen van protonált állapotban - az acilamid kötés hidrolizise pH-stat készülékben folyamatosan követhető.

Ezen az elven alapuló mérési módszert a lúgos pH tartományban dolgoztuk ki, ahol a metionin aminos csoportja már nincs teljesen protonált állapotban. A metionin disszociációja a következő egyenlettel írható le:



A reakció disszociációs állandója:

$$K = \frac{[\text{Met}^-] [\text{H}^+]}{[\text{Met}]}$$

Az aktuális c metionin koncentráció:

$$c = [\text{Met}] + [\text{Met}^-]$$

melyből a nem disszociált metionin koncentrációját kifejezve és a disszociációs egyenletbe helyettesítve egyszerűsítés után kifejezhetjük a disszociált metionin koncentrációját:

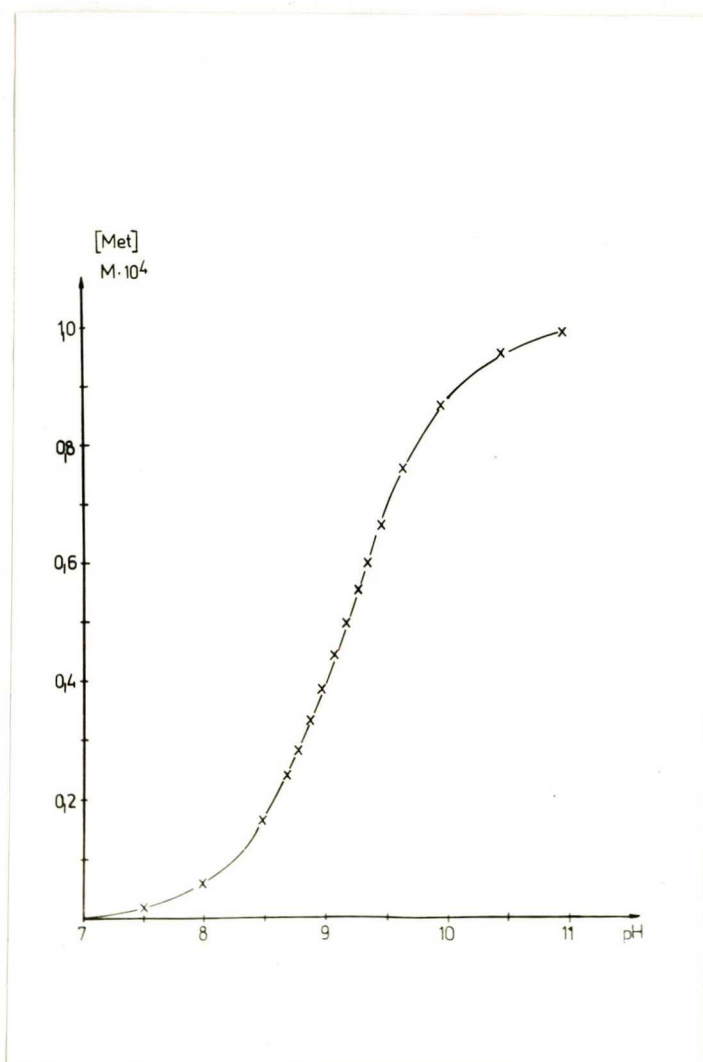
$$[\text{Met}^-] = \frac{K \times c}{[\text{H}^+] + K}$$

melyet kiszámíthatunk egy adott metionin koncentrációnál / $c=0,001 \text{ M}$ / különböző pH értékeken, ha ismerjük a disszociációs állandó értékét / $\text{pK}=9,21$ /. /Edsall és Wyman 1958/.

Ezen értékek ismeretében kiszámítottuk a metionin elméleti disszociációs görbét /8. ábra/, melyből megállapítható, hogy a pH-stat módszer előnyösen alkalmazható 8-9,5 pH tartományban. A semleges körüli pH értékeknél a várható lugfogyás túlságosan kicsi lenne, ha az enzim specifikus aktivitása nem elég nagy.

Méréseinket ABU 13, TT2 /Radiométer Copenhaga/ automata titrátoron végeztük. 2,5 ml 0,015 M N-acetil-L-metioninhoz 0,1 ml 2 mg/ml-es enzimoldatot adtunk és a hidrolízis során felszabaduló metionint 0,01 N faktorozott NaOH-dal titráltuk. A lugfogyásból az elméleti disszociációs görbe segítségével meghatároztuk az 1 perc alatt elbontott szubsztrát mennyiségét, és kiszámítottuk az adott pH-hoz tartozó enzimaktivitásokat.





8. ábra

A metionin elméleti disszociációs görbéje

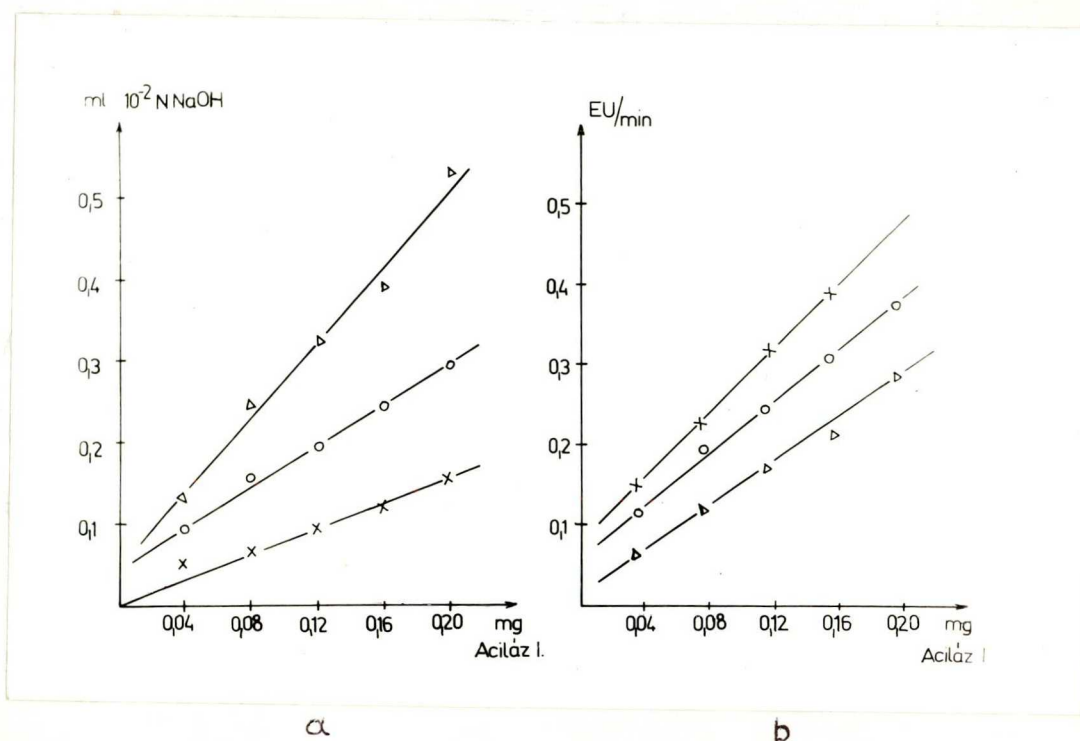
$$[Met^-] = \frac{K \cdot c}{[H^+] + K} \quad \text{összefüggés alapján számítva.}$$

A 9/a. ábra tartalmaz egy kísérletsorozatot, melyben három különböző pH értéken meghatároztuk az 5 perc alatt fogyó lug mennyiségét az aktivitási elegyhez adott koncentrációjának függvényében. A kísérletileg meghatározott értékek jó közelítéssel egy-egy egyenesre esnek. A lugfogyás alapján számított aktivitásokat a 9/b. ábrán tüntettük fel.

Kísérleteink alapján megállapíthatjuk, hogy a pH-stat módszeren alapuló aktivitási mérési módszer alkalmas 8,0 és 9,5 pH tartományban az aminoaciláz aktivitásának meghatározására. A mérések könnyen és gyorsan kivitelezhetők. Igen nagy előnye a módszernek, hogy az immobilizált enzim aktivitásának mérésére is alkalmas, mivel a kötött enzim által hidrolizált szubsztrát mennyiségét folyamatosan határozhatjuk meg a gél eltávolítása nélkül.

Az aminoaciláz által katalizált reakció kinetikai konstansainak pH-függéséből arra kerestünk felvilágosítást, hogy az enzim mely csoportjainak ionizációja szükséges a katalitikus aktivitáshoz, azaz mely aminosav oldallánc, illetve oldalláncok vesznek részt a szubsztrát megkötésében és átalakításában.

A Michaelis konstans $/K_M/$ és a maximális sebesség $/v_{max}/$ pH-függését két szubsztrát, az N-acetil-L-metionin és az N-acetil-L-alanin esetében határoztuk meg.



9. ábra

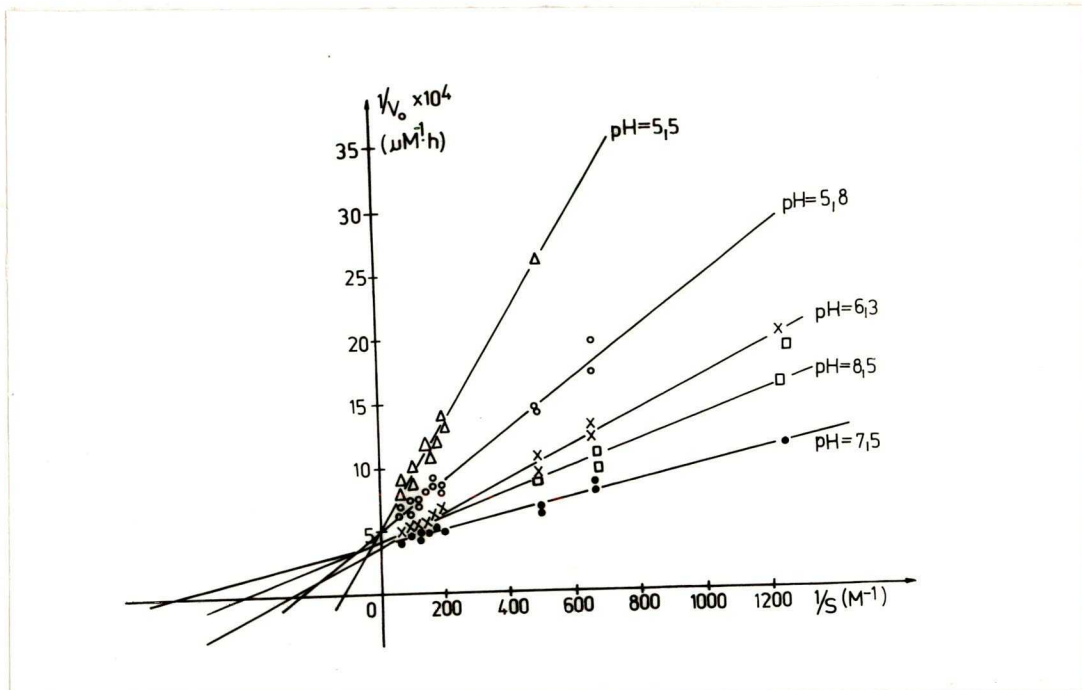
/a. Az öt perc alatt fogyott lug mennyisége az aminos-
aciláz koncentráció függvényében

/b. A lugfogyás alapján számított enzimaktivitások az
enzim koncentrációjának függvényében

0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pufferben a szubsztrát koncentrációját N-acetil-L-metionin esetében $1,5 \times 10^{-2}$ - 8×10^{-4} M, illetve N-acetil-L-alanin esetében $6,2 \times 10^{-2}$ - 9×10^{-3} M között változtattuk. A reakcióelegy pH-ját 5,3 - 9,5-ig különböző értékekre állítottuk. Az aminoaciláz aktivitását, vagyis a kezdeti sebességeket $/v_0/$ 303 K-en követtük a reakció során szabaddá váló aminócsoportok koncentrációjának ninhidrinnel, illetve TNBS-sel történő meghatározásával.

Lineweaver-Burk féle ábrázolásban a kezdeti sebességek reciprokát ábrázoltuk a szubsztrát koncentráció reciprokának függvényében, és a tengelymetszetekből meghatároztuk a K_M és $v_{\max}$ értékeit. Egy tipikus kísérleti sorozatot mutat be a 10. ábra.

Kontroll kísérletekkel ellenőriztük, hogy az aktivitás mérésakor a 15 perces reakcióidő alatt pH-inaktiválódás nem következett be sem a lúgos, sem a savas pH tartományban.



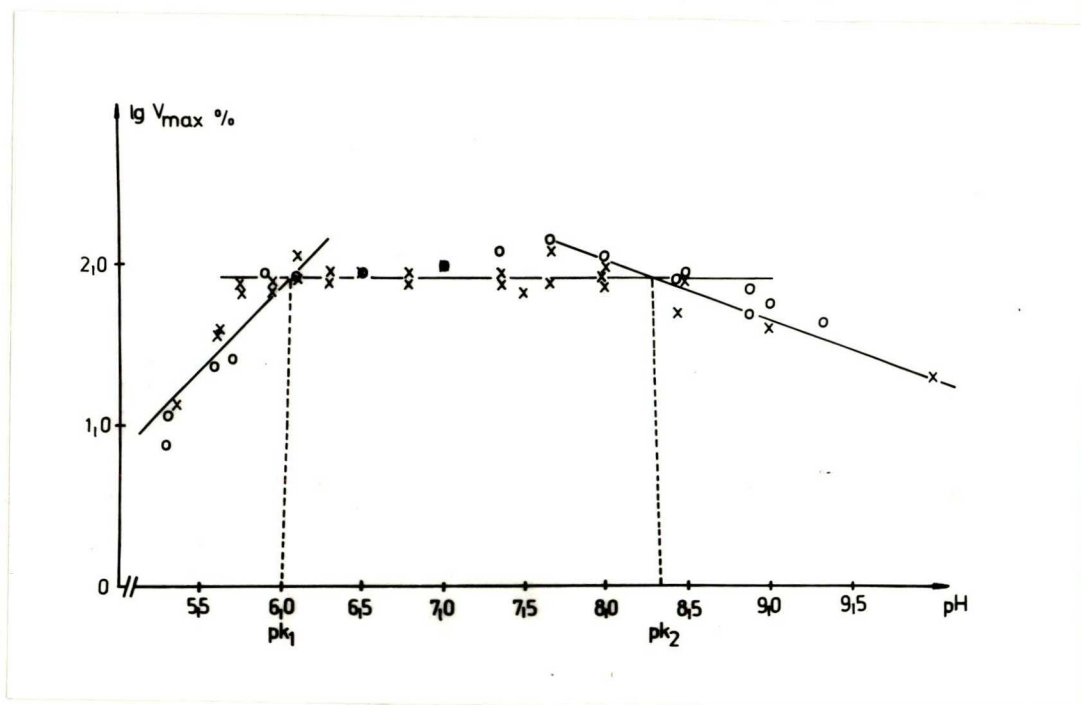
10. ábra

A Lineweaver-Burk féle grafikus ábrázolás

A kezdeti sebességek reciproka a szubsztrátkoncentráció reciprokának függvényében különböző pH értékeken.

A maximális sebességek logaritmusát a pH-függvényében ábrázolva felvilágosítást nyerhetünk a szubsztrát átalakításában résztvevő aminosav oldalláncok disszociációs állandójára. Az optimális pH=7,0 értéken számított maximális sebességet 100 %-nak véve, a $v_{\max}$ százalék logaritmusait ábrázoltuk a pH-függvényében. Mint a 11. ábrán látható, két törésponttal jellemezhető görbét kaptunk. pH=6,0 és 8,0 között az értékek csak jelentéktelen változást mutatnak, a pontok az abszcisszával párhuzamos egyenesre esnek. pH=6,0 alatt tapasztaltunk jelentős csökkenést. pH=5,3 és 6,0 között értékek egy közel 45° -os $/\text{tg}\alpha = 1,02/$ meredekségű egyenesre esnek. A két egyenes metszéspontjából meghatározható érték $\text{pK}_1 = 6,0$ körülnek adódott. A katalitikus centrumban egy aminosav oldallánc protonált állapotában az enzim nem aktiv, deprotonált állapotában aktiv. A pK érték alapján ez feltehetően egy hisztidin. Ez érthetővé teszi Kördel és Schneider /1978/ fotooxidációs kísérleteiben az enzim inaktiválódását.

pH=8,0 és 9,5 között a $\log v_{\max}$ egy $\text{tg}\alpha = 0,3$ meredekségű egyenesre esnek, tehát ez a szakasz nem követi a Michaelis pH függést. Így nem lehet egyértelműen cisztein vagy amino csoport jelenlétére következtetni a $\text{pK}_2 = 8,3$ érték alapján. Az enzim aktiv centrumában a cisztein mint proton donor szerepelhetne a szubsztrát amid kötésének felhasadásakor. Mivel a pH = 8,0 és 9,5 között meghúzható egyenes nem zár be 45° -os szöget az abszcisszával, feltehető, hogy bizonyos funkciós csoportok denaturációja csökkent az enzim aktivitását.



11. ábra

A maximális sebesség logaritmusa a pH függvényében

x--x: N-acetil-L-metionin szubsztrát

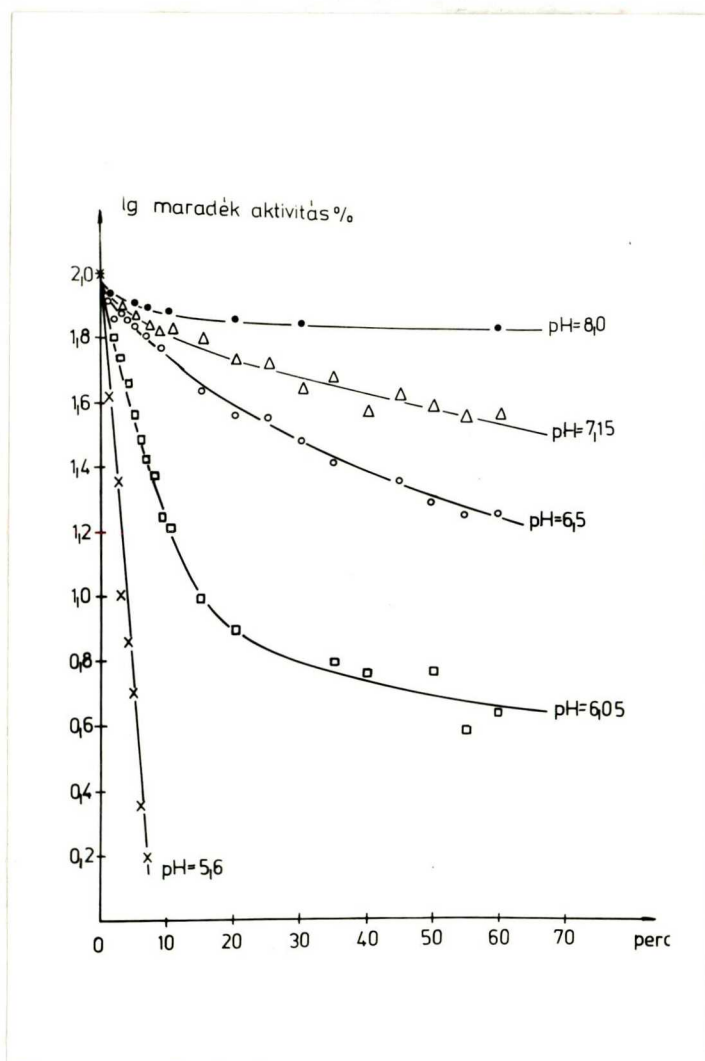
o--o : N-acetil-L-alanin szubsztráttal meghatározott értékek

A Michaelis állandó a pH-függvényében nem mutatott jellegzetes változást. A pK_s a pH-függvényében nem volt felbontható 0 és 1 meredekségű egyenesre, melyből következtetést lehetett volna levonni az enzimszubsztrát komplex kialakulásában szerepet játszó csoportok természetére.

3/3. EDTA-gátlás pH-függése

Az enzim a kétértékű fémionokkal kelátot képező vegyületekkel, mint pl. EDTA-val inaktiválható, mivel az aktiv centrumában alegységeként egy Zn^{2+} iont tartalmaz. Annak eldöntésére, hogy a Zn koordinációs kötésében mely aminosav oldalláncok vesznek részt, megvizsgáltuk az enzimnek EDTA-val történő gátlásának pH-függését.

Adott EDTA /0,1 M/ és enzimkoncentráció $/5,8 \times 10^{-5} M/$ mellett különböző pH értékeken vizsgáltuk meg a gátlás kinetikáját, 0,1 M Na_2HPO_4/KH_2PO_4 pufferben. Az enzimnek EDTA-val történő inaktiválását 310 K-en végeztük, a különböző időpontokhoz tartozó maradék aktivitásokat 303 K-en határoztuk meg. A sebességi állandók meghatározásához ábrázoltuk a százalékos maradék aktivitás logaritmusát az idő függvényében. Egy tipikus kísérleti sorozatot mutat be a 12. ábra. Meg kell jegyeznünk, hogy az ordináta metszetek nem felelnek meg 100 %-nak /80-85 %/. Ez a "Burst" valószínűleg az EDTA szubsztrát-analóg szerkezetére vezethető vissza.



12. ábra

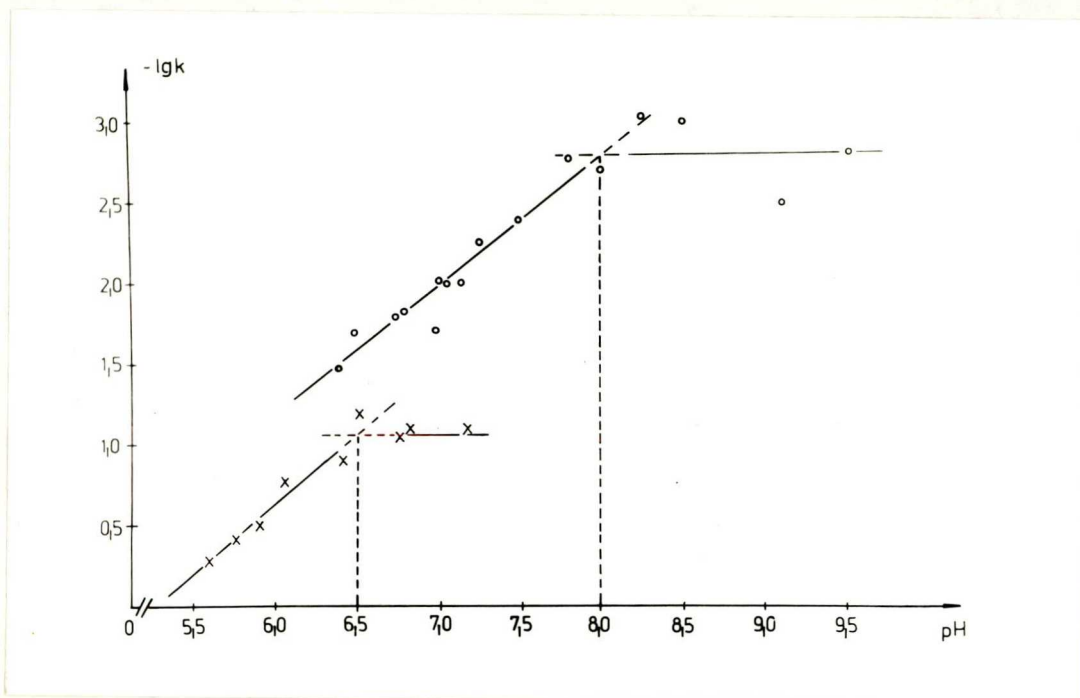
Az aminoaciláz EDTA-val történő gátlásának pH-függése

A maradékaktivitás %-a az idő függvényében, különböző pH-értékeken.

A féllogaritmikus ábrázolás alapján az inaktiválódás nem egy egyszerű elsőrendű kinetika szerint játszódik le, hanem két elsőrendű, párhuzamos reakcióról van szó. A kapott görbe második, egyenessel közelíthető szakaszát extrapoláljuk a $t = 0$ időpontra. Az extrapolált egyenes pontjait kivontuk a mérési pontokból, és így féllogaritmusos ábrázolásban újabb egyenest kaptunk. A két utóbbi egyenes iránytangenséből meghatározható a lassu, illetve a gyors folyamat sebességi állandója.

A meghatározott sebességi állandók logaritmusait ábrázoltuk a pH-függvényében /13. ábra/. Az első, gyors lépés sebességi állandóinak k_1 egy nagyságrenddel nagyobb, mint k_2 / pH-függéséből meghatározott pK_1 érték 6,5 körülnek adódott. Ez egy hisztidin-Zn koordinációs kötés pK értékének felel meg. /Irodalmi érték $pK = 6,6$ /

A második, lassu lépés sebességi állandóinak pH-függéseiből egy 8,0 körüli pK érték határozható meg, amelyből esetleg egy cisztein disszociációs állandójára lehet következtetni.



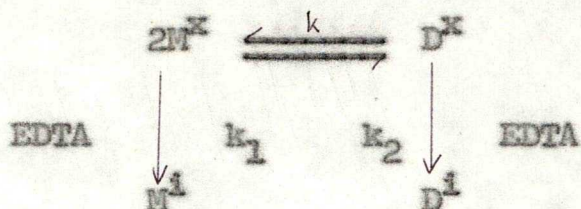
13. ábra

Az EDTA-gátlás sebességi állandóinak pH-függése

x--x az első gyors lépés sebességi állandóinak
lg-a $/k_1/$

o--o a második, lassu lépés sebességi állandóinak
 $/k_2/$ logaritmusai.

A mérések alapján a következő mechanizmust ítételezzük fel az enzimnek EDTA-val történő inaktiválására:



ahol:

M^x aktív monomer

D^x aktív dimer

M^i inaktív monomer

D^i inaktív dimer

Feltételezzük, hogy $k_1 \gg k$, illetve $k_2 > k$

Hipotézisünk szerint a k_1 sebességi állandóval jellemzett gyors lépés a disszociációs egyensúly által megszabott koncentrációban jelen lévő monomernek EDTA-val történő inaktiválódása. Ezzel párhuzamosan játszódik le a dimer inaktiválódása /kb. tízszer lassabban/.

Az EDTA gátlás pH-függésből meghatározott disszociációs érték alapján feltételezzük, hogy az enzim aktív centrumában a cink iont hisztidin koordinálja /pK=8,0/.

4./ Következtetések a katalizált reakció kémiai mechanizmusára. Az aminoaciláz és a karboxipeptidáz A közötti rokonság kimutatása

Az aktív centrum felderítésére végzett vizsgálataink, valamint az irodalmi adatok alapján szoros hasonlóság tekinthető fel az aminoaciláz és a karboxipeptidáz A aktív

centruma és az általuk katalizált reakció kémiai mechanizmusa között.

Feltételezésünket alátámasztó kísérleti eredmények a következők:

1./ Ötvös és munkatársai /1971/ feltételezték, hogy az aminoaciláz által katalizált acilaminósav hidrolízis a tripszinhez és a pepszinhez hasonlóan egy acilenzim intermedieren keresztül halad. Ez egy aktivált OH- vagy SH-csoport jelenlétét tételezi fel az aktiv centrumban. Mivel vizsgálataink szerint az aminóaciláz sem FMSF-dal, sem pedig alkilező szerekkel /monojódacetát, monojódacetamid/ nem gátolható /Szajáni 1980/, ezen eredmények alapján megállapítható, hogy az enzim aktiv centruma aktivált OH-, illetve SH-csoportot nem tartalmaz. Így nagy valószínűséggel kizárhatjuk a közvetlen analógiát az aminóaciláz és a főbb endopeptidázok /tripszin, kinoisin, papain, stb./ hatásmechanizmusa között.

2./ Az aminoaciláz alegységeként egy Zn^{2+} iont tartalmaz, melyet Kördei és Schneider /1976/ atomabszorpció mérésével igazoltak. Méréseink szerint az enzim EDTA-val inaktiválható, tehát a Zn^{2+} ionoknak kulcsszerepe van az enzim katalitikus aktivitásában. Ezért fölmerült a kérdés, hogy az aminoaciláz nem az endopeptidázokkal, hanem a cinktartalmú exopeptidázokkal, a karboxipeptidázokkal hasonlítható össze.

Ezért megvizsgáltuk, hogy az aminoaciláz aktiv centrumában mely aminosav oldalláncoknak van esszenciális szerepe. A kinetikai konstansok pH-függéséből egy hisztidin és egy cisztein / $pK_1=6,0$, $pK_2=8,3$ / aminosav oldallánc jelenlétére következtettünk, mely eredmények jó egyezésben vannak Kördel és Schneider /1976/ fotooxidációs, valamint DEP-pel végzett hisztidinmódosítási eredményeivel.

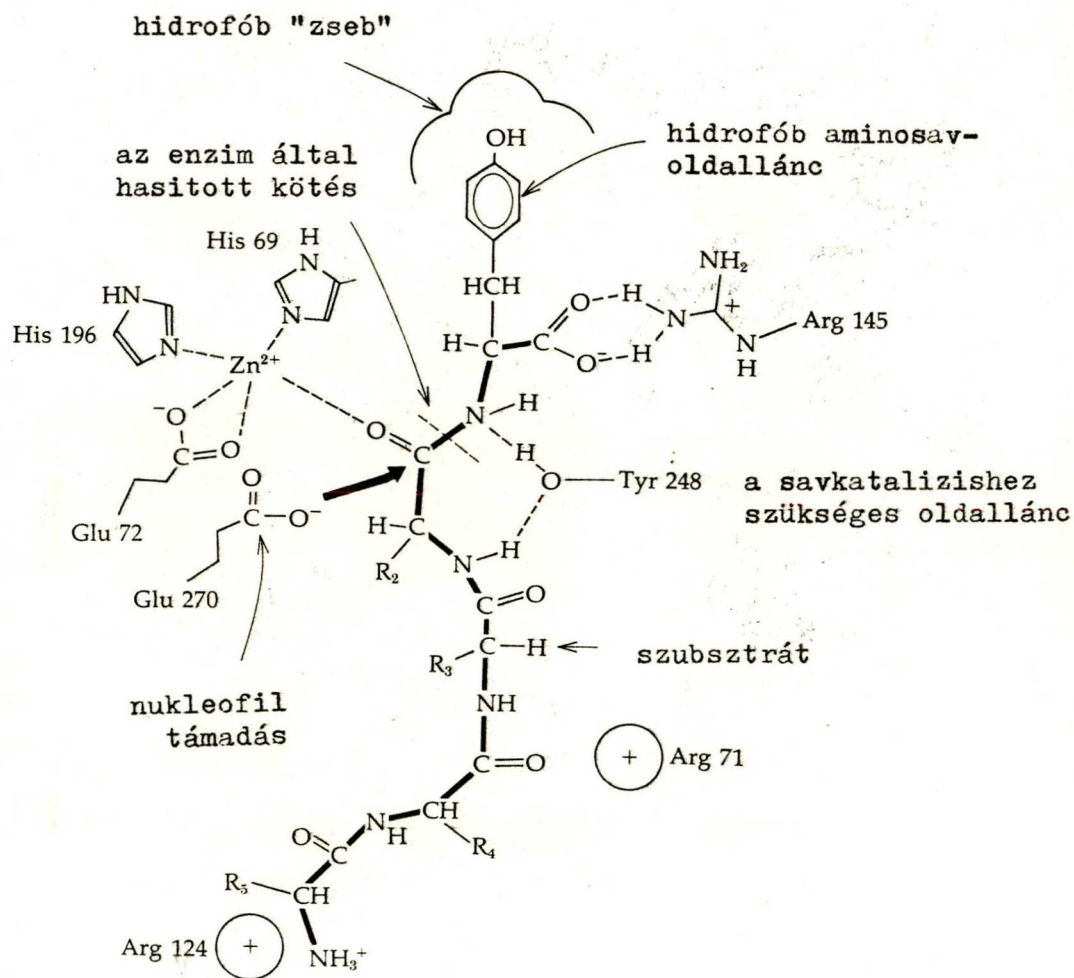
Az enzim EDTA gátlásának pH-függéséből választ próbáltunk keresni arra, hogy az aktiv centrumban lévő cinkiont mely aminosav koordinálja / $pK_1=6,5$, $pK_2=8,0$ /, ez feltehetően egy hisztidin és esetleg cisztein. Ez a koordinációs kötés a fémion és a hisztidin aminosav oldallánc között a karboxipeptidász-A-val hasonló, ahol szintén két hisztidin /169, 69/ koordinálja a cinkiont.

3./ Megvizsgáltuk az aminoaciláz lehetséges katalitikus mechanizmusa és a karboxipeptidász-A katalitikus mechanizmusa közötti hasonlóságot.

A katalitikus reakció első lépése a szubsztrát megkötése. Mint a 14. ábrán látható, a karboxipeptidász-A-ban több pontos kötést tételeznek fel/Quiocho, Lipscomb 1971; Lipscomb 1971-1972./.

a./ az enzim aktiv centrumának hidrofób "zsebe".

Moravcsik és munkatársai /1971/, valamint Kördel és Schneider /1976/ szubsztrát-specifitás vizsgálatai során kimutatták, hogy az aminoaciláz két apoláros zsebbel rendelkezik, ami egyrészt képes megkötni az acilező karbonsav szénláncát, másrészt az acilezett aminosav R-gyökét.



14. ábra

A karboxipeptidáz-A aktív centrumának szerkezete egy peptid szubsztrát jelenlétében /Libscomb, 1971./

b./ A karboxipeptidáz-A szubsztrátjának megkötésében részt vesz a 145-ös Arginin guanidinó csoportja, sókötést képezve a peptid C-terminális karboxil csoportjával.

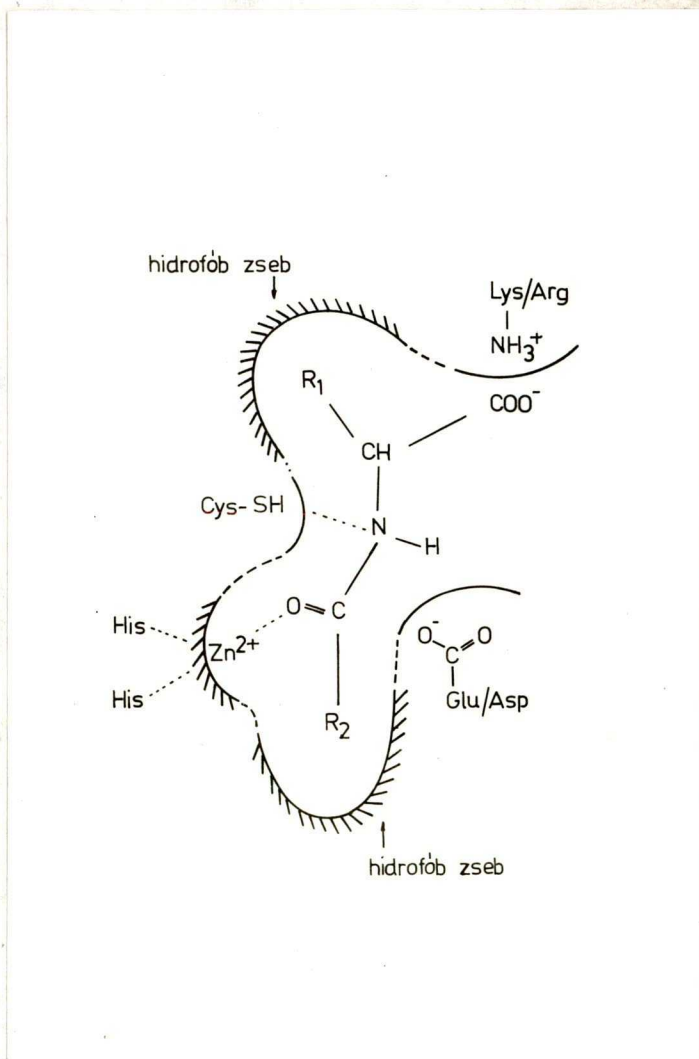
Az aminoszilárd gátolható TNBS-sel /Szajáni 1979/. A blokkolt csoportok között szerepelhet az a primer aminocsoport /Lizin vagy Arginin/, ami részt vehet a szubsztrát karboxil csoportjának megkötésében a karboxipeptidáz-A-hoz hasonlóan.

c./ A karboxipeptidáz-A-ban további másodlagos kötések lehetnek, a 248 Tyr, a 270 Glu és a hisztidinek által koordinatív kötött Zn^{2+} és a szubsztrát között.

Az aminoszilárdnál felmerülhet a kérdés, hogy az esszenciális SH-csoport /ez lehet cisztein/ hasonló szerepet tölt be, mint a 248-as Tyr, a karboxipeptidáz-A-ban, vagyis az amid-kötés felhasadásakor mint protondonor szerepelhet.

A fémion lehetséges szerepére feltételezzük, a karboxipeptidáz-A által katalizált dipeptid hidrolízis analógiájára, hogy a szubsztrát karbonil csoportjának polarizálása által megnöveli annak érzékenységét a nukleofil támadással szemben. A feltételezhető nukleofil reakciópartner az enzim egy aminosav oldallánc karboxilát anionja /Glu vagy Asp/, de erre vonatkozóan még nincsenek kísérleti bizonyítékaink.

Eredményeink, az irodalmi adatok és az összehasonlító elemzés alapján megállapíthatjuk, hogy szoros rokonság áll fenn az aminoszilárd és a karboxipeptidáz-A aktív centruma és kémiai hatásmechanizmusa között. A 15. ábrán bemutatott hipotetikus modellben foglaltuk össze az aminoszilárd aktív centrumát.



15. ábra

A sorting vesicle aminocyclase active center
hypothetical model



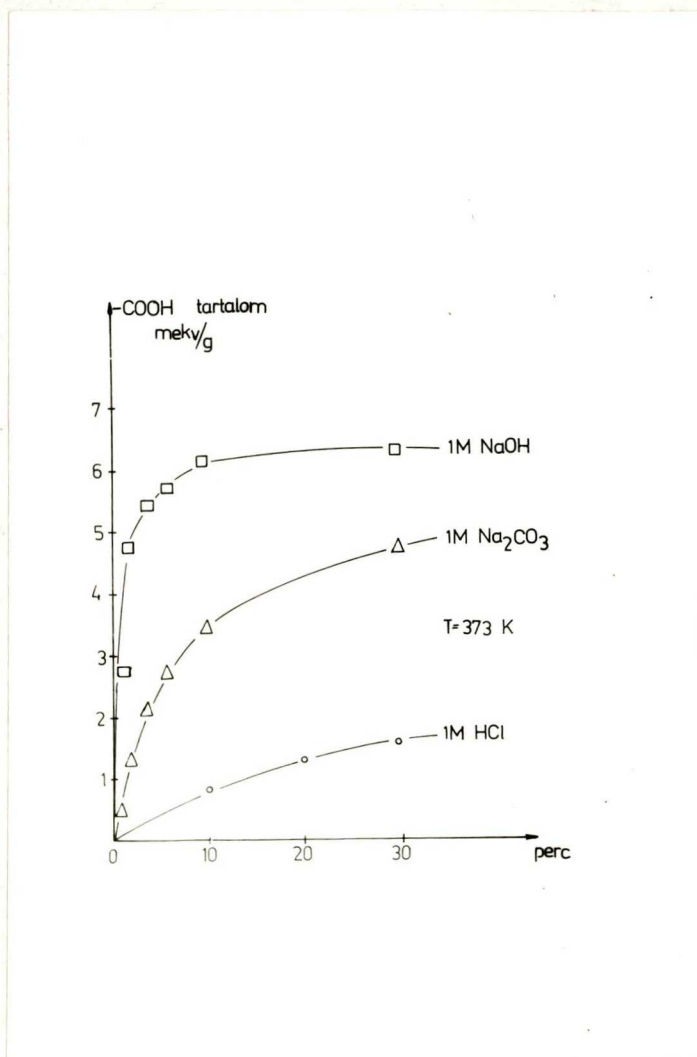
5./ Az enzim ipari alkalmazása, az immobilizálás feltételeinek kidolgozása

5/1. Kinetikai vizsgálatok Akrilex-P gélek Akrilex-C készítményekké alakítására

A Reanal Finomvegyszergyár által előállított Akrilex-C poliakrilamid gélek jó mátrix anyagok az enzimek kovalens kötéssel történő kapcsolására, azonban kvantitatív adatokkal nem rendelkezünk arra vonatkozóan, hogy a gél fehérjekötő kapacitása és a kötött enzimek fizikai-kémiai tulajdonságai hogyan függnék a gélben kialakított karboxilcsoportok mennyiségétől.

Ezért tanulmányoztuk az Akrilex-P, illetve a Reakril-P gélekben levő savamid csoportok részleges hidrolízisének időbeni lefolyását különböző körülmények között. Célunk az volt, hogy a kísérleti eredmények alapján standard körülményeket definiáljunk, meghatározott karboxiltartalmu és enzinkötő tulajdonságú gélek előállítására.

A géleket 1 M NaCl 1 M Na_2CO_3 , illetve 1 N HCl oldatban szuszpendálva, különböző hőmérsékleteken inkubáltuk. A savamid csoportok részleges hidrolízise révén előálló Akrilex-C gélek karboxil tartalmát 0,1 N NaOH-dal való titrálás segítségével határoztuk meg. Néhány tipikus kísérleti eredményt mutat be a 16. ábra.



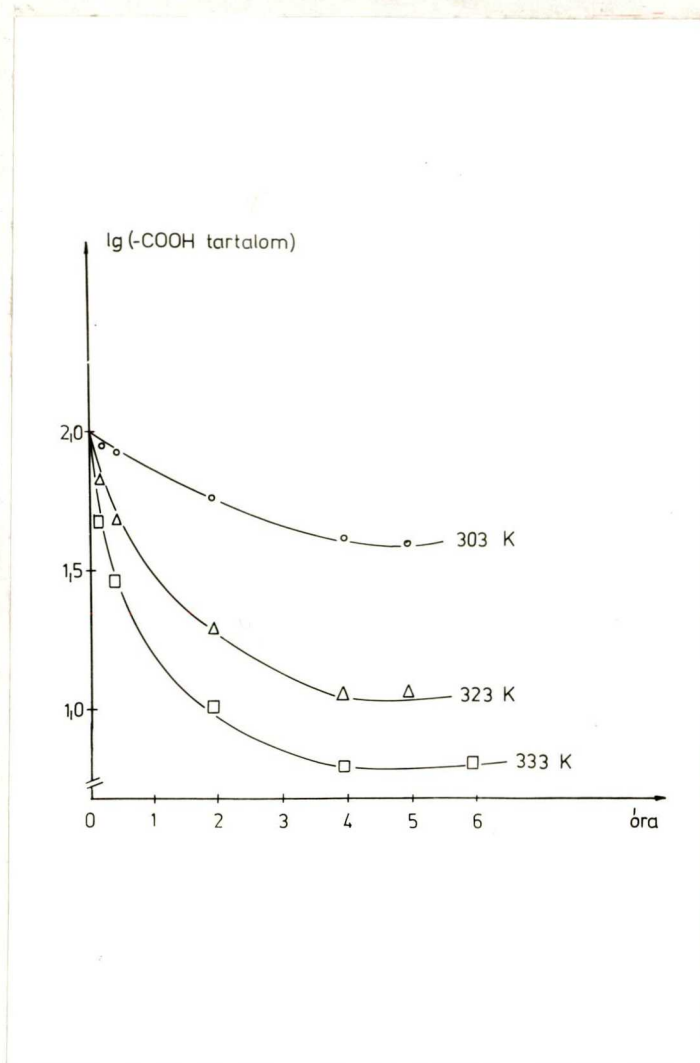
16. ábra

A karboxilcsoportok kialakulásának kinetikája az Akrilex P-30 gél 1 M HCl /o--o/, 1 M NaCO₃/Δ-Δ/ és 1 M NaOH /□-□/ oldatban való kezelésekor

A 6 óra alatt maximálisan kialakult csoportok számát alapul véve és a "maradék csoportok" mennyiségének logaritmusát az idő függvényében ábrázolva nem kaptunk lineáris összefüggést. /17. ábra/

Ez arra utal, hogy a hidrolízis folyamat nem követ "látványosan elsőrendű kinetikát", bár a lug, illetve a sav minden esetben nagy feleslegben van jelen. A lugos hidrolízis esetén a NaOH karbonátosodása nem eredményezheti a reakciók viszonylagos lelassulását az idő előrehaladtával. Kontroll kísérletünk szerint ezt a lassubodást a gél duzzadásának időben elnyújtott volta sem okozhatja. A jelenség oka valószínűleg az lehet, hogy a savamid csoportok hasítása a gél külső régiójában sokkal gyorsabb /és valóban elsőrendű kinetika szerint játszódik le/, mint a gél belső régiójában, ahol a lug vagy sav diffúziója lassabb, s így az utóbbi folyamat válik a teljes reakció sebességmeghatározó lépésévé.

Akrilex-P-60, P-100 és P-200 géleknek részleges hidrolízisét vizsgálva 1,0 N NaOH-ban, különböző hőmérsékleteken, a 17.ábrához hasonló lefutású görbéket kaptunk. Méréseink szerint a gél porozitása a folyamatot nem befolyásolja jelentős mértékben, csak az elérhető maximális "kapacitás" - $-\text{COOH}$ mekv/g/ értéke növekszik csekély mértékben a pórusméret növelésével. A mérési eredményeket a II. táblázat foglalja össze.



17. ábra

Akrilex P-30 hidrolízisének kinetikája 1 N NaOH oldatban
való kezelésekor

A maradék karboxil csoportok mennyiségének logaritmusa
az idő függvényében különböző hőmérsékleten.

II. táblázat

Különböző pórusméretű Akrilex gélek maximálisan elérhető "kapacitása" különböző hőmérsékleteken.

Akrilex	-COOH tartalom /mekv/g/			
	303 K	313 K	323 K	333 K
P-200	5,1	6,6	7,0	7,5
P-100	4,9	5,9	6,8	7,2
P-60	4,85	5,3	6,2	6,6

/0,1 M NaOH, 6 óra/

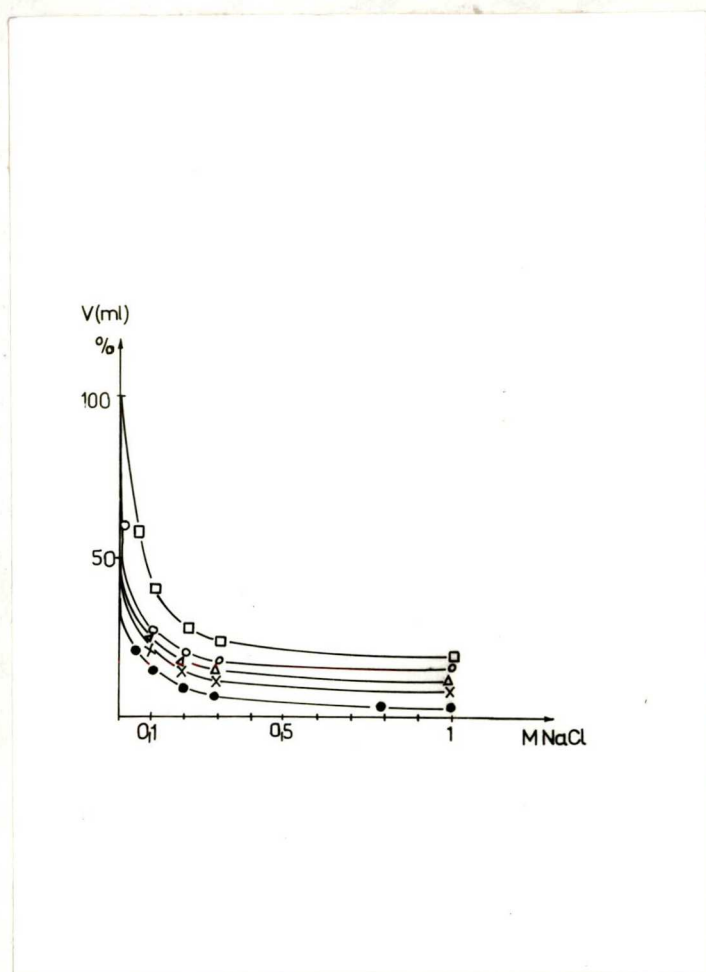
5/2. Különböző Akrilex C gélek duzzadásának vizsgálata

Feltételezzük, hogy a gélek enzimmötő képességét, valamint kötött enzim fizikai-kémiai tulajdonságát a gél -COOH tartalmán kívül jelentősen befolyásolja a gél duzzadása, pontosabban a duzzadás mértéke a reakcióelegyben az enzim kapcsolásakor és a kötött enzim tárolásakor.

A karboxilcsoportot tartalmazó kationcserélő poliakrilamid gélek duzzadásának mértéke nagymértékben függ az oldat ionkoncentrációjától és attól, hogy a készítmény H⁺, vagy Na⁺ formában van-e jelen. Minthogy a hidrogén forma csak savas oldatban létezik, melyben az enzimek általában nem aktívak és nem stabilisak, a duzzadási vizsgálatokat Na-formában levő /előzetesen NaOH-dal, majd deszt. vízzel mossott/ készítményekkel végeztük.



A megfelelő készítményeket deszt. vízben, illetve adott koncentrációjú NaCl oldatban szuszpenzáltuk és hagytuk ülepedni. Meghatározott időnként megmértük a leülepedett gél térfogatát. Méréseink szerint a gélek ülepedése 20-30 perc alatt gyakorlatilag befejeződik, még 0,1 M NaCl oldatban is. További állás során a leülepedett gél térfogata mérhető módon nem változik. A térfogatváltozás extrém módon függ a NaCl koncentrációtól. 1 M NaCl oldatban a leülepedett gél térfogata mérhető módon nem változik. A térfogatváltozás extrém módon függ a NaCl koncentrációtól. 1 M NaCl oldatban a leülepedett gél térfogata mintegy fele a 0,1 M NaCl oldatban mértnek, és 5-10 %-a a deszt. vízben mért gél térfogatnak. A különböző gélek duzzadásának összehasonlíthatósága céljából a deszt. vizes szuszpenzióból kiülepedett gél térfogatát 100 %-nak vettük és ehhez viszonyítottuk a térfogatváltozást. A 18. ábrán látható a különböző porozitású Akrilex P gélekből készített Akrilex C készítmények térfogatszázaléka a NaCl koncentráció függvényében. Általános összefüggésként megállapíthatjuk, hogy a kiindulási Akrilex P gél porozitása befolyásolja a képződött Akrilex C gél viselkedését: a nagyobb pórusú gélekből előállított Akrilex C preparátumok térfogata nagyobb és erősebben függ az oldat sókoncentrációjától, mint a kispórusú gélekből nyert preparátumoké.



18. ábra

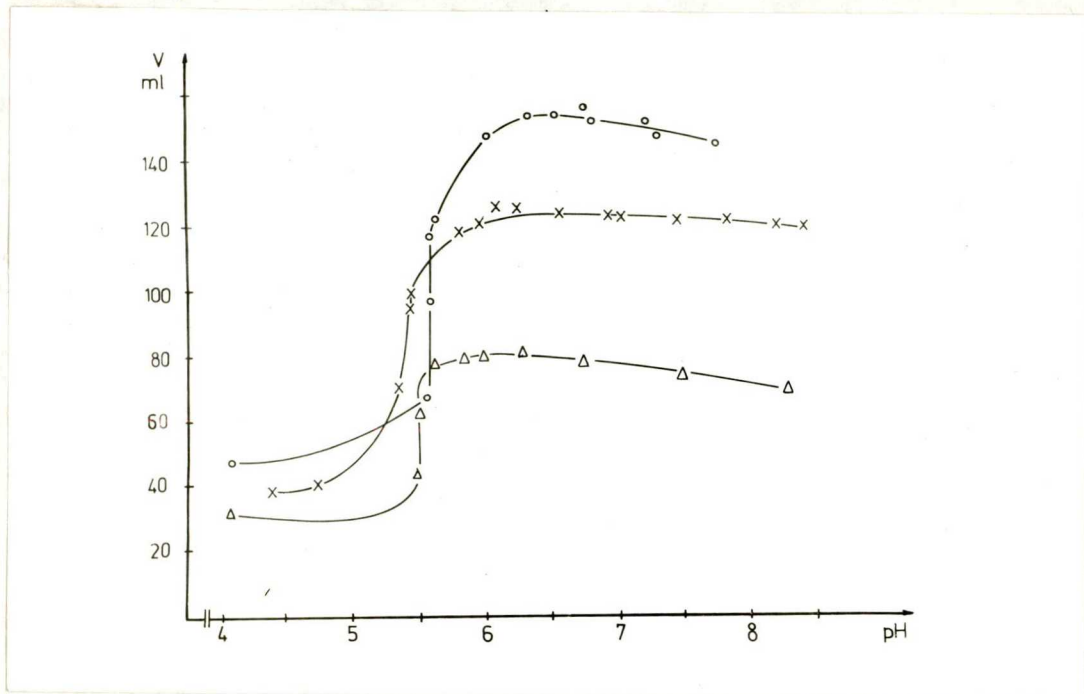
Különböző porozitású Akrilex C gélek térfogatának só-koncentráció függése a deszt. vízben mért térfogat

%-ában kifejezve

- o—o Akrilex C-30 /100-320 u/ 6,43 mekv/g
- " C-60 /50-100 u/ 7,53 mekv/g
- △—△ " C-60 /100-320 u/ 7,31 mekv/g
- x—x " C-100/100-320 u/ 5,61 mekv/g
- " C-200 /50-100 u/ 4,99 mekv/g

Megvizsgáltuk a gélek duzzadásának pH-függését. Várható ugyanis, hogy a gélek fehérjekötő képessége függ a duzzadási foktól, a fehérjék számára hozzáférhető belső térfogat nagyságától. A duzzadás pH-függését 0,05 M foszfát pufferben vizsgáltuk, különböző mennyiségű -COOH csoportot tartalmazó Akrilex C gélek esetében /19. ábra/.

Eredményeink szerint a gélek duzzadása ugrásszerűen növekszik pH 5 és 6 között, maximális értéket ér el pH 6 és 7 között, majd további lúgosítás hatására kevésbé ismét csökken a térfogata. A fehérjék Akrilex C gélekre történő immobilizálására tehát alkalmasnak tűnik a pH 6 alatti tartomány, míg a duzzadás szempontjából gyakorlatilag ekvivalens a pH 6 és 8 közötti bármely pH érték. A kapcsolat azonban nemcsak egyedül a duzzadás mértékének függvénye, mint ez az aminosav-amináz enzim immobilizálásának pH-függésére végzett kísérleteinkből is kitűnik.



19. ábra

Különböző kapacitású Akrilex C-60 gél duzzadásának
változása a pH függvényében

o—o	Akrilex C-60	/100-320 u/	4,1 mekv/g
x—x	"	/50-100 u/	3,9 mekv/g
Δ—Δ	"	/50-100 u/	2,2 mekv/g

5/3. Aminoaciláz kötése Akrilex C készítményekhez

Az általunk előállított, különböző kapacitású Akrilex-C gélekhez kötöttünk sertésvese aminoacilázt. 100 mg Akrilex C készítményhez 50 mg EDC-t, majd 50 mg enzimet adtunk /0,1 M pH=8,0 foszfátpufferben/ és 4 órán keresztül jeges vízfürdőn kevertettük. A nemkötődött fehérjét 0,1 M pH=7,0 foszfát pufferrel kimostuk. Megmértük a mosó folyadékot és az immobilizált enzim aktivitását. A mérési eredményeket a III. táblázat foglalja össze.

1 g szilárd hordozóra /a kiindulási Akrilex P-30-ra/ számolva több, mint 50.000 EU aminoacilázt tudtunk immobilizálni.

A kísérleti eredményekből megállapítható, hogy minél nagyobb a gél karboxil tartalma, annál jobb az immobilizálás "hatásfoka". A kötődő enzim mennyisége a reakcióelegyben lévő enzimnek csak 5-6 %-a, az enzim zöme aktív formában oldatban marad, visszanyerhető, egy kisebb része pedig inaktiválódik. Ezért szükséges tovább tanulmányozni, milyen tényezők befolyásolják az immobilizálás hatásfokát.

III. táblázat

Alkalmazott Akrilex C-30 gél COOH-csoport tartalma mekv/g	Összes nem kötött enzimaktivitás					A gélhez kötött enzimaktivitás		Összes visszamért enzimaktivitás
	1.mosó	2.mosó	3.mosó	EU	a kiind. aktivitás %-ában	EU	a kiind. aktivitás %-ában	A kiindulási aktivitás %-ában
6,12 ⁺	41.330	31.000	-	72.330	64,0	7.240	6,4	70,4
4,74 ⁺⁺⁺	20.660	16.500	5.170	42.360	37,5	5.600	4,95	42,4
4,48 ⁺	46.500	20.670	6.200	73.370	64,9	581	5,1	70,14
4,26 ⁺⁺	49.600	11.625	7.230	68.460	60,6	660	0,58	61,2
3,56 ⁺⁺	28.420	10.330	5.170	43.920	38,9	860	0,76	39,6
2,45 ⁺⁺	29.450	12.400	3.620	45.470	40,2	710	0,63	40,9
2,25 ⁺	46.500	10.330	-	56.830	50,3	2.550	0,26	50,6
0,82 ⁺⁺	31.410	6.820	5.170	43.400	38,4	102	0,09	38,5

+ / NaOH-dal

++ / HCl-val

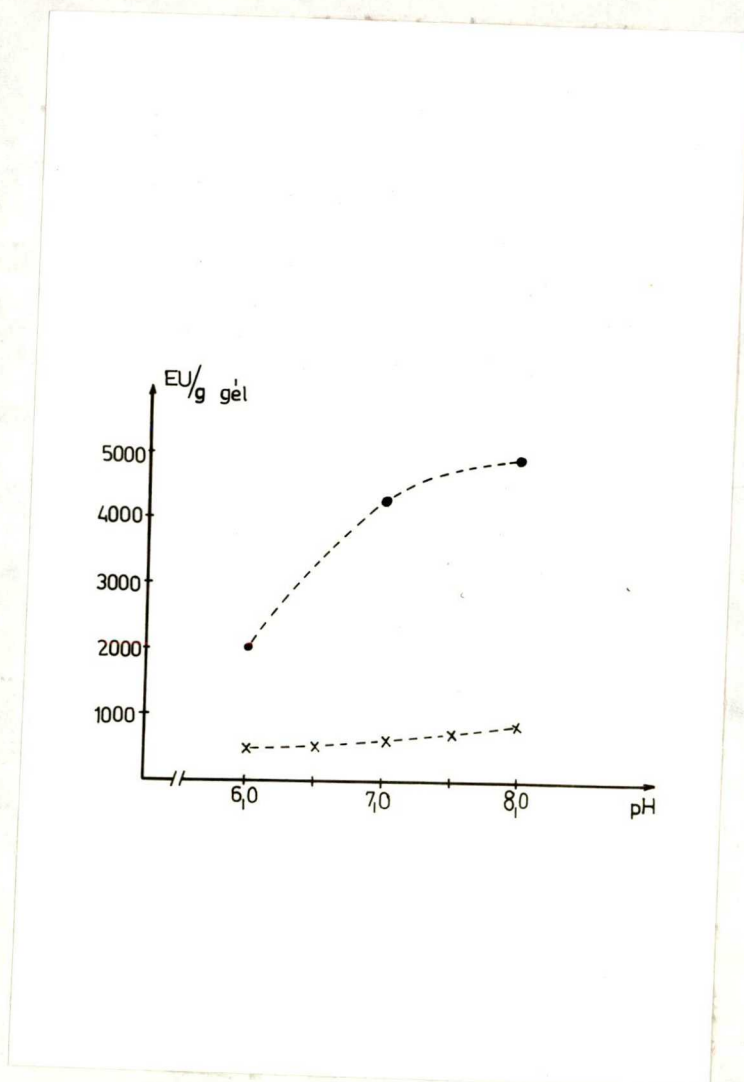
+++ / Na₂CO₃-tal készített gélek

5/4. Az immobilizálás feltételeinek vizsgálata

Megvizsgáltuk, hogyan függ az immobilizálás hatásfoka a hidrogénion koncentrációjától. Az aminoaciláz immobilizálását pH= 6 - 8 tartományban tanulmányoztuk. 50 mg Akrilex C-60-t /6,3 és 2,3 mekv/g kapacitású/ 25 mg MCD-vel aktiváltunk 0,1 M különböző pH-ju foszfát pufferben, majd ehhez a reakcióelegyhez adtuk hozzá a 25 mg enzimet.

A kötést 4 órán keresztül jeges vízfürdőn kevertetve végeztük. Mint a 20. ábrán látható, a nagyobb kapacitású gél esetében a pH=6 körül kevesebb a megkötődő aktiv enzim, mint semleges oldatban, pH 7 és 8 között a különbség csekély, bár a lugosabb reakcióelegyből a fehérje jobb hatásfokkal köthető. A görbe lefutása azzal értelmezhető, hogy a fehérje aminócsoportjai lugosabb oldatban kifejezettebben nukleofil természetűek a deprotonálódásuk fokozódása miatt, ezért az aktivált karboxil csoportokkal gyorsabban reagálnak.





20. ábra

Az aminoaciláz immobilizálásának pH függése

O—O	Akrilex C-60	/100-320 u/	6,3 mekv/g
X—X	"	/100-320 u/	2,3 mekv/g

Megmértük az aminoaciláz Akrilex C gélnek kapcsolódásának időfüggését. A fehérjemolekulák bekötődése néhány óra alatt végbemegy. Mint a 21. ábrán látható, a kapcsolódás 4 óra alatt eléri a maximális értéket.

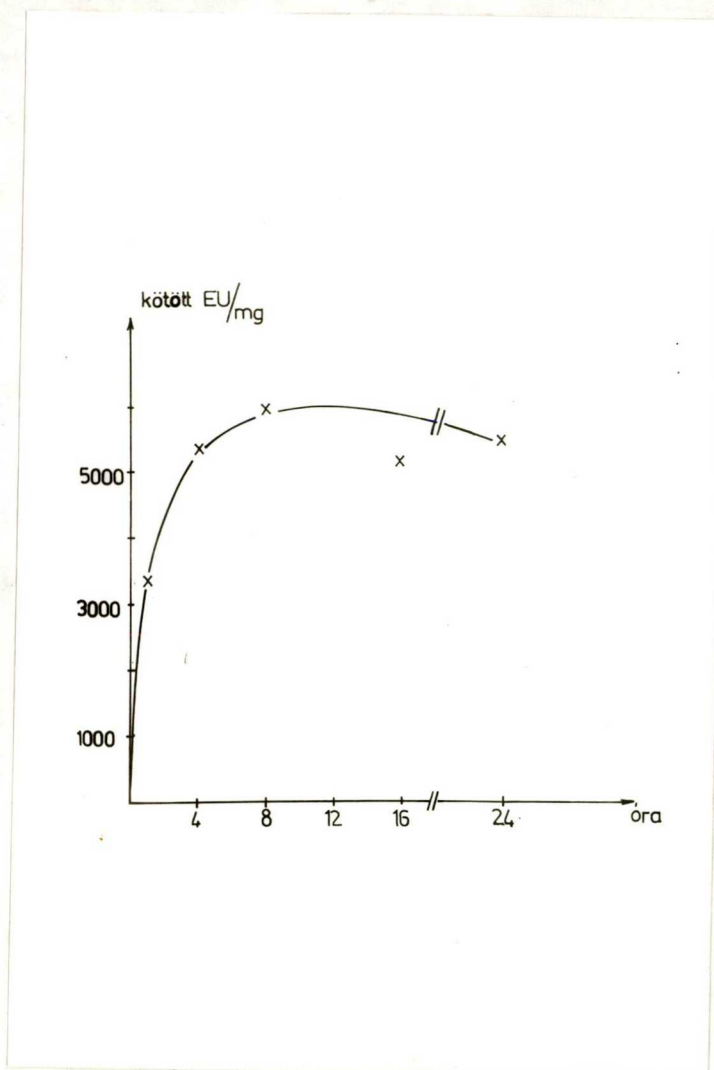
A reakcióelegy összetételét, gél: MCD: fehérje arányokat változtatva megvizsgáltuk, hogyan változik a gélhez kötődő aktív enzim mennyisége. A mérési eredményeket a IV. táblázat foglalja össze. 100 mg gélhez 25, 50, illetve 100 mg fehérje adásakor az immobilizált enzim mennyisége nő. Ugyancsak nő a bekötött enzim mennyisége, ha a reakcióelegyben a MCD arányát növeljük. Egyes kísérletekben az MCD mennyiségének 50-ről 100 mg-ra való növelése azonban már nem eredményezett jobb kapcsolást.

IV. táblázat

Az aminoaciláz MCD-vel aktivált Akrilex C-60 gélhez kapcsolására alkalmazott reakcióelegy össze-
tételének hatása a kötött enzim aktivitására

Aciláz /mg/	MCD /mg/		
	25	50	100
25	1.262 EU	1.469 EU	1.345 EU
50	2.193 EU	3.578 EU	4.466 EU
100	3.640 EU	5.026 EU	4.509 EU

/A kapcsolás 4^o-on történt, 16 órás reakció idővel,
100 mg Akrilex C-60 6,32 mekv/g./



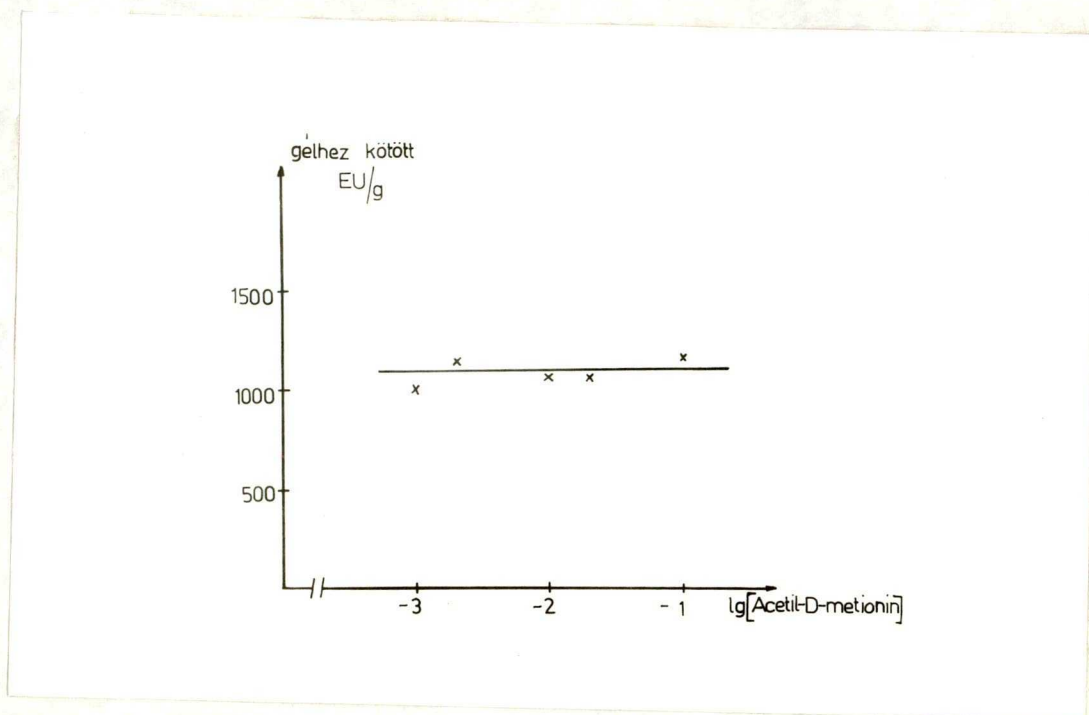
21. ábra

Az aminoaciláz Akrilex C gélhez kötésének
időfüggése

/50 mg Akrilex C-60, 25 mg aminoaciláz, 25 mg MCD, 277 K/

Az aminoaciláz enzimmel végzett kísérleteink során megállapítottuk, hogy az enzim az immobilizálás során részlegesen inaktiválódott. Ennek mértéke a körülményektől függően 30-60 % között változott. Feltételezésünk szerint az inaktiválódás oka az, hogy a karbodiimiddel aktivált karboxil csoport képes az enzim aktiv centrumában elhelyezkedő nukleofil csoportokkal reakcióba lépni, s bizonyos mértékben szubsztrát analógnak tekinthető. Feltételezésünket alátámasztja az a kísérlet, hogy az MCD-vel aktivált ecetsav képes az aminóaciláz enzimmel reagálni és aktivitását csökkenteni. Megjegyezzük, hogy az ily módon történő acilezés nemcsak az aktiv centrumon bekövetkező módosítás esetében eredményezhet aktivitás veszteséget, hanem másodlagos effektusok révén is. Érdemesnek látszott megvizsgálni, hogy az aktiv centrumnak inhibitorokkal történő blokkolása révén kivédhető-e az immobilizáláskor fellépő részleges inaktiválódás.

Az enzimet különböző koncentrációju acetil-D-metionin jelenlétében kapcsoltuk Akrilex C-60 gélhez /22. ábra/. Az eredmények azonban nem feleltek meg a várakozásnak, mert részleges inaktiválódás ekkor is bekövetkezett, s az aktivitásra számított bekötési hatások nem változott. Ennek oka leheteegyrészt az, hogy az acetil-D-metionin szubsztrát analóg szerkezetére ellenére viszonylag kis hatásfoku inhibitor, másrészt az, hogy az inaktiválódás oka lehet egy olyan aminosav oldallánc módosítása, amely nem az aktiv centrumban található.



22. ábra

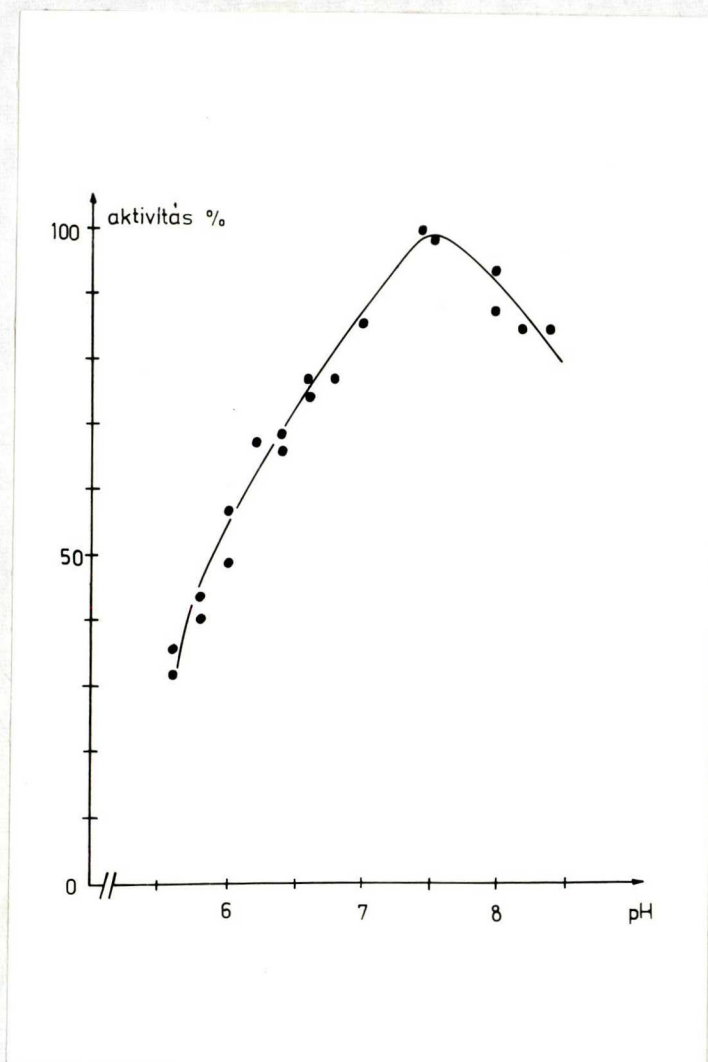
Akrilex C-60 gélhez kötött aminosziláz aktivitása
különböző koncentrációjú acetil-D-metionin jelen-
létében végzett kapcsolás esetén

5/5. Az immobilizált enzim jellemzése

Megvizsgáltuk az MCD-vel aktivált Akrilex C gélhez kötött aminoaciláz tulajdonságait /pH függés, hőmérsékletfüggés, szubsztrát koncentráció függés/ és összevetettük az oldott enzim paramétereivel.

Vizsgáltuk a pH hatását az immobilizált aminoaciláz által katalizált reakció sebességére. A reakcióelegy pH-ját 5,5-8,5-ig változtatva, 15 perces reakcióidő mellett mértük az immobilizált enzim aktivitását 298 K-en 0,1 M foszfát pufferben. A maximális értéket 100 %-nak véve ábrázoltuk az aktivitás százalékokat a pH-függvényében /23. ábra/. Az immobilizált enzim által katalizált reakció pH optimuma 7,5-nek adódott, amely fél pH egységgel a lugosabb tartomány felé tolódott a nativ enzim pH optimumához /pH=7,0/ viszonyítva.

Az immobilizált aminoaciláz által katalizált reakció hőmérsékletfüggését 0,1 M foszfát pufferben pH=7,5 értéken határoztuk meg. A reakcióelegy hőmérsékletét 293 és 353 K között változtattuk és mértük az enzim aktivitását /24. ábra/. 15 perces reakcióidőt választva, a hőmérsékletfüggés maximuma 343 K-nek adódott. Azonos körülmények között mérve a nativ enzim optimuma mintegy 5 K-vel alacsonyabb. 300 és 340 K között a nativ és az immobilizált enzim által katalizált reakció sebessége azonos mértékben növekszik, míg az elfülötti hőmérsékleteken a nativ enzim denaturációja nagyobb mértékű. 353 K-en az immobilizált enzimnek mintegy 70 %-a még aktiv, míg a nativnak csak 45 %-a /azonos, 15 perces reakcióidőre vonatkoztatva/.

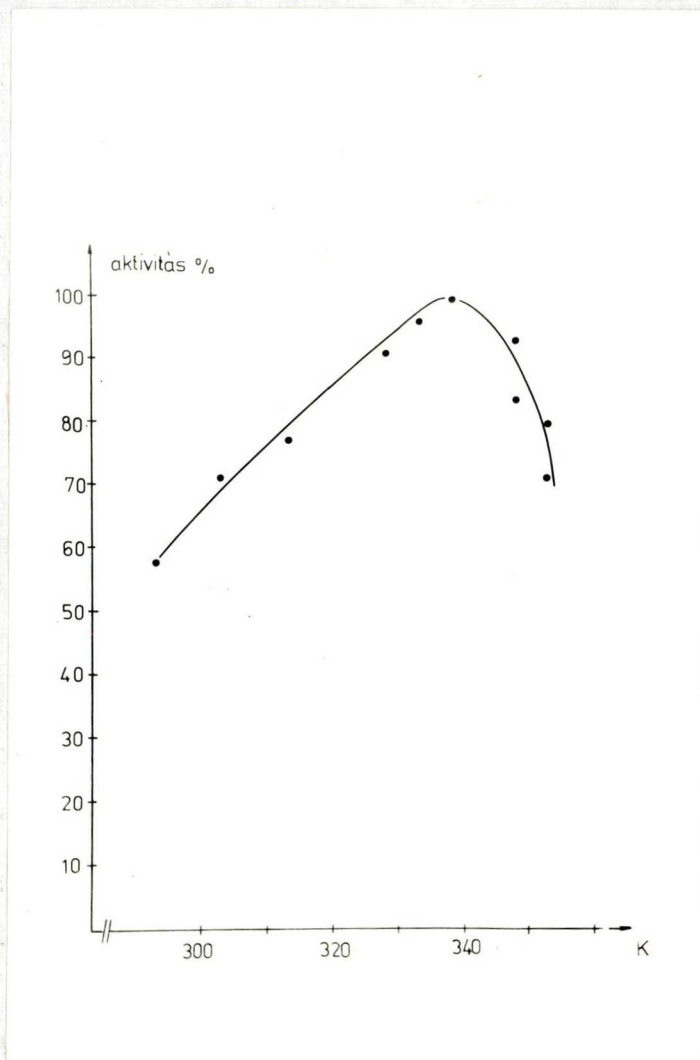


23. ábra

Az immobilizált aminoszilárz aktivitásának pH
függése 303 K-en

Az alkalmazott puffer 0,1 M $\text{Na}_2\text{H}/\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ volt.





24. ábra

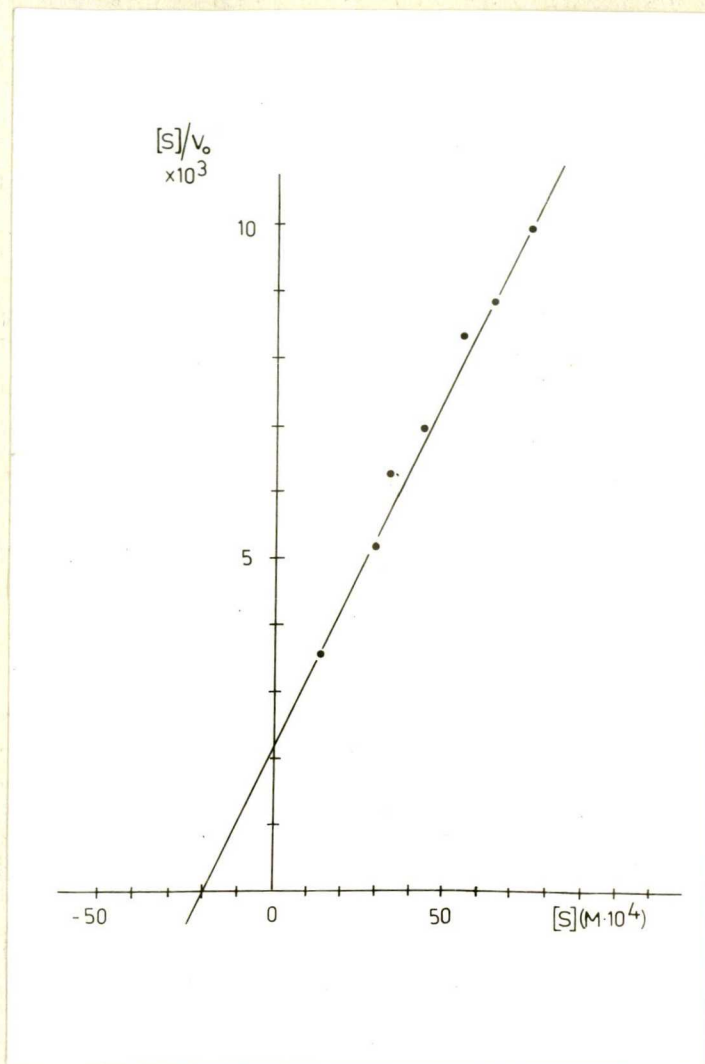
A hőmérséklet hatása az immobilizált aminoaciláz
aktivitására

A kísérleteket 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{HPO}_4$ pH=7,5 pufferben végeztük.

Az inkubálási idő 15 perc volt.

Meghatároztuk az immobilizált enzim kinetikai paramétereit. A szubsztrát koncentrációját $1,5 \times 10^{-5}$ - $7,0 \times 10^{-5}$ M között változtatva mértük az enzim aktivitását. Az alkalmazott puffer 0,1 M pH=7,5 foszfát puffer volt. A kinetikai paraméterek meghatározása a Hanes féle grafikus ábrázolással történt /25. ábra/. A tengelymetszetből meghatározott Michaelis állandó 20,8 μM , amely csaknem harmadrésze a nativ enzimének $/K_M^{\text{nativ}} = 58,2 \mu\text{M}/$.

Mérési eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az immobilizált aminoaciláz pH optimuma fél pH egységgel a lúgos tartomány felé tolódott el, hőmérséklet optimuma 5 K-vel magasabb a nativ enziméhez képest. Az immobilizált enzim magasabb hőmérsékleten kisebb sebességgel denaturálódik. A Michaelis állandó csökkenéséből megállapíthatjuk, hogy az immobilizálás során az enzimnek olyan oldalláncán vagy láncain keresztül alakult ki a kovalens kötés, mely az enzim aktív centrumát kedvező irányban befolyásolta, alacsonyabb szubsztrát koncentráció elegendő a maximális sebesség eléréséhez.



25. ábra

A szubsztrátkoncentráció hatása az immobilizált aminos-
aciláz által katalizált reakció sebességére
/Hanes - féle ábrázolás /

V. ÖSSZEFOGLALÁS

Az aminoacilázra vonatkozó kísérleti eredményeinket az alábbiakban foglalhatjuk össze.

A sertésveséből izolált aminoaciláz pH-optimuma 7,0-nél található, hőmérséklet "optimuma" 333 K körüli érték.

A Michaelis konstans értéke $K_M = 5,4 \times 10^{-3}$ M-nak adódott N-acetil-L-metionin szubsztráttal.

Az aminoaciláz spontán hőinaktiválódásának kinetikájából kiszámítottuk a hőinaktiválódás aktiválási energiáját $\Delta H = 7,07 \times 10^5$ J/M /, melyből megállapíthatjuk, hogy az enzim szobahőmérsékleten közepesen stabil fehérje.

Az aktiv centrum felderítésére irányuló vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az enzim EMSF-fel nem gátlható, tehát aktiv centruma nem tartalmaz aktivált szerin oldalláncot.

A kinetikai konstansok pH-függéséből arra kerestünk felvilágosítást, hogy mely aminosav oldalláncok szükségesek a katalitikus aktivitáshoz. A $\lg V_{\max}$ pH-függéséből kapott $pK = 6,0$ értékből arra következtettünk, hogy az aktiv centrumban fellelhetően egy hisztidin aminosav oldalláncnak van esszenciális szerepe.

Az enzim fém-tartalma metalloproteid, így EDTA-val gátlható. Az EDTA-gátlás pH-függés vizsgálataiból arra

következtettünk, hogy az aktív centrumban a fémiont valószínűleg hisztidin koordinálja /pK=6,6/.

Az aktív centrum felderítésére végzett vizsgálataink és az irodalmi adatok alapján összefoglaltuk azokat az érveket, mely szerint az aminoaciláz és a karboxi-peptidáz-A aktív centruma és kémiai mechanizmusa között szoros hasonlóság áll fenn.

Az enzim ipari alkalmazhatóságának, vagyis immobilizálásának egyik feltétele a megfelelő mátrix-anyag előállítása. A Reanal Finomvegyszergyár által előállított Akrilex C poliakrilamid gélek jó szorbensnek bizonyultak az enzim kovalens kötéssel történő kapcsolására. Ezért meghatároztuk azokat a standard reakciókörülményeket, amellyel meghatározott karboxil-tartalmu és enzimkötő tulajdonságú géleket lehet előállítani.

Megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a gél porozitása a savamid hidrolizisét. Méréseink szerint a gél porozitása nem befolyásolja jelentős mértékben a folyamatot, csak az elérhető maximális karboxiltartalom növekszik csekély mértékben a porusméret növelésével.

A gél enzimkötő képességét a karboxiltartalmon kívül a gél duzzadásának mértéke is befolyásolhatja. Általános összefüggésként megállapítottuk, hogy a kiindulási Akrilex P gél porozitása befolyásolja a képződött Akrilex C gél viselkedését: a nagyobb porusu gélekből

előállított preparátumok térfogata nagyobb és erősebben függ az oldat sókoncentrációjától. A gél duzzadásának szempontjából az enzinkötésre alkalmas pH-tartomány pH = 7,0 - 8,0 között található.

Az általunk előállított Akrilex C gélekhez karbodiimides aktiválással kötöttünk sertésvese aminoacilázt. Meghatároztuk a reakciókörülményeket, amellyel gazdaságosan, megfelelő aktivitásu immobilizált enzim állítható elő /100 mg MCD-vel aktivált 100 mg Akrilex C-re 50 mg aminoaciláz, pH = 7,0 4 óráig 4°C-on kevertetve/.

Az elért eredményeink alapján tanszékünk a Reanal Finomvegyszergyárral közösen szabadalmi oltalmat kért az Országos Találmányi Hivataltól 1979. július 9-i bejelentési nappal. A szabadalmi eljárás jelenleg folyamatban van. Az eljárás a Reanal Finomvegyszergyár Biokémiai Üzemében megvalósításra került.



VI. IRODALOMJEGYZÉK

- Albert, Z., Szewczuk, a., Acta Histochem. Bd. 42. S.
68. /1971/
- Baker, C. G., Fu, S-C. J., Birnbaum, S. M., Sober, H.,
Greenstein, J. P., J. Am. Chem. Soc., 74.
4701 /1952/
- Birnbaum, S. M., Levingtow, L., Kingsley, R. B.,
Greenstein, J. B., J. Biol. Chem. 199. 455. /1952/
- Bruns, F. H., Schulze, C., Biochem. Z. 336. 162. /1962/
- Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., Mori, T., Matsuo, Y., /1972/
in "Fermentation Technology Today" p-383 /ed. Tern, G./
Society of Fermentation Technology, Japan
- Edsall, J. T., Wyman, J., Biophysical Chemistry, Academic
Press 1958, Ch. 8.
- Fodor, P. J., Price, V. E., Greenstein, J. P., J. Biol.
Chem. 178. 503. /1949/
- Frei, J., Kördel, W., Schneider, F., Z. Naturforsch 32 c,
769. /1977/
- Fu, S-C. J., Birnbaum, S. M., Greenstein, J. P., J. Am.
Chem. Soc. 76. 6054 /1954/
- Hartsuck, J. A., Lipscomb, W. N., in "The Enzymes" 3rd ed.
/P.D. Boyer, ed./ Vol. 3, pp. 1-56. Academic Press,
New York, /1971/
- Johnson, M. J., Berger, J., Advances in Enzimology, 2.
69 /1942/
- Kimura, J., Qoshida, T.,: U. S. 3, 243, 356, March 29./1966/

- Kördel, W., Schneider, Fr., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356. 915. /1975/
- Kördel, W., Schneider, Fr., Biochim. Biophys. Acta 445. 446 /1976/a/
- Kördel, W., Schneider, Fr., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357. 1109 /1976/a/
- Kördel, W., Schneider, Fr., Z. Naturforsch. 32. c, 337. /1977/a/
- Kördel, W., Schneider, Fr., Z. Naturforsch. 32. c. 342. /1977/b/
- Limbscomb, W. N., Chem. Soc. Rev. 1, 319-336. /1972/
- Lorentz, K., Voss, J., Flatter, B., Clinica Chimica Acta, 63. 263 /1975/a/
- Lorentz, K., Flatter, B., Clinica Chimica Acta 63. /1975/b/
- Löffler, H. C., Kördel, W., Schneider, Fr., Abstr. Commun. 10th Meet Eur. Sec. p. 621. /1975/
- Lugay, I. C., Aronson, I. N., Biochem. Biophys. Res. Commun. 27. 437, /1967/
- Marconi, W., in "Industrial Aspects of Biochemistry" Vol. 30. p.1.
- Marschall, L., Birnbaum, S. M., Greenstein, J. P., J. Am. Chem. Soc. 78. 4336 /1956/
- Maschmann, E., Biochem. Z., 310. 131 /1941/
- Masková, H., Barth, T., Jirevsky, B. B., Rycklik, I., 1973' Collection Czechoslov. Chem. Commun. 38. 943.
- Mitz, M. A., Schlueter, R. J., Biophysica and Biochimica Acta 27. 168 /1955/

- Mitz, M. A., Schlueter, R. J., J. Am.Chem.Soc. 81.4024/1959/
Mokrach, C., Lewis, Analytical Biochemistry 18. 84-71/1976/
Moor, S., Stein, W. H., *idid.*, 176. 367 /1948/
Moravcsik, E., Tüdös, H., Telegdi, J., Kémives, K., Ötvös,
L., Abstracts of the 9th FEBS Meeting 1974 Buda-
pest, S2,3
Moravcsik, E., Tüdös, H., Telegdi, K., Moldoványi, I.,
Ötvös, L., XII.Biológiiai vándorgyűlés kiadvány,
321. /1971/
Niedzinski-Plotnicki, B., Jankowski, A., Archiv. Immunol. et
Ther. Exper. 24. 433 /1976/
Ohno, Y., Stahmann, M., Macromolecules 4, 350 /1971/
Ötvös, L., Moravcsik, E., Máty Gy., Tüdös, H., Telegdi, J.,
Acta Chim. Hung. 94. 221, /1977/
Rao, K., Birnbaum, S.M., Kingsley, R.B., Greenstein, J.P.,
J. Biol.Chem. 198. 507 /1952/
Quilico, F.A., Lipscomb, W.N., Adv.Protein Chem. 25.1-78, /1971/
Schmiederberg, O., Naung - Schmiederberg Archiv, Exp.
Patol, Pharmacol. 13, 379, /1981/
Smith, E.L., Proc. Nat. Acad. Sci., 35, 80 /1949/
Szajáni, B., Boross, L., Deér, A., 12th Febs Meeting
Drezda /1978/ Abstr, No. 2813.
Szajáni, B., Boross, L., Deér, A., 11th FEBS Meeting
Copenhaga /1977/ abstr. No.
Szajáni, B., Deér, A., Boross, L., Acta Biochem. Biophys.
Acad. Sci. Hung. /1980/
Szewczuk, A., Arch. Immunol. et Ther. Exper. 19. 385 /1971/

- Tosa, T., Mori, T., Fuse, N., Chibata, I., Enzymologia 31.
214, /1966/
- Tosa, T., Mori, T., Fuse, N., Chibata, I., I. Biotechnol.
Bioeng. 9, 603, /1967/
- Tsen, U., Tsi, Orechowits, V. N. Biochimija 23, 772, /1958/
- Tyron, W., Kwiatkowska, J., Ujec, M., Neoplazma, 26./1979/
- Yokote, Y., Fujita, M., Shimura, G., Nogochi, S., Kirimura,
K., Samejima, H., Agr.Biol.Chem. 39, 1545, /1975/
- Ziomek, E., Slowinska, R., Szewczuk, A., Clinica Chimica
Acta 93, 189 /1979/

RÖVIDÍTÉSEK

DEAE-cellulóz: dietil-amino-etil-cellulóz
EDC: 1-etil-3-/-3-dimetil-aminopropil/karbodiimid
hidroklorid
EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav-dinátriumsó
MCD: 1-ciklohexil-3-/2-morfolinoetil/karbodiimid
FMSF: fenil-metil szulfonil-fluorid
SDS: nátrium-dodecil-szulfát
TNBS: trinitro-benzoszulfonsav
Tris: tris-hidroximetil-aminometán

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok dr. Boross Lászlónak, a Biokémia Tanszék professzorának, hogy lehetőséget nyújtott disszertációm elkészítéséhez, figyelmemet e témára irányította és hasznos elméleti és gyakorlati tanácsaival munkámat kísérte.

Köszönetet mondok dr. Szajáni Bélának, a Reanal Finomvegyszergyár csoportvezető mérnökének az igen sokoldalú elméleti és gyakorlati segítségért.