

# **A PAPAN KONFORMÁCIÓSTABILITÁSA, STABILIZÁLÁSA ÉS ALKALMAZÁSA SZERVES OLDÓSZERES KÖZEGBEN**

**Doktori (Ph.D.) értekezés**

Készítette: Szabó András  
Témavezető: Lehoczkiné Dr. Simon Mária

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR  
BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI TANSZÉK  
SZEGED  
2009

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS</b> .....	1
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	4
2.1. A PAPAIN JELLEMZÉSE .....	4
2.1.1. Szulfhidril-proteázok előfordulása és szerepe .....	4
2.1.2. A papain szerkezete .....	5
2.1.2.1. Helikális szerkezetek .....	6
2.1.2.2. $\beta$ -lemez és kanyar szerkezetek .....	7
2.1.2.3. A papain aktív centruma .....	8
2.1.2.4. A papain oxianion-ürege .....	10
2.1.2.5. A víz szerepe a szerkezet fenntartásában .....	10
2.1.3. A katalízis mechanizmusa .....	11
2.1.4. Az enzim stabilitása .....	13
2.1.5. A papain összehasonlítása más tiol-proteázokkal .....	14
2.2. A FEHÉRJESZERKEZET VIZSGÁLATA .....	14
2.3. BIODOMÉNYSZERES SZERVES OLDÓSZERES KÖZEGBEN .....	17
2.3.1. A víz szerepe .....	18
2.3.2. Szerves oldószeres közeg hatása az enzimek szerkezetére .....	20
2.3.3. Enzimek gyakorlati alkalmazása .....	21
2.4. ENZIMEK STABILITÁSA ÉS STABILIZÁLÁSA .....	24
2.4.1. Enzimek rögzítése .....	24
2.4.2. Kémiai módosítás .....	25
2.4.2.1. Fehérjék acilálása karbonsav-anhidridekkel .....	25
2.4.2.2. Fehérjék glikálása .....	27
2.4.3. Enzimek genetikai módosítása .....	28
2.4.4. Szerves ozmolitok szerepe a fehérjék stabilizálásában .....	28
<b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	32
3.1. ANYAGOK .....	32
3.2. MÓDSZEREK .....	32
3.2.1. Aktivitásmérés kazein szubsztráttal .....	32

3.2.2. Aktivitásmérés fluorogén szubsztráttal .....	33
3.2.3. Stabilitásvizsgálat .....	33
3.2.4. Gibbs-féle szabadenergia-változás meghatározása .....	34
3.2.5. A papain kémiai módosítása .....	34
3.2.6. Szabad aminocsoportszám meghatározása .....	35
3.2.7. Natív poliakrilamid gélelektroforézis .....	35
3.2.8. A papain $K_M$ és $V_{max}$ paramétereinek meghatározása .....	36
3.2.9. <i>N</i> -acetil-L-tirozil-etilészter szintézise .....	36
3.2.10. Belső fluoreszcencia mérése .....	36
3.2.11. Cirkuláris dikroizmus mérése .....	37
<b>4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK .....</b>	<b>38</b>
4.1. A PAPAIN AKTIVITÁSA ÉS STABILITÁSA SZERVES OLDÓSZERES KÖZEGBEN .....	38
4.1.1. Vízzel elegendő szerves oldószerek hatása .....	38
4.1.2. Vízzel nem vagy csak részben elegendő oldószerek hatása .....	40
4.1.3. A papain aktivitása az oldószerek <i>log P</i> értékének függvényében .....	41
4.1.4. Szerves oldószeres közeg hatása az enzim szerkezetére .....	42
4.1.4.1. Fluoreszcencia-spektroszkópiai mérések .....	42
4.1.4.2. Cirkuláris dikroizmus mérések eredménye .....	46
4.2. SZÉNHIDRÁTOK SZEREPE A PAPAIN STABILIZÁLÁSÁBAN .....	49
4.2.1. Szénhidrátok hatása a papain aktivitására és stabilitására .....	49
4.2.2. A papain szabad primer aminocsoportjainak változása .....	53
4.2.3. Szénhidrátok hatása a papain szerkezetére tetrahidrofurán/víz elegyben .....	54
4.2.3.1. Szénhidrátok hatása az enzim triptofán-fluoreszcenciájára .....	54
4.2.3.2. Szénhidrátok hatása az enzim harmadlagos szerkezetére .....	56
4.3. SZERVES SAVANHIDRIDEK SZEREPE A PAPAIN STABILIZÁLÁSÁBAN .....	56
4.3.1. Kémiai módosítás karbonsav-anhidridekkel .....	56
4.3.2. A módosított enzimformák aktivitása szerves oldószeres közegben .....	58
4.3.3. Az acil-enzimformák kinetikai paraméterei etanol/víz elegyben .....	62
4.3.4. Az acil-enzimformák stabilitása szerves oldószeres közegben .....	63
4.3.5. A módosított papain szerkezete szerves oldószeres közegben .....	67
4.3.5.1. Az acil-enzimformák fluoreszcencia-paraméterei .....	67

4.3.5.2. A módosított enzimformák közeli-UV-CD-spektruma .....	68
4.4. <i>N</i> -ACETIL-L-TIROZIL-ETILÉSZTER SZINTÉZIS .....	70
<b>5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE .....</b>	<b>71</b>
5.1. A PAPAİN KONFORMÁCIÓSTABILITÁSA SZERVES OLDÓSZERES KÖZEGBEN .....	71
5.1.1. Szerves oldószerek hatása a papain aktivitására és stabilitására .....	71
5.1.2. A papain szerkezete vízzel elegyedő szerves oldószerekben .....	73
5.1.2.1. Szerkezet–aktivitás összefüggés etanolos és acetonitriles közegben .....	74
5.1.2.2. Szerkezet–aktivitás összefüggés tetrahidrofurános közegben .....	75
5.2. A PAPAİN STABILITÁSÁNAK NÖVELÉSE SZERVES OLDÓSZERES KÖZEGBEN .....	76
5.2.1. A szénhidrátok stabilizáló hatása .....	76
5.2.2. A papain szerkezete szénhidrátok jelenlétében tetrahidrofurános közegben .....	77
5.2.3. A papain módosítása szerves savanhidridekkel .....	78
5.2.4. Karbonsav-anhidridek hatása a papain aktivitására és stabilitására .....	79
5.2.5. A kémiailag módosított papain szerkezete szerves oldószeres közegben .....	80
5.3. KÉMIAI MÓDOSÍTÁSOK HATÁSA AZ ENZIM SZINTETIKUS AKTIVITÁSÁRA .....	81
<b>6. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>82</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>85</b>
<b>8. IRODALOM .....</b>	<b>91</b>
<b>9. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>99</b>
<b>10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>100</b>

## 1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Napjainkban az enzimek felhasználási köre egyre bővül az ipar számos területén, a nem hagyományos közegű szerves kémiai szintéziseknél (gyógyszerek, detergensok, aroma- és ízfokozó anyagok, optikai izomerek, stb. előállítására), a klinikai laboratóriumi diagnosztikában és az élelmiszer analitikában. Az enzimek alkalmazásának előnyei a nagyfokú specifitás (molekula, régió, sztereo, reakció), az enyhe reakció körülmények (pH, nyomás, hőmérséklet), az, hogy nem toxikusak; mind a termék, mind az enzim biodegradábilis, így környezetszennyezéssel nem kell számolni. A szerves oldószeres közegben történő alkalmazás további előnyökkel jár: szemben a kémiai szintézisekkel itt nem kell melléktermékkel számolni, nincs szükség védőcsoportokra, illetve azok eltávolítására. Nőhet a szubsztrát vagy a termék oldékonysága, fokozódhat az enzim hőstabilitása, szabályozható a régió- és enantioszelektivitása, és a katalizált reakció egyensúlya is változhat. Szerves oldószeres közegben hidroláz enzimekkel szintéziseket lehet megvalósítani. Ennek ellenére az eddig ismert mintegy ötezer enzimből mindössze száz körüli az iparban és a mindennapi gyakorlatban felhasználtak száma, mivel az alkalmazás körülményei általában nem kedveznek az enzimek katalitikus aktivitásának és stabilitásának, mely utóbbi alatt az enzim aktivitásának időbeli alakulását értjük.

A szerves oldószeres többféleképpen csökkenthetik az enzimek aktivitását és stabilitását. Vizes oldatban a fehérjéket hidrátburok veszi körül, szerves oldószer jelenlétében azonban az oldószer-molekulák helyettesíthetik a vízmolekulákat a hidrátburokban és a fehérje szerkezetében. A szervesoldószer-molekulák bejutva az enzim szerkezetébe, megbonthatják a szerkezetet stabilizáló másodlagos kötések, helyettesíthetik a szerkezeti vízmolekulákat, az enzim aktív centrumához is kapcsolódhatnak, lokális konformációváltozást idézhetnek elő, és ezáltal inaktiválhatják az enzimet. Az enzimek stabilitása, stabilizálása jelenti az egyik legbonyolultabb problémát a fehérjekémiában, mivel azt sok tényező befolyásolhatja. Szerves oldószeres közegben a stabilitás növelhető a biokatalizátor immobilizálásával (Akrilex, Sorsilen, stb. hordozók), adalékanyagok segítségével (ionok, polihidroxi-molekulák), kémiai és genetikai módosítással. A módosítások során a stabilitás növekedésén felül sok esetben megváltozhat az enzimek szubsztrátspecifitása, és nőhet a specifikus aktivitásuk is.

Szerves oldószeres közegben hidroláz enzimekkel számos kémiai reakciót (peptid-, észterszintézist, átészteresítést, izomerizációt, aminolízist, stb.) lehet megvalósítani. Például

aciláz enzimekkel  $\beta$ -laktám antibiotikumok funkciós csoportjainak módosításával változtatható azok hatáspecifitása és stabilitása. A lipázok felhasználása talán a legszélesebb körű az iparban: íz- és illatanyagok, mosószeradalékok, detergensok előállításában, de alkalmazzák a taxol rákellenes szer többlépéses, enzimátikus szintézisében is. Proteázokkal peptidek és aminosav-észterek szintetizálhatók. A szintetikus peptideket az orvostudomány, a biokémia és szerkezetbiológia számos területén használják például antigénként specifikus antitestek szintézisében, peptidhormon-receptorok izolálásához, hormonként vagy modellként fehérjék térszerkezetének felderítésében. Aminosav-észtereket pedig mint aktivált aminosavakat peptidek szintézisekor, illetve aromaanyagok előállításához használnak.

Kísérleteink tárgyául a széles szubsztrátspecifitású papain választottuk, amely az ipar több területén, szerves kémiai szintézisekben az egyik leggyakrabban használt enzim aminosav-észterek és oligopeptidek előállításában, ennek ellenére szerves oldószeres közegű katalitikus aktivitása, stabilitása és szerkezete az irodalomból kevésbé volt ismert.

Célkitűzéseinket az alábbiak szerint foglalhatjuk össze:

Munkánk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a papain katalitikus aktivitását és stabilitását számos, szerves kémiai szintézisben gyakran használt szerves oldószerben 0–90 tf% koncentrációknál. Kísérleteinkhez vízzel elegyedő (etanol, metanol, acetone, acetonitril, tetrahidrofurán) és vízzel nem elegyedő (toluol, etilacetát, *n*-hexán) szerves oldószeres használatát egyaránt terveztük.

Választ kerestünk arra a kérdésre is, hogy a szerves oldószeres jelenléte idéz-e elő változásokat az enzim másod- és harmadlagos szerkezetében. A szerkezetváltozásokat az enzim triptofán-fluoreszcenciájának vizsgálatával, valamint közeli- és távoli-UV cirkuláris dikroizmus (CD-) spektroszkópiai mérések segítségével kívántuk detektálni.

Általában a nem hagyományos közeg, a szerves oldószeres jelenléte csökkenést eredményez az enzimek aktivitásában, ezért feladatul tűztük ki a papain inaktiválódásának kivédését szénhidrátok (D-ribóz, D-fruktóz, D-glükóz, D-szacharóz, D-raffinóz) hozzáadásával.

Kísérleteink célját képezte annak vizsgálata is, hogy a szénhidrátok jelenléte okoz-e szerkezetváltozást a papainban, és hogy kialakulhat-e kovalens kötés a szénhidrát- és a fehérjemolekulák között.

Feladatul tűztük ki a papain szerves oldószeres közegű aktivitásának növelését az enzim primer aminocsoportjainak kovalens kémiai módosításával, szerves savanhidridekkel (citrakonsav-, borostyánkősav-, maleinsav-, ecetsav-, propionsav-anhidrid).

Célunk volt annak felderítése is, hogy a kémiai módosítások során milyen mértékű az aminocsoportok módosulása, és történnek-e változások a papain katalitikus aktivitásában, hatékonyságában, kinetikai paramétereiben ( $K_M$ ,  $V_{max}$ ) és szerkezetében.

Arra a kérdésre is választ kerestünk, hogy a módosított enzimformák szintézisekben hatékonyabbak-e a nem módosított papainnál, amelyhez modellreakcióként az *N*-acetyl-L-tirozil-etilészter szintézist választottuk.

---

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A PAPAINEK JELLEMZÉSE

#### 2.1.1. Szulfhidril-proteázok előfordulása és szerepe

A C1 proteázcsalád képviselői, az aktív centrumban ciszteint tartalmazó proteázok (cisztein-, szulfhidril-, SH-, tiol-proteázok), széles körben elterjedtek az élővilágban, megtalálhatók pro- és eukariótákban (baktériumok, növények, gerinctelen állatok, gerincesek) egyaránt (Berti és Storer, 1995). A szuperfamília egyik legismertebb enzime a *Carica papaya* trópusi növény tejnedvében található papain. Az enzimet először Balls és munkatársai izolálták 1937-ben, majd később Smith és Kimmel azonosították a növény szárított tejnedvében, majd számos tulajdonságát elsőként 1960-ban publikálták (Arnon, 1970). Az enzim nagyon hasonlít mind szerkezetében, mind enzimatisma tulajdonságaiban számos növényi, emlős lizoszomális és kórokozó protozoa proteázra: így például a szintén papaya tejnedvében található caricainra, mely egy papain-variáns, az *Actinidia chinensis*-ben levő actinidinre, a *Ficus glabrata*-ban fellelhető ficinre, az emlős lizoszomális katepszinekre, a *Trypanosoma cruzi* protozoából származó cruzipainra vagy a *Plasmodium falciparum* falcipainjára. A C1 proteázcsalád kórokozókban található enzimeit számos fiziológiai és patológias elváltozást okozhatnak eukarióta élőlényekben, ezért ma a kutatások jelentős része a patogén SH-proteázok elleni kemoterápiás készítmények, inhibitorok kifejlesztésére irányul, melyek a jövőben talán megoldást nyújthatnak a Chagas-kór vagy a malária ellen, melyek emberek millióit fenyegetik az egész világon (Dardenne és mtsai., 2003).

A növényi cisztein proteázok fiziológiai szerepét az elmúlt években derítették fel. Konno és munkatársai (2004) kimutatták, hogy a papaya növény levele erősen toxikus *Samia ricini* Lepidoptera lárvákra. A növény levelével etetve a lárvákat, azok növekedése visszamaradt, és négy nap elteltével a többségük elpusztult. A toxikus hatás elkerülhető volt a levelek E-64 cisztein proteáz inhibitor előkezelésével. Kimutatták, hogy a peszticid hatásért a papaya tejnedvében található papain a felelős. Több növényi cisztein proteázról (ficin, bromelain, actinidin) szintén kiderült, hogy gátolják a növényvel táplálkozó rovarlárva fejlődését (Konno és mtsai., 2004, Malone és mtsai., 2005). Valószínű tehát, hogy a növényi SH-proteázok fő funkciója a rovarkártevők elleni védelemben van.



### 2.1.2. A papain szerkezete

A papain 212 aminosavból felépülő, egyetlen polipeptid láncból álló fehérje (molekulatömege: 23 350 dalton), a C1 proteázcsalád tagja. A molekula térszerkezetének kialakulása során két doménné szerveződik, amelyek között egy V alakú mélyedés alakul ki, benne az aktív centrummal.

Az enzimek közül a papain háromdimenziós szerkezetét (1. ábra) az elsők közt térképezték fel (Drenth és mtsai., 1971). Szerkezetére jellemző, hogy megközelítőleg két egyforma méretű doménből (L-domén: 10–111. és 208–212. aminosav-oldalláncok; R-domén: 1–9. és 112–207. aminosav-oldalláncok) áll, azonban ezek eltérő másodlagos szerkezeti motívumokat hordoznak. Az L-domén főleg  $\alpha$ -hélixekből épül fel, az R-domén kulcsfontosságú részei pedig antiparallel  $\beta$ -redőkből állnak. A rendezett másodlagos szerkezeti elemek mellett a papain kb. 36%-ban tartalmaz rendezetlen, aperiodikus régiókat is (Provencher és Glöckner, 1981).

Említést érdemel, hogy ellentétben más fehérjék szerkezetével, a papain  $\alpha$ -héliceiben a polipeptidlánc karbonilcsoportjai távol találhatóak a hélixek tengelyétől, így hosszabb hidrogénkötések jöhetnek létre (2,89 Å helyett 2,98 Å). A hidrogénhidak paraméterei az



**1. ábra.** A papain háromdimenziós szerkezete, feltüntetve a katalízisben szereplő aminosavakat és a másodlagos szerkezeti elemeket (késsel az  $\alpha$ -hélixek, lilával a  $\beta$ -redők, pirossal a rendezetlen régiók vannak jelölve; MEROPS peptidáz adatbázis).

antiparallel  $\beta$ -lemez szerkezetekben is szokatlanok. A  $\beta$ -lemez közepén található hidrogénkötések általában rövidebbek, mint a végeken elhelyezkedők (átlagos hosszúságuk 2,91 Å). A kanyar szerkezetekben a hidrogénkötések pedig meglehetősen hosszúak, és jellemzőjük még, hogy geometriájuk nem lineáris (Kamphuis és mtsai., 1984).

### 2.1.2.1. Helikális szerkezetek

Az L-domén három  $\alpha$ -hélixből áll, melynek az első hélixét (L1) 24–42. aminosav-oldalláncok alkotják. Az L1 szerkezete eltérő a hagyományos  $\alpha$ -hélixektől, mivel első aminosavának (i) karbonil-oxigénje az i+3. és i+4. aminosavakkal egyaránt képezhet hidrogénhidat. Az L1 nagy része a molekula belsejébe ágyazódik, egy poláros és egy apoláros részre különülve el. Hozzájárul a domének közötti zseb, és a hidrofób mag kialakításához, valamint ez a hélix tartalmazza a katalitikus triád Cys25-ös tagját is.

Az L2 hélix az 50–57. aminosav-oldalláncokat magába foglaló, és szintén a molekula belsejébe ágyazódó régió. Pozíciója ellenére az L2 hélix poláros, savas karakterű oldalláncokat is tartalmaz (Glu50, Glu52, és Asp57). A negatív töltések semlegesítése érdekében a Glu50 az Arg83-mal, a Glu52 a His81-el kapcsolódik. Az Asp57 a Ser60-nal, Ser70-nel és az Arg59-cel lép kölcsönhatásba, töltését pedig a vízmolekulák által létrejövő hidrogénhidak vagy protonok kompenzálják. Az L2 hélix tengelyének lefutása nagyjából párhuzamos L1-ével. Az L3 hélix (67–78. aminosav-oldalláncok) a molekula felszínén található. Tengelye merőleges az L2 tengelyére, és 60°-os szöget zár be az L1 hélixével, így azok jelentősen megközelítik egymást. A papain molekula belsejében elhelyezkedő töltéssel rendelkező oldalláncok elektrosztatikus kölcsönhatásai azonban kompenzálni képesek az ebből adódó szerkezeti feszültséget. Az enzim felszíni elektrosztatikus potenciálját a 2. ábra mutatja. A fehérjék elektrokémiai potenciálját az aminosav-oldalláncok és a kötött ionok töltésének eredője adja. Ennek nagy szerepe van a fehérjék térszerkezetének kialakulásában és stabilitásában, az enzimkatalízisben, valamint a fehérje–fehérje kölcsönhatásokban.

Az R-domén két hélixet tartalmaz: R1 a 117–127. aminosav-oldalláncok, és R2 a 138–143. oldalláncok. Mindkét struktúra a felszíni régiókban lokalizálódik. A következő sajátságok állapíthatók meg az L1, L3 és R1 hélixekről: Összehasonlítva más fehérjék szerkezetével, az átlagos konformációs szögek eltérnek a klasszikus  $\alpha$ -hélixekben mértéktől, és a karbonilcsoportok



**2. ábra.** A papain felszíni elektrosztatikus potenciáltérképe. Fehérrel a neutrális, kékkel a pozitív töltések vannak jelölve (Wiederanders, 2003).

az  $\alpha$ -hélixekből kifelé irányulnak, aminek eredményeként az NH-csoportok befelé mutatnak, így végül hosszabb hidrogénkötések jönnek létre (Kamphuis és mtsai., 1984).

#### 2.1.2.2. $\beta$ -lemez és kanyar szerkezetek

Az R-doménre jellemző fő másodlagos szerkezet a  $\beta$ -redő. A hat  $\beta$ -lemez közül a fehérje közepén elhelyezkedőt a 158–167. aminosav-oldalláncok alkotják. Ez a 164. és 165. oldalláncoknál megtörik kb.  $120^\circ$ -os szögben. A hidrogénkötések paraméterei és konformációs szögei nagyobb diverzitást mutatnak, mint az  $\alpha$ -hélixekben. A  $\beta$ -lemezekben található oldalláncok főleg hidrofób karakterűek, míg a végeken levők polárosak. Az R-domén belsejének hidrofób aminosavai egy nagyméretű üreget határolnak (Kamphuis és mtsai., 1984).

Az  $\alpha$ -hélixeket kanyar szerkezetek kapcsolják össze. Két fő típusa lehet: a  $\beta$ -kanyarok nem helikális tetrapeptid szakaszok, melyeknél az első és az utolsó alfa-szénatom távolsága  $7 \text{ \AA}$ -nél kisebb; a  $\gamma$ -kanyarok pedig olyan tripeptid szakaszok, amelyekben az első és az utolsó peptidkötés között hidrogénhíd található. A torziós szögek alapján  $\beta$ -kanyarokból hétféle,  $\gamma$ -kanyarokból kétféle fordul elő fehérjékben. Bennük általában meghatározott pozíciókban Gly

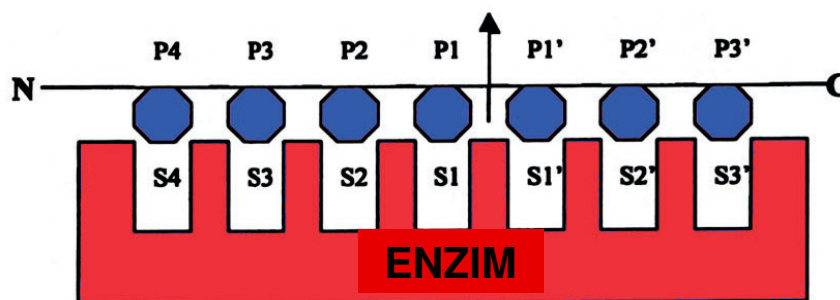
aminosavak vannak, ez a szabály a papain esetében azonban alig érvényesül. A kanyar szerkezetek többsége a fehérje felszínén található, melyek hidrogénhidjai hosszabbak a szokásosnál.

### 2.1.2.3. A papain aktív centruma

A papain aktív centruma a két domén közti mély barázdában található, mely a fehérje egyik legstabilabb része. Az esszenciális katalitikus aminosav-oldalláncok a Cys25, mely az L-domén egyik  $\alpha$ -hélixében helyezkedik el, és a His159, amely az R-domén egyik antiparallel  $\beta$ -lemezében lokalizálódik. E két oldallánc az Asn175-tel együtt alkotják a szulfhidril-proteázok, így a papain katalitikus triádját (Cys25/His159/Asn175), mely analóg a szerin proteázok szuperfamília Ser/His/Asp katalitikus aminosav-oldalláncaival. Dardenne és munkatársai (2003) a papain aktív centrumának tulajdonságait vizsgálták, amely során a Cys25<sup>(-)</sup> és a His159<sup>(+)</sup> katalitikus ionpár lehetséges kialakulására, stabilizálására és szabályozására irányult figyelmük. A papain proton transzfer régiójának, azaz a Cys25- és His159-oldalláncok elektrosztatikus tulajdonságait mutatták, hogy az enzimnek egy jól definiálható, a katalitikus mechanizmust befolyásoló elektrosztatikus környezete van, mely a katalitikus hely kialakulásának és stabilizálásának kedvez. A papain aktív centrumának az egész C1 proteincsaládra jellemző ún. „elektrosztatikus fingerprintje” van. Feltételezik, hogy az enzimben egy reguláló mechanizmus található, mely az ionpár reaktivitását szabályozza, és ez a funkció valószínűleg az Asp57 savas aminosav-oldalláncnak tulajdonítható.

Nem minden C1 fehérjére igaz, hogy bennük elektrosztatikus kapcsoló mechanizmus található. A család számos enzimében a 158-as pozícióban negatív Asp és az 57-es pozícióban egy másik negatív aminosav-oldallánc van. Az actinidin és a katepszin L kivételek ez alól, mivel bennük az utóbbi pozícióban nem negatív töltésű oldallánc található. Több enzimben a 158-as pozícióban poláros Asn van, az 57-es pozícióból pedig hiányzik a negatív oldallánc. Lehetséges, hogy a néhány enzim esetében hiányzó 158-as pozíciójú negatív töltésű oldallánc az evolúció egy oldalágát képviseli (Dardenne és mtsai., 2003).

A 3. ábra a papain szubsztrátkötő helyének sematikus rajzát mutatja peptidszubsztrát jelenlétében (Schechter és Berger, 1967). Az enzim két doménje között, a 25Å hosszan húzódó aktív centrumban hét kitüntetett hely (S1–S4 és S1'–S3') található, ahová a szubsztrát egy-egy aminosav-oldallánca (P1–P4 és P1'–P3') képes kötődni. A zsebek közül négy az aktív centrum



**3. ábra.** A papain szubsztrátkötő helyének sematikus ábrája. S betűvel a szubsztrátkötő alhelyek, P-vel a peptidszubsztrát aminosav-oldalláncai vannak jelölve (Schechter és Berger, 1967).

egyik, míg három a másik oldalán található. Ezek mérete nagyobb, mint a szintén cisztein proteáz katepszin B és L enzimek szubsztrátkötő alhelyei (Portaro és mtsai., 2000). Az egyes kötőhelyek specifitása eltérő: amíg például az egyik zseb hidrophil, addig a másik hidrofób aminosav-oldallánccot preferál (Schechter és Berger, 1967). A papain széles szubsztrátspecifitású enzim, a polipeptid-szubsztrátot azonban elsősorban a Lys és Arg aminosav-oldallánccok (P1) mellett hasítja nagy gyakorisággal. A főleg Lys- és Arg-oldallánccokat előnyben részesítő S1 kötőhely kevésbé specifikus a szomszédos S2-höz képest, amely kizárólag hidrofób aminosav-oldallánccok (P2) kötődését segíti. Az S2 helyet az enzim hidrofób zsebének is nevezik, melyet a Trp69, Tyr67, Phe207, Pro68, Ala160, Val133 és Val157 aminosav-oldallánccok alkotják (Brocklehurst és mtsai., 1987). A papain specifitását főleg a P2/S2 kölcsönhatás határozza meg (Lecaille és mtsai., 1999). A 90-es években derítették fel az S' alhelyek specifitását. Fluoreszkáló szubsztrátok segítségével kimutatták, hogy az S1' kötőhely specifitása meglehetősen széles (Ménard és mtsai., 1993). Portaro és munkatársai (2000) — olyan fluorogén szubsztrátok alkalmazásával, amelyek lefedték az S4–S3' kötőhelyeket — kimutatták, hogy a szubsztrát kötődésének kedvez, ha azokban a P3' pozícióban Trp-, Tyr- vagy Asn-oldallánc található. Igazolták azt is, hogy hidrofób aminosav-oldallánc kötődhet az S4, S3, S2' és S3' pozícióba egyaránt.

Tetrapeptid fluorogén kumarin-szubsztrátkönyvtár segítségével, mely több ezer konstrukciót tartalmazott, összehasonlították számos szerin és cisztein proteáz, köztük a papain szubsztrátspecifitását is (Harris és mtsai., 2000). A szubsztrát molekulában a P1–P4 pozícióban változtatták az aminosav-oldallánccokat. Az eredmények azt mutatták, hogy az SH-proteázoknak a

szerin proteázoknál jóval szélesebb szubsztrátspecifitásuk van. A papain azokat a szubsztrátokat fogadta el leginkább, melyek P1 pozícióban Arg-t, a P2 helyen Val > Phe > Tyr > Nle oldalláncot tartalmaztak. Az enzim P3 specifitása szélesebb, a P4 specifitása pedig még szélesebb volt.

#### 2.1.2.4. A papain oxianion-ürege

A cisztein és szerin proteázokra jellemző oxianion-üreg a megfelelő töltéseloszlást biztosítja, és stabilizálja a tetraédes szerkezetet az enzimreakció közben. A kialakuló elektrosztatikus természetű kölcsönhatások miatt e régió töltéssel rendelkező aminosav-oldalláncai jelentős hatással vannak az enzim katalitikus tulajdonságaira. Ménard és munkatársai (1995) vizsgálataik során a 19-es pozíciójú glutamint, mely része a papain oxianion-üregének, glutamátra, hisztidinre és aszparaginra cserélték. A mutációkkal 65–315-öd részére csökkentették az enzim a katalitikus hatékonyságát ( $k_{\text{cat}}/K_M$  érték). A glutamátot tartalmazó mutáns aktivitása ionizáló hatásra a vad típusúnak mintegy tizenketted részére csökkent. Ez a mutáns az aszparagint tartalmazó mutáns aktivitásának mintegy harmadrészával rendelkezett. A három mutáns közül a hisztidint tartalmazó katalitikus határfoka csökkent a legnagyobb mértékben. A kísérletekből az is kiderült, hogy az oxianion-üreg kölcsönhatások sokkal jelentősebbek szerin proteázok esetében, mint cisztein proteázokban. A szerin proteázokhoz hasonlóan a szulfhidril-proteázok katalitikus aminosavának (Cys25) amidcsoportja is hidrogénkötést alakít ki az oxianion-üreggel. A papain katalitikus centruma és oxianion-ürege az N-terminális közeli  $\alpha$ -hélixben található, mely fontos szerepet játszik a két régió stabilitásának megőrzésében.

#### 2.1.2.5. A víz szerepe a szerkezet fenntartásában

A papain enzimben 195 vízmolekula-kötőhelyet azonosítottak (Kamphuis és mtsai., 1984). A víz fontos szerepet játszik a szerkezeti stabilitás fenntartásában, és ez különösen igaz a fehérje belsejében található vízmolekulákra, melyek többsége összekötő funkcióval bír. A papain a két domén közötti zsebben 21 vízmolekulát köt a domének asszociációja, valamint az N- és C-terminális fehérjerész feltekeredése közben. További tíz vízmolekula képes beépülni az enzim felszínének mélyedéseibe, és 164 vízmolekula hoz létre monomolekuláris, illetve bimolekuláris réteget a protein körül. Ez a burok nem tökéletesen folytonos, egyes helyeken megszakadhat (pl. az R-domén  $\beta$ -lemezének végein).

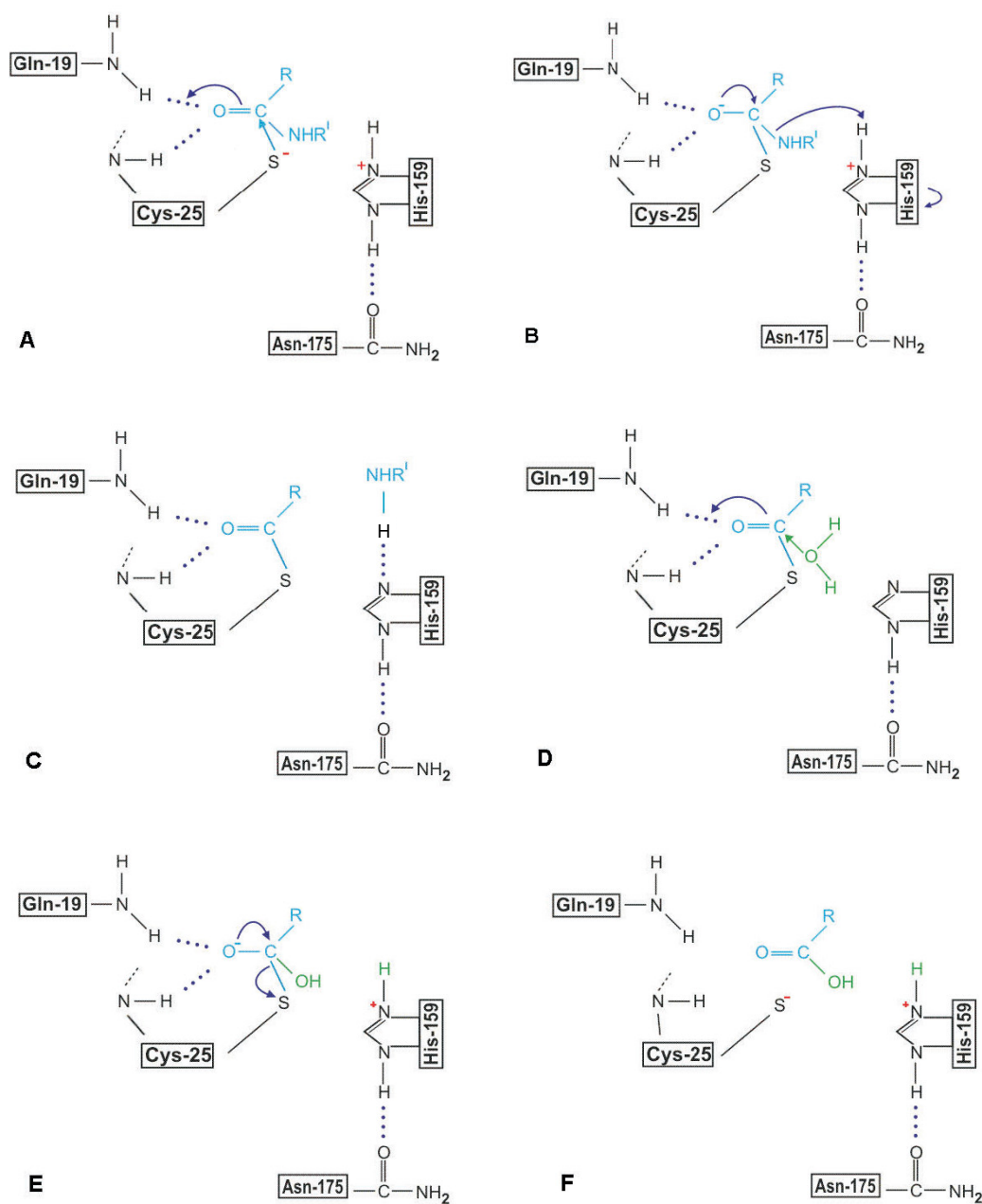
A felszíni burkot alkotó vízmolekulák a következő öt csoportba sorolhatók:

1. A fehérjéhez viszonylag gyengén kötődő vízmolekulák, melyek fontos szerepet játszanak a protein molekulák összekapcsolásában a kristályosodás során.
2. Vízmolekulák, melyek a polipeptid gerinchez kötődnek.
3. Vízmolekulák, melyek az aminosav-oldalláncokhoz kötődnek. Ekkor a kötődés erőssége nagyobb az előbb említetténel.
4. Második hidratáló vízburok.
5. Vízmolekulák, melyek szomszédságában nincsenek atomok  $3,3 \text{ \AA}$  távolságon belül.

Összefoglalva megállapítható, hogy a víz fontos szerepet tölt be a papain szerkezeti stabilitásának fenntartásában, és ez különösen igaz a belső, szerkezeti vízmolekulákra.

### 2.1.3. A katalízis mechanizmusa

A papain a legismertebb és legszélesebb körben használt cisztein proteáz. A komplett hidroláz aktivitás reakciómechanizmusát 1994-ben írta le Storer és Ménárd. A papain egy széles szubsztrátspecifitású endopeptidáz, amelynek aktív centrumában található aminosav-oldalláncok közül a Cys25 és a His159 a katalízist végzi, míg az Asn175 hidrogén híd kialakításával a His159 optimális pozícióját segíti. A 4. ábra a papain által katalizált peptidhidrolízis mechanizmusát mutatja. A katalízis három fő lépésből áll (Allen és mtsai., 1978): Első lépésben a töltésrelé rendszer His159 aminosav-oldallánca protonot von el a Cys25 SH-csoportjától. A szubsztrát aktív centrumba történő bekötődése után a Cys25 kén atomja nukleofil támadást indít a szubsztrát karbonil-szénatomára. A folyamat során tetraéderes átmeneti állapot jön létre, amelyet az oxianion-üreg aminosav-oldalláncai stabilizálnak. A következő lépésben a peptidkötés felhasad, majd ezután a His159-ről proton helyeződik át a keletkező amin nitrogénjére. A Cys25 pedig tioészter-kötésben tartja a karbonilcsoportot, acil-enzim jön létre. Ezután az amin termék távozik, és egy vízmolekula kerül az aktív centrumba, amelynek protonja a His159-re helyeződik, a hidroxilt pedig a karbonilcsoport köti meg. Az így kialakult karboxil tetraéderes intermedier stabilizálódik az oxianion-üreg aminosav-oldalláncai által, majd a karbonsav termék lehasad, és távozik az aktív centrumból, mely ekkor visszanyeri kezdeti állapotát (Polgár és Halász, 1982).



**4. ábra.** A papain által katalizált peptidhidroláz-reakció mechanizmusa (Rzychon és mtsai., 2004 nyomán).



#### 2.1.4. Az enzim stabilitása

A papain szintézisét követően zimogén (propapain) formában található a növény tejnedv-járataiban (Cohen és mtsai., 1986). Az inaktív állapot fenntartásáért a papain N-terminálisához kapcsolódó, 107 aminosav hosszúságú ún. prorégió felelős. A prorégió nélkülözhetetlen a fehérje érésében és natív térszerkezetének kialakulásában, ugyanakkor nagy affinitású inhibitorként is funkcionál (Taylor és mtsai., 1995). Molekulamodelllezési kísérletekkel és spektroszkópiai módszerekkel kimutatták, hogy ez a polipeptidlánc három  $\alpha$ -hélixet és egy  $\beta$ -redőt tartalmaz. A rendezett másodlagos szerkezeteket hurkok kapcsolják össze, létrehozva egy globuláris harmadlagos szerkezetet. A hurok szerkezetek aminosav-oldalláncai által kötődni képesek a papain szubsztrátkötő helyének S2 és S4 alhelyeihez, meggátolva az enzim szubsztrátkötését (Padilla-Zúniga és Rojo-Domínguez, 1998). A papain katalízise az aktív centrumban található Cys25 oxidálásával reverzibilisen gátolható pl. Na-tetracionát, cisztamin alkalmazásával. Az inaktív állapotból az enzim aktiválása redukálószerrel (2-merkaptoetanol, ditiotreitól) segítségével történhet.

A kristályos enzim nagyfokú stabilitást mutat. A vízben oldott enzim autólízis és oxidáció következtében aktivitásából naponta jelentős mértékben veszíthet, ugyanakkor reverzibilisen oxidált (merkaptopapain vagy 2,2'-dipiridil-papain-származék) formában, NaCl oldatban szuszpendálva, 4 °C-on hónapokig eltartható aktivitásvesztés nélkül. A papain egyik legfigyelemreméltóbb tulajdonsága hőállóképessége. Már régóta ismert, hogy a kristályos papain megőrzi aktivitásának nagy részét három órás 100 °C-os hőkezelés során, de oldatban is jelentős hőstabilitást mutat. Ugyanakkor ellenálló denaturáló ágensekkel szemben, melyek más enzimek konformációjában már kis koncentrációban számottevő változást idéznek elő. A papain megőrzi kezdeti aktivitásának nagy részét 8 M-os urea oldatban is (Sluyterman és de Graaf, 1969; Shapira és Arnon, 1969). 6 M-os guanidin-hidroklorid vagy 10%-os triklórecetsav hatására az enzim irreverzibilisen denaturálódik, elveszti aktivitását, ill. savas körülmények között (< pH 2,8) a papain aktivitása drasztikus mértékben csökken. Drenth és munkatársai (1968) szerint 70 térfogatszázalék (tf%) metanolban nem változik az enzim optikai rotációs képessége, valamint Sluyterman és de Graaf kimutatta, hogy 50 tf% metanolban is megőrzi szerkezetét. Az inaktív enzimet 70 tf% metanolban kristályosítják a maximális hozam elérése érdekében.

### 2.1.5. A papain összehasonlítása más tiol-proteázokkal

A papain enzim több tulajdonságát Kamphuis és munkatársai (1985) hasonlították össze más cisztein proteázokkal. Például a papain és az actinidin tiol-proteázok leginkább aktív centrumuk felépítésében, a szerkezeti vízmolekulák számában, valamint az  $\alpha$ -hélix és az antiparallel  $\beta$ -lemez másodlagos szerkezeti elemek polipeptidvázának szerveződésében hasonlítanak egymásra. Másodlagos szerkezeti elemek hozzák létre a fehérjemolekulák vázát, és ezek kölcsönhatásainak következtében jön létre a molekula térbeli szerkezete. Az aminosav-oldalláncok jelentős mértékben hozzájárulnak a fehérje konformációjának kialakításához. A papain és az actinidin összehasonlításából kiderült, hogy egyes főlánc- és oldallánc-kölcsönhatások révén kialakuló hidrogénkötések konzerváltak. A kutatók ebből arra a következtetésre jutottak, hogy ezek hozzájárulhatnak a molekula nem repetitív részeinek feltekeredéséhez. A két fehérje szerkezetének összehasonlítása alapján megállapítható, hogy a  $\beta$ -lemezekben gazdag R-domén több, az  $\alpha$ -hélixekben gazdag L-domén pedig kevesebb konzervatív elemet tartalmaz. Említést érdemel az is, hogy a papain felszíni aminosav-oldalláncaira kevésbé hatnak a vízmolekulák, mint az actinidinére, mivel a papain hidrátburka kevésbé szabályos és kiterjedt, ami a fehérje aminosav-oldalláncainak nagyobb belső mozgását teszi lehetővé.

Egy másik növényi cisztein proteáz, az ervatamin C másod- és harmadlagos szerkezete szintén nagymértékben hasonlít a papain szerkezetére. Több tulajdonságában is megegyezik a papainnal: aktivitását széles pH-tartományban megtartja, jól viseli a magas hőmérsékletet és a denaturáló szerek jelenlétét is, szubsztrátspecifitása azonban kisebb. Ellentétben a papainnal csak természetes fehérjeszubsztrátokat képes nagy specifikus aktivitással emészteni. A specifitást elsődlegesen meghatározó S2 kötőhely hasonló az ervatamin C és papain esetén, de az S3 alhely egyik apoláros aminosavát (Ala67) egy aromás oldallánc helyettesíti, így hiányzik az a hidrofób kölcsönhatás, amely az S3–P3 stabilizálásáért felelős. Valószínűleg ez az oka annak, hogy az ervatamin a kisméretű szubsztrátokat csak kis aktivitással képes hasítani (Thakurta és mtsai., 2004).

## 2.2. A FEHÉRJESZERKEZET VIZSGÁLATA

A fehérjék szerkezetének vizsgálatára többféle módszer áll a rendelkezésre: röntgen kristallográfia, mágneses magrezonancia (NMR), cirkuláris dikroizmus (CD), vibrációs

cirkuláris dikroizmus (VCD), Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR), fluoreszcencia-spektroszkópia. A röntgen krisztallográfia előfeltétele a kristályos enzim, melynek előállítása sok esetben a mai napig nagy nehézséget jelent a kutatók számára. Az NMR-, CD-, VCD-, FT-IR- és fluoreszcencia-mérésekhez azonban fehérjeoldatok szükségesek, így ezeket a módszereket előszeretettel használják fehérjék szerkezet- és dinamikavizsgálatára.

A papain szerkezetének tanulmányozására egyszerű kivitelezésüknek és nagy érzékenységüknek köszönhetően fluoreszcencia-méréseket és CD-t alkalmaztunk. A fluoreszcencia-jellemzők a következők: abszorpciós színekép, emissziós színekép, fluoreszcencia-hatásfok, gerjesztési színekép és a gerjesztett állapot élettartama (Szalay és Damjanovich, 1983).

Oldatok abszorpciós színeképén az extinkciónak, ill. a belőle számítható abszorpciós koefficiensnek vagy a moláris dekadikus extinkciós koefficiensnek a hullámhossztól, ill. a frekvenciától való függését, emissziós színeképen pedig a kibocsátott fény intenzitását mint a frekvencia függvényét értjük. Alacsony nyomású gázokban figyelhető meg az ún. rezonancia-fluoreszcencia, azaz a gáz ugyanolyan hosszúságú fényt emittál, mint amelyet elnyel. A bonyolult energianívó-rendszerrel bíró molekuláknál azonban az abszorpció az emisszióhoz képest általában rövidebb hullámhossz felé tolódik. Ez azzal függ össze, hogy mind az alap-, mind a gerjesztett állapotban lehetőség van a vibrációs szintek közötti sugárzás nélküli átmenetekre, amelyek miatt az emittált fotonra kevesebb energia marad, mint amennyi a rezonancia esetén lenne. A kvantumhatásfok a másodpercenként emittált és elnyelt fotonok számának hányadosát, az energia-hatásfok pedig az emittált és elnyelt energiák arányát adja meg (Szalay és Damjanovich, 1983).

A fluoreszkáló anyagokról kapható ismeretek fontos forrása lehet a gerjesztési színekép is, mely a fluoreszcencia-színekép valamely adott hullámhosszú helyén észlelt emisszió-intenzitás, a gerjesztő fény hullámhosszának függvényében. A gerjesztési és az abszorpciós színeképek arányosságának eltérése rendszerint arra a következtetésre vezet, hogy a vizsgált rendszer nem egyetlen abszorbeáló komponensből áll, továbbá a komponensek abszorpciós és fluoreszcencia-színeképei, valamint fluoreszcencia-hatásfokai különböznek. A színeképek eltolódásából vagy arányosságából például a komponensek közötti energiatranszferre, ill. annak hatásfokára lehet következtetni.

A szerkezetváltozások a fehérje saját (belső) és fehérje–festék komplex fluoreszcenciájának vizsgálatával követhetők. A fehérje belső fluoreszcenciája a hidrofób magban található aromás

aminosavaknak (Phe, Tyr, Trp) tulajdonítható. A fehérjék fluoreszcencia-spektrumai nem állíthatók elő az azokat felépítő aromás aminosavak színképeinek egyszerű összegzésével. Ez az aromás aminosavak közötti energiatranszferrel és a fluoreszcencia-jellemzőknek a mikrokörnyezet paramétereitől való függésével magyarázható. A fehérjék fluoreszcenciája gyakorlatilag a Tyr- és Trp-oldalláncok emissziójából származik. A szabad Tyr és Trp fluoreszcenciájának kvantumhatásfoka megközelítőleg azonos (0,12), ezzel szemben a Phe kvantumhatásfoka ennél nagyságrenddel kisebb. Fehérjék konformációs vizsgálataira gyakran alkalmaznak olyan külső jelzőket, fluoreszkáló próbákat, amelyek a makromolekulák specifikus helyeire kötődnek. Ezek spektroszkópiai tulajdonságai, valamint a makromolekulával való komplexképződésük disszociációs állandója a kötőhely környezetétől, ill. az ott kialakuló változásokról ad felvilágosítást. A leggyakoribb fluoreszkáló próbák általában a makromolekulák hidrofób helyeihez kötődő aromás vegyületek (ANS, TNS, ezek sztérikus izomerjei stb.). Amennyiben a hidrofób helyek elérhetők, akkor az ANS és a hozzá hasonló vegyületek alkalmasak ezen helyek vizsgálatára. Egy másik fluoreszkáló festék, a fluoreszkamin pedig primer aminokkal kovalens kötést képezve válik fluoreszkálóvá.

A szerkezetváltozásról fontos információval szolgálnak az emissziós spektrumok intenzitásmaximumai, azok eltolódása rövidebb, ill. hosszabb hullámhossz felé, a spektrumok félértékszélessége (ami az emissziós maximum feléhez tartozó hullámhossz-tartományt jelenti), a fehérje aromás aminosavai és a fluoreszcens festékmolekulák közötti energiaátadás hatékonysága, a fluoreszcencia életideje, a polarizációs fok és a kötésszám.

A fluoreszcencia-maximum ( $\lambda_{\max}$ ) eltolódásának mértéke meglehetősen érzékeny a kromofór molekulák mikrokörnyezetére. Például az erőteljesen fluoreszkáló Trp aminosav  $\lambda_{\max}$  értéke 308–355 nm közötti tartományban lehet, és ez az érték mindig az aktuális oldószer-kromofór kölcsönhatásoktól függ. A Trp aminosavnak két állapota lehetséges  $^1L_a$  és  $^1L_b$ , az előbbi az aminosav fluoreszkáló állapotára utal. A közelükben elhelyezkedő töltések befolyásolhatják a  $\lambda_{\max}$  értéket: ha a pozitív töltések a benzol-gyűrű felőli oldalon vannak, a hosszabb hullámhossz felé; amennyiben a pirrol-gyűrű felőli oldalon találhatóak, a rövidebb hullámhossz felé tolódik el. Negatív töltések esetén a jelenség fordítottját tapasztaljuk. Az eltolódás mértéke a töltés távolságától függ (Vivian és Callis, 2001).

A kiroptikai módszerek egyik legismertebb válfaja a cirkuláris dikroizmus (CD). A kiroptika kifejezés arra utal, hogy az anyag és a cirkulárisan polarizált fény két formája, a jobbra

és balra cirkulárisan polarizált fény közötti kölcsönhatás különbözik egymástól. Az optikailag aktív közegben a lineárisan polarizált fény két komponense különböző sebességgel terjed (vagyis különböző a törésmutatója), ill. különböző mértékben abszorbeálódik. A két jelenség abban nyilvánul meg, hogy a közegből kilépő fény polarizációs síkja elfordul a belépőjéhez képest — ez az optikai forgatás — és áthaladás közben elliptikusan polarizálttá válik. Az ellipticitás hullámhosszfüggése a CD (Perczel és mtsai., 1994).

A fehérjék elektron-CD-spektruma általában három részre tagolható: a távoli-UV- (250 nm alatt), a közeli-UV- (250–300 nm) és a közeli-UV-vis-tartomány (300–700 nm), amelynek mindegyike a fehérje megfelelő kromofórával hozható kapcsolatba. A távoli-UV-CD közvetlen információt szolgáltat a királis környezetben lévő amid kromofórok, a peptidgerinc térbeli elhelyezkedéséről. A módszer fehérjék röntgenkristallográfiai adatainak statisztikai analízisének alapul. Az  $\alpha$  típusú fehérjék (pl. hemoglobin, mioglobin) egy jellegzetes  $\alpha$ -hélix spektrummal rendelkeznek, 208 és 222 nm-nél negatív maximummal, és 190–195 nm között egy pozitív sávval. Ezeknél a fehérjéknél a görbe 172 nm alatt metszi az  $x$  tengelyt. Az  $\alpha+\beta$  fehérjéknek (pl. lizozim, papain) szintén az  $\alpha$ -hélixre jellemző spektruma van, azonban az  $x$  tengelyt a görbe 172 nm fölött metszi. A  $\beta$  fehérjék CD-spektruma változatos lehet: 210–220 nm között egy negatív sávval (pl. szuperoxid-dizmutáz) vagy 200 nm-nél egy negatív és 185–190 nm körül pozitív jellel (pl.  $\alpha$ -kimotripszin, elasztáz). A 250–300 nm tartományban mért CD-jel az oldalláncok (aromás és diszulfid) hozzájárulásának köszönhető, és érzékenyen reagál a fehérje harmadlagos szerkezetére. A 300 nm felett megjelenő CD-sávok olyan fehérjék esetében mérhetők, amelyek ebben a tartományban abszorbeáló prosztetikus csoportot tartalmaznak (pl. hem-, flavo-, vas-kén-fehérjék), és ezeknek a csoportoknak a környezetében lejárló konformációs változásokról adnak felvilágosítást (Hollósi és mtsai., 2004).

### 2.3. BOKATALÍZIS SZERVES OLDÓSZERES KÖZEGBEN

Napjainkban az enzimeket egyre szélesebb körben alkalmazzák az ipar számos területén szerves közegű szintéziseknél, valamint a klinikai diagnosztikában és a biokémiai analitikában (Kirk és mtsai., 2002). Az elmúlt néhány évtizedben a hagyományos közegű felhasználások mellett az enzimek nem hagyományos közegű alkalmazási lehetőségei is teret nyertek. Nem hagyományos közegnek tekintjük azokat, amelyek főleg szerves anyagokat (pl. oldószerek), szuperkritikus folyadékot tartalmaznak, vagy esetleg azokat, melyek gáz-halmazállapotú

reakcióközeget jelentenek (Adlercreutz, 1994). Leggyakrabban különböző szerves oldószereket használnak a nem hagyományos biokatalitikus folyamatok vizsgálatára, mivel felhasználásuknak több előnye is van (Gupta, 1992; Katchalski-Katzir, 1993):

1. Kis víztartalom mellett a hidrolitikus reakciók egyensúlya ellenkező irányba tolódhat, így szintézisek valósíthatók meg.
2. Bizonyos reakciók jobb hatásfokkal mennek végbe, mint vizes közegben.
3. Nem kell számolni mikrobiális fertőzés veszélyével.
4. Nincsenek melléktermékek.
5. Egyes vegyületek esetén kontrollálható az enzimek enantio- és régiószelektivitása.
6. Szerves oldószeres rendszerekben a hidrofób szubsztrátok oldékonysága nő.
7. A szerves oldószerből számos termék olcsón és könnyen kinyerhető, és az enzimek hőstabilitása is fokozódhat a kevés vizet tartalmazó rendszerekben.

A számos előny mellett a szerves oldószerek alkalmazásának hátránya, hogy az oldószer enzim szerkezetére kifejtett hatása gyakran kedvezőtlen az enzim katalitikus aktivitására, stabilitására. Az enzimek stabilitása és stabilizálása komplex probléma, mivel sok másodlagos kötés tehető érte felelőssé, és általános szabály hiányában a stabilizálás is csupán empirikusan közelíthető meg.

### 2.3.1. A víz szerepe

Az enzimek aktív konformációjának fenntartásában, a fehérje flexibilitásának biztosításában nélkülözhetetlen szerepe van a víznek. Valamennyi víz minden enzim működéséhez szükséges, de ennek mennyisége változó. Szerves oldószeres közegben egyes lipázok működésükhöz csak kismennyiségű vizet (<0,3%) igényelnek, míg más enzimek optimális aktivitásukat valamivel magasabb víztartalomnál (2–13%) érik el (Chojnacka és mtsai., 2007). A víz és a szerves oldószer aránya, megoszlása a rendszerben, a polaritási viszonyok jelentősen befolyásolják az enzim működését. A szerves oldószert tartalmazó rendszerek bemutatása során meg kell említeni az ún. termodinamikai vízaktivitás ( $a_w$ ) fogalmát, amely alatt azt a vízmennyiséget értjük, ami az adott rendszerben az enzimhez kötődik. A rendszer  $a_w$  értéke 1 és 0 között változhat. Vízmentes rendszerben értéke 0, míg tiszta vizes közegben 1. Az  $a_w$  értéke általában nem egyezik meg számszerűen a vízkoncentráció értékével, ugyanis a

reakcióelegyben levő összes fázis vízáktívátása azonos lehet egyensúlynál, még ha vízkonzentrációjuk különböző is lesz (Bell és mtsai., 1995). Ha az enzimreakciókat különböző közegben végzik rögzített  $a_w$  értéknél, a biokatalizátorhoz kötött víz mennyisége ugyanannyi lesz. Kis vízáktívátás mellett a rendszerben jelen lévő szerves oldószer csak kismértékben hat a fehérje és az ahhoz kötődő víz közötti kölcsönhatásokra, ennek következtében az oldószer-molekulák csak kismértékben hatolnak át az enzim hidrátburkán (Halling, 1990). Amíg az apoláros oldószer nem változtatják meg az enzimhez kötődő vízmolekulák számát, addig a polárosok csökkentik azt, feltehetően azért, mert leszorítják a másodlagos hidrátburkot kialakító víz egy részét a fehérje felszínéről (László, 2002).

Az oldószer tulajdonságai sokféle paraméterrel (Hildebrand oldhatósági állandó, dielektromos állandó, dipólus momentum, megoszlási hányados logaritmus stb.) jellemezhető. A szerves oldószeres biokatalízisekben az enzimműködéssel talán legjobban összefüggő paraméter az oldószer hidrofób jellegének jellemzésére szolgáló log P (megoszlási hányados logaritmus), ahol a  $P$  az oldószerre vonatkozó megoszlási hányados az 1-oktanol és a víz között (Castro, 1999):

$$\log P = \log \frac{[\text{oldott anyag}]_{1\text{-oktanolban}}}{[\text{oldott anyag}]_{\text{vízben}}} \quad (1)$$

Az enzimek általánosan jellemző tulajdonsága az enantioszelektívátás, és képesek megkülönböztetni az adott molekulán belüli funkciós csoportokat is, amit régiószelektívátásnak hívunk. Klibanov és munkatársai (1989) az enantioszelektívátást vizsgálták, és kimutatták, hogy az fordítottan arányos az oldószer hidrofób jellegével, azaz a  $\log P$ -vel.

Az oldószeret három csoportba lehet sorolni  $\log P$  értékük alapján (Laane és mtsai., 1985):

1. Azok az oldószer, melyeknek vízben való oldékonysága  $> 0,4\%$  ( $\log P < 2$ ).
2. Vízben kevésbé oldódó oldószer (0,04–0,4%), ezekre  $2 < \log P < 4$  jellemző.
3. Apoláros oldószer, melyek gyakorlatilag nem oldódnak vízben,  $\log P$  értékük  $> 4$ .

Megállapították, hogy vízmentes közegben összefüggés van a szerves oldószer  $\log P$  értéke és az adott oldószerben működő enzimek katalitikus aktivitása között. A  $\log P < 2$  oldószer általában nem nagyon alkalmasak biokatalitikus folyamatokban, mert jelentősen és kedvezőtlenül módosítják az alapvető víz–enzim kölcsönhatásokat, s ezáltal inaktíválják az enzimet. Azok az oldószer, melyekre  $2 < \log P < 4$  érték jellemző, kevésbé hatnak víz–enzim kölcsönhatásokra,

ezért alkalmasabb közegek. Míg azok az oldószerek, amelyek  $\log P$  értéke  $> 4$  általában nem vagy csak kismértékben befolyásolják az enzim hidrátburkát, így az enzimet aktív állapotban tartják, s emiatt enzimátikus reakciók közegének igen alkalmasak lehetnek (Reslow és mtsai., 1987).

Vizet is tartalmazó közegben viszont a nagy  $\log P$  értékű szerves oldószerek (etilacetát, benzol, széntetraklorid) kedvezőtlen hatásúnak bizonyultak katalízis szempontjából (Fan és mtsai., 2001). Kétfázisú rendszerekben az enzimek stabilitása függ a szerves oldószer jellemzőin túl a szerves és a vizes fázis arányától, a fázishatár nagyságától és a hőmérséklettől. Ross és munkatársai (2000) vízzel nem elegyedő tridekánt tartalmazó közegben vizsgálták számos szerin proteáz stabilitását. A kétfázisú rendszerekben — amelyekben a szerves oldószer komponens nagy  $\log P$  értékű — a vizsgált enzimek inaktiválódtak. A fázishatáron ugyanis az enzim molekulák adszorbeálódni képesek, hidrofil részükkel a vizes fázis, hidrofób oldalláncaikkal pedig az apoláros szerves oldószer felé fordulva. Ennek következtében az enzim molekulák szerkezete torzulhat, jelentős katalitikus aktivitás csökkenést eredményezve.

A nagy  $\log P$  értékű szerves oldószerek további hátránya lehet, hogy bennük a szubsztrát molekulák egy része kevésbé oldódik. Tehát a szerves oldószeres közegű biokatalízisben kompromisszumot kell kötni az oldószerek kiválasztása szempontjából polaritás tekintetében is.

### 2.3.2. Szerves oldószeres közeg hatása az enzimek szerkezetére

Fitzpatrick és munkatársai (1993) kristályosított proteáz szerkezetét tanulmányozták szerves oldószeres közegben. Modellként egy jól ismert, szerves szintézisekben gyakran használt alkalikus proteáz, a szubtilizin szolgált. Az enzimet vizes közegben kristályosították, majd a kristályokat áthelyezték acetonnitriles közegbe, és vizsgálták a vízzel elegyedő poláros szerves oldószer hatását az enzim szerkezetére. A szerves oldószeres közeg nem eredményezett jelentős szerkezetváltozást, csupán 5 aminosav-oldallánc pozíciójában történt  $0,91 \text{ \AA}$ -nél nagyobb eltérés. A katalitikus triád aminosav-oldalláncaiban pedig mindössze  $0,1\text{--}0,2 \text{ \AA}$  változás történt. Az enzimhez kötődő vízmolekulák számának változását is kimutatták. Vizes közegben a natív szubtilizinhez 119 vízmolekula kötődik. Ehhez képest acetonnitrilben a kötött vízmolekulák száma 99-re csökkent, és 12 szerves oldószer molekula kapcsolódása is kimutatható volt. Igazolták azt is, hogy az acetonnitrilmolekulák többféleképpen kötődhetnek a szubtilizinhez. A 12 kötött



acetonitrilmolekulából egy hidrogénhídon keresztül helyettesített egy korábban ugyanahhoz a helyhez kötődő vízmolekulát, 3 más kölcsönhatást létesített korábbi vízmolekula-kötőhelyekkel, 8 pedig nem vízmolekula-kötőhelyhez kapcsolódott. A kötött acetonitrilmolekulák közül 4 az enzim aktív centrumához kapcsolódott.

A vízmolekulák jelenlétének fontos szerepe van az enzimek szerkezetének, flexibilitásának és működésének fenntartásában, ezért szerves oldószeres közegben is szükséges valamennyi vízmolekula jelenléte az enzimek funkciójának fenntartásához. Yang és munkatársai (2004) molekuladinamikai szimulációkkal modellezték a szubtilizin szerkezetét, flexibilitását és dinamikáját nanoszekundumos időintervallumban vizes és szerves oldószeres közegben. Szimulációik során nem tapasztaltak jelentős eltérést a vizes és a szerves oldószeres közegű enzimszerkezetben. A közeg polaritása döntőnek bizonyult az enzim működése szempontjából. A polárosabb szerves oldószeres hatására nagymértékben csökkent a fehérje felületéhez kötődő vízmolekulák száma. Eredményeik azt mutatták, hogy a polárosabb karakterű tetrahidrofurán és acetonitril molekulák leszorítják a mobilis és gyengén kötődő vízmolekulákat az enzim felszínéről, melyek jelenléte fontos a szubtilizin működéséhez. Ezzel szemben az apoláros oktán jelenlétében jóval hidratáltabb állapotban maradt az enzim, ui. több gyengén kötődő vízmolekula volt jelen az enzim aktív centrumában.

### 2.3.3. Enzimek gyakorlati alkalmazása

Az utóbbi időben egyre nagyobb figyelmet szentelnek a szerves közegű szintéziseknek, elsősorban az aminosavak, aminosav-származékok (aminosav-észterek, *N*-acil-aminosavak) peptidek nem hagyományos, enzimatiszintézisének. Az enzimek szintézisékre való alkalmazása rendkívül előnyös, mert a komplex, polifunkciós molekulák szintézisénel felmerülhetnek olyan problémák, amelyek a klasszikus eljárásokkal nem vagy nem elég hatékonyan oldhatók meg (racemizáció, kémiai szelektivitás stb.). Megfelelő enzimek alkalmazása kemo-, régió- és enantioszelektív átalakulást tesz lehetővé, enyhe reakciókörülmények alkalmazása mellett, valamint nem kell oldalláncvédelemről és annak eltávolításáról gondoskodni. Ezenkívül használatukkal megelőzhető az aktiválószeres használata, és gazdaságosabbá tehető a folyamat. E folyamatokhoz célszerű rögzített vagy módosított enzimforma alkalmazása, hiszen így magas katalitikus aktivitás, jobb stabilitás elérésére van lehetőség.

Enzimeket szerves kémiai szintézisekben gyakran használnak önmagukban vagy más enzimekkel kombinálva egészen bonyolult molekulák előállítására akár nem természetes szubsztrátokból is. Egyes molekulák szintézise kizárólag biokémiai módszerekkel valósítható meg, kémiai alternatívákkal nem állíthatók elő. Például nagyméretű RNS és DNS molekulák hatékonyan enzimek felhasználásával szintetizálhatók, módosíthatók. Másrészt biomolekulák alkalmazása a kémiai vegyszereknél jóval kevésbé károsítja a környezetet. Enzimtechnológiai kutatások eredményei mára sokféle lehetőséget kínálnak az ipar számos területén különféle biológiailag aktív molekulák szintézisére (Koeller és Wong, 2001). Például penicillin G aciláz segítségével több lépésben új  $\beta$ -laktám antibiotikumok szintetizálhatók, vagy lipáz és egyéb enzimek felhasználásával a rákbetegségek kezelésében használt taxol *in vitro* létrehozható.

A papain az egyik leggyakrabban használt növényi proteáz a sörgyártásban, a sütő- és élelmiszeriparban, a húsiparban, de találkozhatunk vele tisztítószerekben, valamint a kozmetikai- és gyógyszeriparban is (Walsh, 2002). Ezenkívül a papain sikeresen alkalmazható bioaktív molekulák szintézisére, mint például peptidek, aminosav-alkil-észter-származékok, aminosav-észterek és szénhidrát-származékok előállítására (Clapés és mtsai., 1999; Li és mtsai., 2006; Liu és mtsai., 2002; Morcelle és mtsai., 2006).

A tripszin, termolizin,  $\alpha$ -kimotripszin, papain és szubtilizin gyakran használt enzimek hormonhatású peptidek (angiotenzin, caerulein, enkefalin, oxitocin, dinorfin) preparatív szintézisében. Liu és munkatársai (2002) csontnövekedést serkentő pentapeptid prekursor (Z-Tyr-Gly-Phe-Gly-Gly-etilészter) szintézisét végezték három proteáz felhasználásával. Két egymástól független enzimátikus úton is megszintetizálták a prekursor észtert három lépésben. Az egyiknél  $\alpha$ -kimotripsint és termolizint, míg a másikonál a kimotripszin mellett papaint használtak a termék előállításához.

Mitin és munkatársai (1996) kísérleteikben a papainnal aminosav- és peptid-gliceril-észtereket szintetizáltak glicerint tartalmazó kis víztartalmú rendszerekben, kihasználva az enzim hőstabilitását. Kiindulásul aminocsoport védett aminosavakat használtak. Az enzim széles szubsztrát-specifitást mutatott, ui. a prolin kivételével gyakorlatilag az összes aminosav alkalmasnak bizonyult az észterszintézisben. A legjobb kitermelést az Ala és a Val-Ala dipeptid glicerilészterének szintézisének érték el. NMR spektroszkópiai mérésekkel megvizsgálták az alanil-glicerilészter termékek szerkezetét is, melyből kiderült, hogy egy aszimmetrikus

szénatommal rendelkező racém keletkezett nagyobb arányban. A kutatók a glicerinen kívül más polioloikkal is próbáltak észtereket szintetizálni, ezek a kísérletek azonban nem jártak sikerrel.

Polietilénglikollal (PEG) módosított enzimek aktivitását Sakurai és munkatársai (1990) vizsgálták szerves oldószeres közegben. Kísérleteik során a módosított papain megőrizte kezdeti aktivitásának 70%-át. A módosított enzim széles szubsztrátspecifitással rendelkezett, ui. az enzimmel számos tripeptidet magas hozammal tudtak előállítani a kutatók. Más módosított enzimekkel is hasonló eredményeket értek el, amelyek közül a módosított pepszin őrizte meg leginkább aktivitását. A PEG<sub>4000</sub> hatását terc-butiloxikarbonil-glicil-aszparaginsav- $\alpha,\beta$ -dibenzilészter szintézisben is vizsgálták, katalizátorként papaint használva. A szintézist vízzel elegyedő és nem elegyedő metanol, dioxán, dimetil-formamid, dimetil-szulfoxid, tetrahidrofurán, etilacetát, kloroform, triklóretán szerves oldószerekben próbálták. Az oldószeresek közül főként a vízzel nem elegyedők voltak alkalmasak a dipeptidészter előállítására. Kimutatták azt is, hogy a szintetikus reakció sebessége kétszeresére nőtt polietilénglikol hatására (Hirano és mtsai., 1991)

Lozano és munkatársai (1993) tripeptideket szintetizáltak papainnal különböző polioloikat tartalmazó közegben, és vizsgálták a polioloik hatását az enzim hőstabilitására is. Eredményeik alapján megállapították, hogy az adalékanyagok növelik az enzim élettartamát molekulatömegük és koncentrációjuk függvényében. Polioloik jelenlétében a Gly-Gly-PheNH<sub>2</sub> termék kitermelése is fokozódott.

Morcelle és munkatársai (2006) a papain szintetikus aktivitását hasonlították össze egy másik növényi cisztein proteázzal, a funastrainnal. Immobilizálás után az enzimekkel peptidésztereket állítottak elő acetónitriles és etilacetátos közegben, és tanulmányozták a kitermelés hatékonyságát. A funastrain specifitása nagyobb volt, konverzióban azonban elmaradt a papaintól.

Szabalski és munkatársai (2001) a dimetil-szulfoxid papainra gyakorolt hatását vizsgálták. Szubsztrátként fluorogén aminosav-származékot (DabcyL-Lys-Phe-Gly-Gly-Ala-Ala-Edans) használtak, mely önmagában nem, azonban enzimatis hasítást követően jó hatásfokkal fluoreszkál. Eredményeik alapján megállapították, hogy a szervesoldószer-koncentráció növelésével és az idő függvényében az enzim katalitikus hatékonysága csökken. Megvizsgálták más szerves oldószeres (metanol, etanol, dimetil-formamid stb.) hatását is, melyek a dimetil-szulfoxidban tapasztaltakhoz hasonló eredményt mutattak.

Az aktív centrum módosításával „mesterséges” enzim állítható elő, melynek funkciója és szelektivitása eltérhet a natív enzimétől. Panella és munkatársai (2005) a papain katalitikus ciszteinjét (Cys25) módosították monodentát-foszfít–Rh(COD)<sub>2</sub>BF<sub>4</sub> komplex alkalmazásával. A módosított enzim elvesztette hidrolitikus aktivitását, viszont új funkciót nyert, redox enzimként működött, nagy nyomás alatt metil-2-acetamidoakrilsav redukálására volt képes.

## 2.4. ENZIMEK STABILITÁSA ÉS STABILIZÁLÁSA

A stabilitás fenntartásában nagy szerepük van a fehérjék szerkezetét összetartó másodlagos kötések (hidrogén, ionos, van der Waals, hidrofób) és a proteint körülölelő hidrátburok intaktságának. Az enzimek kémiai technológiai, biokémiai analitikai és ipari alkalmazásának feltétele, hogy a felhasznált biokatalizátor hosszú ideig nagy hatékonysággal működjön nem optimális körülmények között is, ezért szükséges az enzimek aktivitásának növelése, stabilizálása. Az enzimek stabilitásának fokozására számos lehetőség van. Növelhető a stabilitás a fehérjemolekulák (enzimkristályok) keresztkötésével, rögzítéssel, kémiai és genetikai módosítással, liofilizálással, adalékanyagok használatával, stb.

### 2.4.1. Enzimek rögzítése

Enzimek rögzítésének többféle módja lehet: rögzíthetjük az enzimet hordozóhoz, bezárhatjuk az enzimet szerves vagy szervetlen polimer gélbe, ill. kémiai keresztkötést is alkalmazhatunk. A hordozóhoz rögzítés gyakran enzimaktivitás-vesztéssel jár. Ezzel szemben az enzimkristályok bifunkciós keresztkötő reagenssel történő összekapcsolása általában kedvező az enzimaktivitásra (Sheldon, 2007). Glutáraldehides keresztkötés során azonban néhány enzim (pl. nitriláz) aktivitáscsökkenése tapasztalható (Mateo és mtsai., 2004). A 90-es évek elején keresztkötött termolizin kristályok létrehozásával új lehetőség nyílt enzimek stabilizálására (St. Clair és Navia, 1992). A módszer hatékonyabbnak bizonyult hődenaturációval, szerves oldószerekkel és proteolízissel szemben a szolubilis és a liofilizált enzimmél. Az eljárás egyedüli hátránya, hogy kristályos enzimet igényel, amelynek előállítása a mai napig nehézségekkel járhat. Ugyanakkor például a keresztkötött penicillin G amidáz kristályok igen hatékonyak bizonyultak  $\beta$ -laktám antibiotikum szintézisében (Cao és mtsai., 2001).

Wang és munkatársai (1997) kimotripsint és szubtilizint immobilizáltak polimetilmetakriláthoz, sztirénhez, vinil-acetáthoz és etil-viniléterhez. Vizes közegben az enzimkonjugátumok hasonló katalitikus aktivitást mutattak, mint a natív enzim. Sőt a konjugált

proteázok szerves oldószerekben (tetrahydrofuran, dioxán és acetonitril) is megőrizték enzimaktivitásukat, ellentétben a natív enzimekkel, melyek inaktiválódtak ebben a közegben.

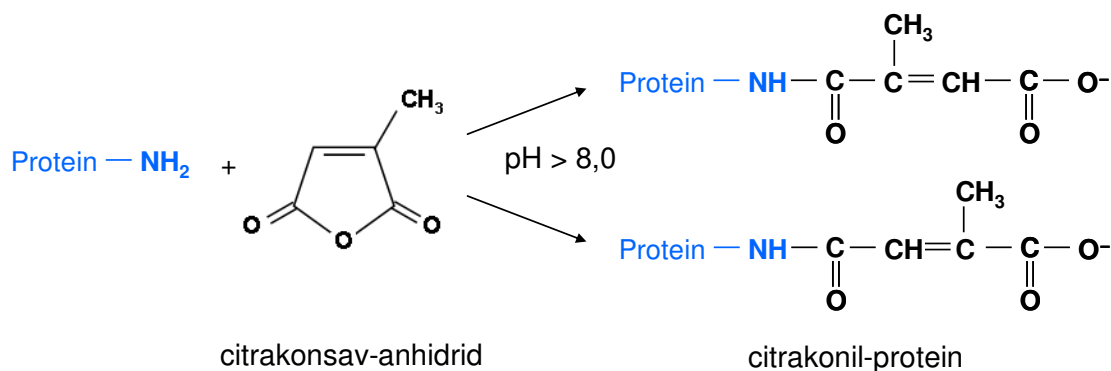
#### 2.4.2. Kémiai módosítás

Enzimek aminosav-oldalláncainak kémiai módosítása nagy lehetőséget nyújthat az enzimtechnológia fejlődésében, csoportspecifikus és aspecifikus kémiai módosításokkal. A nem specifikus eljárás előnye, hogy gyakorlatilag végtelen sokféle enzimforma hozható létre egy enzimből. Hátránya, hogy az egyes fehérjemolekulák nem mindig ugyanazokon a helyeken módosulnak, és a módosulás mértéke is különböző lehet, tehát a kémiai módosítás heterogén enzimpopulációt eredményez. Szekvensspecifikus módosítások során a fehérje egy kitüntetett aminosav-oldallancán (pl. aktív centrum) végeznek módosítást (Panella és mtsai., 2005).

Módosíthatjuk az enzimeket a molekula felszínén vagy annak belsejében. A módosítószer kapcsolódhat másodlagos kötésekkel, például egyes polimerek (polietilén-oxid, PEG, dextrán) hidrogénhidat képezhetnek a fehérjék felszínével, kötött vízmolekulákkal. A módosítás történhet kovalens kötés kialakítása (aldehidek, anhidridek, diaminok, foszfátcsoportok bevitelle, stb.) révén is (Castillo és mtsai., 2008; Roig és Kennedy, 1992). Az enzimek belső szerkezetének módosítása során befolyásolhatók a kinetikai paraméterek, de a katalitikus hely módosításával megváltoztatható az enzim specifitása is (Panella és mtsai., 2005).

##### 2.4.2.1. Fehérjék acilálása karbonsav-anhidridekkel

Kémiai módosítószer alkalmazásával változtatható az enzimek oldékonysága, stabilitása és specifitása. Szerves savanhidrideket széles körben használnak enzimek reverzibilis módosítására (Fágáin, 2003). Az anhidridek lúgos pH-n stabil kovalens kötés létesítésével reagálni képesek fehérjék primer aminocsoportjaival (5. ábra). Alkalikus körülmények között az anhidridek hidroxil- és imidazolcsoportokkal is reagálhatnak, azonban ezek a csoportok általában kevésbé stabilak, és már lúgos kémhatáson disszociálnak (Freedman és mtsai., 1968). Nagyobb problémát jelentenek a tiolcsoportok, melyek szintén acilálhatók például maleinsav-anhidriddel (Smyth és mtsai., 1964). A módosulás mértéke és a komplex stabilitása nagymértékben függ az anhidrid kémiai tulajdonságaitól, valamint a módosítás és a tárolás körülményeitől. Amíg pl. a borostyánkősav-anhidrid reakciója primer aminnal stabil származékot eredményez lúgos és savas pH-n egyaránt, és a szukcinil-oldallanc csak extrém körülmények között (6N HCl oldatban 100



**5. ábra.** Karbonsav-anhidridek reakciója fehérjék primer aminocsoportjával.

°C-on) hasad le, addig pl. a maleil-származékok csak alkalikus közegben stabilak, savas közegben, 37 °C-on a maleilcsoportok lassú disszociációja figyelhető meg (Butler és mtsai., 1969).

A kémiai módosítások befolyásolhatják az enzimek szerkezetét is. Távoli-UV-CD-mérésekkel kimutatták, hogy vizes oldatban a kimotripszin–spermin komplex másodlagos szerkezete nem tér el jelentősen a kontroll enzimétől, etanolos közegben azonban a komplex nagyobb konformációstabilitást mutat (Kudryashova, 2003). A maleil- és citrakonil-torma-peroxidáz stabilitás növekedésének hátterében az aromás aminosav-oldalláncok pozícióváltozása áll (Liu és mtsai., 2006). Glükóz-oxidáz citrakonsav-anhidrides módosítása kismértékű változást eredményezett az enzim másodlagos és nagyobbab a harmadlagos szerkezetében (Mossavarali és mtsai., 2006). Valószínűleg a kémiai módosítás ún. „megolvadt gömböcske” szerkezetet eredményezett megváltoztatva az enzim térszerkezetét, érintetlenül hagyva a másodlagos szerkezeti elemeket (Hosseinkhani és mtsai., 2004).

Az enzimek aktivitásának és stabilitásának fokozása az egyik leggyakoribb célja a kémiai módosításoknak. A módosítások hatással lehetnek az enzimek kinetikai paramétereire. Például a ftálsav-anhidriddel módosított torma-peroxidáz a hidrogén-peroxid szubsztrátot nagyobb affinitással kötötte, és szerves oldószeres közegben nőtt az enzim katalitikus hatékonysága a natív torma-peroxidázhoz képest. A módosítás hatására változott az enzim konformációja is (Song és mtsai., 2005). Egyes *Bacillus*  $\alpha$ -amilázok és a torma-peroxidáz citrakonsav-anhidrides módosításával növelhető volt az enzimek hőstabilitása, aktivitása. A módosított  $\alpha$ -amiláz aktivitása 10 perc inkubálás után 80 °C-on kb. 40%-kal nagyobb volt a kontrollénál, míg a

módosított torna-peroxidáz 50 perces inkubálást követően 70 °C-on is még kb. 35%-kal aktívabbnak bizonyult a nem módosított enzimnél (Khajeh és mtsai., 2001; Hassani és mtsai., 2006).

Az enzimek általában íztelenek, azonban néhányuk (pl. lizozim, monellin, pentadin) édes ízű. A lizozim ízét a fehérje felületén található lizil-oldalláncok eredményezik. Amennyiben ezeket az oldalláncokat ecetsav-anhidrid segítségével módosították, megszűnt a fehérje édes íze. Az acetilcsoport eltávolításával azonban visszatért a fehérje édessége (Masuda és mtsai., 2005).

Fehérjék primer aminocsoportjaival, lizil-oldalláncaival az anhidridek mellett aldehidek, szulfonsavak, ditioészterek és egyéb aktivált elektrofilek is reagálhatnak (Vinogradov és mtsai., 2001; Davis, 2003). Kudryashova és munkatársai (2003) különböző szénatomszámú oligoaminokkal módosították az  $\alpha$ -kimotripszin szerkezetét. A módosítás eredményeként nőtt az enzim aktivitása, másrészt a módosított kimotripszin stabilabb volt a kontroll enzimnél még a nagy etanol koncentrációknál is. *Fusarium* glükóamiláz etilén-diaminnal történő módosítása pedig jelentősen növelte az enzim katalitikus aktivitását és hőstabilitását (Bhatti és mtsai., 2007).

#### 2.4.2.2. Fehérjék glikálása

A fehérje–szénhidrát komplexek kialakulása egy lassú kémiai reakció (Maillard-reakció), amely során a redukáló cukrok kovalens kötéssel kapcsolódni képesek fehérjék primer aminocsoportjaihoz, lizil-oldalláncaihoz. Elsődleges termékül Schiff-bázis jön létre, melynek kialakulása percekben belül megtörténik, több óra elteltével a Schiff-bázis ketoaminná alakul ún. Amadori-átrendeződéssel, majd végül egy stabil előrehaladott glikációs végtermék (Advanced Glycation Endproduct, AGE) képződik (Horvat és mtsai., 1997; Watkins és mtsai., 1985). A különféle szénhidrátok reakciósebessége eltérő lehet, attól függően, hogy az oldatban milyen arányban vannak jelen nyílt, illetve gyűrűs formában. Jellemző, hogy az aldózok általában nagyobb reaktivitást mutatnak a ketózoknál (Bunn és Higgins, 1981).

Az emberi szervezetben több káros hatást lehet az AGE-knek tulajdonítani, elsősorban a kollagén (és más fehérjék) keresztkötésekkel való rögzítését, oldhatatlanná válását. Szerepet játszanak a cukorbetegség okozta veseelégtelenség kialakulásában is (Peppas és mtsai., 2003). Ugyanakkor az AGE-k kötődhetnek a sejteken található receptorokhoz (RAGE), és szabad gyökök, proteolitikus enzimek túltermelését idézik elő. Ezek a reakciók fontos szerepet játszanak

a felnőttkori diabéteszben, a különféle érrendszeri betegségek, az Alzheimer- és a Parkinson-kór kialakulásában is (Reddy és Beyaz, 2006).

### 2.4.3. Enzimek genetikai módosítása

Genetikai módosítással növelhető a fehérjék, enzimek stabilitása. Alkalmazhatunk szekvenszificus mutagenézist, ahol az enzim háromdimenziós modellje alapján kiválasztott aminosav-oldalláncok más aminosavra cserélésével nyílik lehetőség a stabilitás növelésére (Polizzi és mtsai., 2007). Például a tetramer *Aerococcus viridans* tejsav-oxidáz szekvenszificus mutációjával növelték az egyes alegységek közötti kölcsönhatások erősségét, aminek következtében nőtt az enzim hőstabilitása is (Kaneko és mtsai., 2005). Egyre elterjedtebb az ún. random mutagenézis és rekombináció alkalmazása, amely nagyszámú enzimvariánst állít elő egyetlen enzimből. Például a xilanáz enzimre genetikai könyvtárat hoztak létre az összes lehetséges variációt kipróbálva, azzal a céllal, hogy növeljék az enzim hőstabilitását. Kilenc aminosavat találtak fontosnak a stabilitás fenntartása szempontjából (Palackal és mtsai., 2004). Bioinformatikai módszerek, homológok keresése nyújthat további támogatást, lehetőséget a genetikai módosítások eredményességéhez.

### 2.4.4. Szerves ozmolitok szerepe a fehérjék stabilizálásában

Azokat a kisméretű szerves molekulákat, amelyek kovalens kötések kialakítása nélkül, jelentősen képesek befolyásolni a fehérjék stabilitását, aggregációját és feltekeredését a denaturáló stresszhatásokkal szemben, szerves ozmolitoknak nevezzük. Az ozmolitoknak kettős szerepe van: egyrészt denaturáló körülmények között fokozzák a natív fehérje termodinamikai stabilitását, ugyanakkor stabilizálják az enzimfehérjék működését is, anélkül, hogy befolyásolnának más celluláris folyamatokat vagy molekuláris kölcsönhatásokat (Athawale és mtsai., 2005). Az ozmolitok feltehetőleg másodlagos kötések révén lépnek kölcsönhatásba a fehérjékkel, és fejtik ki hatásukat azok szerkezetére (Tams és Welinder, 1996). A szerves ozmolitokat funkció szempontjából két csoportba sorolhatjuk: beszélhetünk a natív fehérjeszerkezet fenntartását elősegítő, védő funkciójú ozmolitokról, melyek nélkülözhetetlenek a sejtek vitalitásában a különféle károsító környezeti hatásokkal szemben; ugyanakkor léteznek ún. denaturáló ozmolitok is, melyek a natív szerkezet instabilitását idézik elő (Record és mtsai., 1998; Haque és mtsai., 2006). Kémiai szerkezetük alapján a természetben is előforduló szerves



ozmolitok lehetnek aminosavak, aminosav-származékok, metilaminok és poliolok. Mikroorganizmusokban a poliolok és szabad aminosav-származékok mint védő hatású ozmolitok biztosítják a sejt túlélését pl. nagy hőingadozású, száraz vagy magas sókoncentrációjú környezetben (Wang és Bolen, 1997). Denaturáló hatású ozmolit például az urea, amely porcos vázú tengeri halak szerveiben nagy koncentrációban halmozódik fel, de negatív hatását amintartalmú, védő funkciójú ozmolitok pl. trimetilamin-N-oxid, szarkozin ellensúlyozzák (Yancey és mtsai., 1982).

Az ozmolit-molekulák mint adalékanyagok enzimekre gyakorolt hatása a mai napig nem tisztázott molekuláris szinten, de az elmúlt évtizedben az irodalomban többféle elképzelés is körvonalazódott hatásmechanizmusuk tekintetében. Az adalékanyagok specifikus kötésekkal kapcsolódhatnak a fehérjemolekulákhoz, ekkor már kis koncentrációban kifejthetik fehérjestabilizáló hatásukat, míg a csak nagy koncentrációban stabilizáló adalékanyag-molekulákról a kutatók feltételezik, hogy a fehérjéhez kötődő vízmolekulákkal létesítenek kapcsolatot (Tams és Welinder, 1996). Mai elképzelések szerint a stabilizáló és a destabilizáló ozmolitok különbözőképpen lépnek kölcsönhatásba a fehérjével. A stabilizáló ozmolitokról feltételezik, hogy kizáródnak a fehérjék polipeptidgerincéből, mivel a vízmolekulák sztérikus és energetikai okok miatt sokkal kedvezőbben kapcsolódhatnak a polipeptidgerinc poláros csoportjaihoz, mint pl. a stabilizáló trimetilamin-N-oxid. Ezzel szemben a destabilizáló ozmolitok, pl. az urea, akumulálódni képesek a peptidgerinc környezetében, kirekesztve onnan a vízmolekulákat. A modell termodinamikai és molekuláris kölcsönhatásokra egyaránt épül, azonban még nem teljes, mivel nem terjed ki az apoláros fehérjerégió-ozmolit kölcsönhatásokra (Street és mtsai., 2006).

Termodinamikailag a fehérjék, enzimek konformációstabilitása a Gibbs-féle szabadenergia-változásával ( $\Delta G$ ) írható le. Arakawa és munkatársai (1990) elsőként írták le, hogy az ozmolitok a fehérjék denaturált állapotának kémiai potenciálját növelik, azaz növelik a  $\Delta G$  értéket a natív állapothoz képest. A fehérjék jóval stabilabbak bizonyos ozmolitok jelenlétében, mint csupán vízben. A 90-es évek végén a kutatók igazolták, hogy a szabadenergia-változása a védő és denaturáló ozmolitok esetén egyaránt arra utal, hogy a fehérjék polipeptid gerince játssza a fő szerepet a denaturációban, ill. a stabilizálásban. A természetes ozmolitok csökkenteni képesek a fehérjék entrópiáját, ezzel fokozva a natív állapot relatív stabilitását (Qu és mtsai., 1998).

Az irodalomban már régóta ismert, hogy a szénhidrátok jelentősen növelik az enzimek hőstabilitását (Back és mtsai., 1979), de csupán a 90-es évek közepétől tudott, hogy a szerves oldószerek destabilizáló hatását is képesek csökkenteni (Lozano és mtsai., 1993). Tiwari és Bath (2006) igazolták, hogy a polioloak hővel szembeni fehérjestabilizáló hatása összefügg a polioloak OH-csoport számával. 3–6 hidroxilcsoportot tartalmazó polioloakkal (glicerin, eritrit, xilit, szorbit) vizsgálták a hexokináz A hőstabilitását, és azt tapasztalták, hogy legkevésbé a csupán 3 OH-csoportot tartalmazó glicerin, míg leginkább a 6 OH-val rendelkező szorbit jelenlétében őrizte meg az enzim stabilitását. A polioloak, noha kiszorulnak a fehérjék peptidgerincéből, valószínűleg növelik a hidrogénhidak számát a fehérjemolekula közvetlen környezetében, ezzel eredményezve a fokozott hőstabilitást. Haque és munkatársai (2006) kimutatták azt is, hogy az ozmolitok jelenléte általában nem hat a fehérje natív térszerkezetére.

Hidroláz enzimek kis víztartalmú rendszerekben peptid- és észterszintézisekre is alkalmasak. Polioloak jelenlétében az enzimek szintetikus aktivitása növekedhet. Lozano és munkatársai (1993) papain enzimmel Gly–Gly–Phe tripeptidet szintetizáltak Gly–Gly–etilészter és Phe szubsztrátokból egy lépésben 60 °C-on, és vizsgálták a polioloak (etilén-glikol, glicerin, eritrit, xilit és szorbit) hatását a szintézisre. A polioloak azon túl, hogy védő funkcióval bírtak a magas hőmérséklet okozta denaturációval szemben, növelték az enzimaktivitást is, ami összefüggésben állt a polioloak molekulatömegével és a vízakivitást befolyásoló képességével. Valószínűsítik, hogy ez esetben is az adalékanyag-molekula hidroxilcsoport-tartalma határozta meg a stabilizáló hatás mértékét.

Hidroláz enzimek szerves oldószeres közeggel szembeni stabilitása jelentősen növelhető polioloak segítségével. Az  $\alpha$ -kimotripszin stabilitása fokozható 6000–35000 dalton moltömegű PEG hozzáadásával 60 tf%-os etanolban, de hatásos stabilizálónak bizonyult a glükóz, a fruktóz, a szacharóz, a szorbit és a glicerin is. Említést érdemel, hogy a glicerin csak 10–15 tf% koncentrációban stabilizálta az  $\alpha$ -kimotripszint, az ennél az optimumnál kisebb vagy nagyobb glicerin tartalom már kevésbé volt hatásos (Simon és mtsai., 2002, 2004).

Az ozmolitok a nukleinsavak stabilitását is befolyásolják. Lambert és Draper (2007) arra a kérdésekre keresték a választ, hogy az ozmolitok hogyan hatnak az RNS-ek stabilitására, és mely RNS szerkezetek érzékenyek a különféle ozmolitokra. Hat eltérő szerkezetű, komplexitású és stabilitású RNS másod- és harmadlagos szerkezetét vizsgálták nyolc különböző ozmolit jelenlétében. A natív, kompakt szerkezetű RNS molekulák egy intermedier állapotban keresztül

tekerednek ki, és az ozmolitok befolyásolhatják ezt a folyamatot. Megállapították, hogy az összes ozmolit eltérő mértékben csökkentette az RNS másodlagos szerkezetek stabilitását, de hatással voltak a harmadlagos szerkezetekre is. Ez esetben stabilizáló és destabilizáló ozmolitokat különítettek el. A stabilizáló ozmolitok valószínűleg kevésbé képesek kölcsönhatásba lépni az RNS cukorfoszfát gerincével. Megállapították azt is, hogy  $Mg^{2+}$  jelenlétében a stabilizáló ozmolitok hatása csökken, és az RNS molekula destabilizálódhat.

A cukrok közül a trehalózt tartják az egyik legjobb fehérjestabilizálónak denaturáló szerekkel szemben, ill. hőinaktiválódás megakadályozására. A trehalózzal ismert, hogy kedvezően képes befolyásolni több termodinamikai paramétert, pl. a hőkapacitást és az entrópiát, melyek a protein–oldószer kölcsönhatásokról és a fehérjék stabilitásáról adnak felvilágosítást (Kaushik és Bhat, 2003). A trehalóz eltérő mértékben és módon befolyásolhatja az egyes fehérjék stabilitását, denaturálószer jelenlétében az enzim molekulák aggregációját segíti, míg magas hőmérsékleten éppen megakadályozza azt (Sangeeta és mtsai., 1998; Singer és Lindquist., 1998).

Az irodalom alapján megállapítható, hogy a poliolok stabilizáló hatása különféle enzimeknél eltérő lehet. A magas hőmérséklet okozta inaktiválódás ellen az RN-áz A és lizozim enzimek a fiziológiás pH-nál kisebb kémhatáson váltak stabillá (Haque és mtsai., 2005), míg egyes szeril-proteázok, pl. az  $\alpha$ -kimotripszin, szerves oldószerrel szembeni stabilitása lúgos közegben volt szembeötlő (Simon és mtsai., 2002).

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. ANYAGOK

A papain (EC 3.4.22.2) kétszer kristályosított, liofilizált enzimet a Sigma-Aldrich Kereskedelmi Kft-től vásároltuk. Az enzim specifikus aktivitása 14–24 U/mg volt. Egy enzimegység az enzimnek az a mennyisége, amely 1,0  $\mu$ mol BAEE-t bont percenként pH 6,2-nél 25 °C-on. Az  $N_{\alpha}$ -karbobenzoxi-L-arginil-7-amido-4-metilkumarin (Z-Arg-AMC), a DL-ditiotreitol, a 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav (TNBS), az *N*-acetyl-tirozin (*N*-ac-Tyr), az ecetsav-anhidrid, a citrakonsav-anhidrid és a D-ribóz szintén a Sigma-Aldrich terméke. A Folin-Ciocalteu reagenst a Merck Kft-től szereztük be. A mérésekhez használt egyéb vegyszerek pedig a Reanal Finomvegyészgyár Zrt. termékei voltak.

#### 3.2. MÓDSZEREK

##### 3.2.1. Aktivitásmérés kazein szubsztráttal

Az aktivitásmérések egy részénél szubsztrátként kazein fehérjét használtunk (Arnon, 1970). A 4%-os kazein törzsoldat készítésekor 40 ml desztillált vízhez 8,0 ml 1,0 N NaOH-ot adtunk, majd feloldottunk benne 4,4 g kazeint és 36 g karbamidot. Feloldás után az oldatot 100 ml-re egészítettük, és hozzáadtunk 10,0 ml 1 M  $KH_2PO_4$ -et, valamint 4,0 g karbamidot. Az oldat pH-ját 7,5-re állítottuk, majd az egészet leszűrtük. Felhasználás előtt a 4%-os kazeinoldatot hatszorosa hígítottuk 0,1 M-os dinátrium-citrát/NaOH pufferrel (pH 6,2). A 0,15 mg/ml koncentrációjú enzimoldatból 0,42 ml-t 1,5 ml 0,67%-os kazeinoldathoz adtuk, majd a mintát 25 °C-on 5 percig inkubáltuk. A reakciót 1,5 ml 10%-os TCA-val állítottuk le. Ezután a mintát 10 percre jégbe helyeztük, hogy a csapadékképződés teljes legyen, majd 10 percig 2500 g-vel centrifugáltuk. A kazein szubsztrát emésztése során TCA oldékony peptidek keletkeznek, míg a nagyobb méretű fehérje molekulák TCA jelenlétében kicsapódnak. A felülúszó fehérjetartalmát Varian DMS 70 spektrofotométerrel 750 nm-nél Folin-reagenssel határoztuk meg (Lowry és mtsai., 1951). A fehérjeoldatok koncentrációját szarvasmarha szérum albuminból készített, ismert koncentrációjú oldatsor alapján, kalibrációs egyenes segítségével kaptuk meg. A 750 nm-en mért extinkcióváltozásból (vizes közegben pH 6,2-en a  $\Delta E/\text{perc}=0,03$ ) következtettünk a papain aktivitására.

### 3.2.2. Aktivitásmérés fluorogén szubsztráttal

A papain katalitikus aktivitásának szintetikus szubsztráttal történő meghatározásához Z-Arg-AMC-t használtunk (Zimmerman és mtsai., 1977). Az arginin- és a kumarinszármazék közötti peptidkötés hasításával a kumarinszármazék fluoreszcencia-emissziója megnő, és körülbelül 50 nm-rel hosszabb hullámhossz felé tolódik. A szénhidrátok a papain aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálata során a reakcióelegy 0,5 ml-e 2 µg papaint, 0,6 mM Z-Arg-AMC-t, 0,05 M Tris/HCl puffert (pH 7,0), 0,02 mM ditiotreitolt és 2 mM EDTA-t tartalmazott. A módosított enzimformák aktivitásának mérésekor a reakcióelegyben 0,33 µg enzim volt. A méréseket 25 °C-on 2 percig végeztük. A papain aktivitását Hitachi F-2500 FL spektrofluoriméterrel detektáltuk, melynek értéke vizes közegben (pH 7,0) 0,05 µmol/(mg·perc) volt. A mérések során a gerjesztő- és az emissziós fény hullámhossza 365 és 440 nm volt 2,5 és 5,0 nm-es résszélességgel.

### 3.2.3. Stabilitásvizsgálat

A papain stabilitását 0–90 tf% közötti szervesoldószer-koncentrációnál vizsgáltuk. A mérésekhez 1,5 mg/ml koncentrációjú enzim törzsoldatot készítettünk 0,1 M-os dinátrium-citrát/NaOH (pH 6,2) pufferben. A kísérletek előtt a papaint 100-szoros molfeleslegű ditiotreitollal aktiváltuk 25 °C-on egy óráig. A megfelelő koncentrációjú víz–szerves oldószer elegy 0,9 ml-éhez 0,1 ml aktivált enzimoldatot adtunk, melyet ezt követően szobahőmérsékleten 0–120 percig inkubáltunk. Az inkubálási elegyből 0,42 ml-t tettünk 1,5 ml 0,67%-os kazein oldathoz, és az aktivitásmérés során a 3.2.1. részben leírtak szerint jártunk el. A mérési eredményeket maradék aktivitás formájában tüntettük fel, amely a szerves oldószeres elegy összeállítása után azonnal mért ún. kiindulási aktivitás, és ugyanazon elegy 5–120 percnyi inkubálását követően meghatározott aktivitásérték százalékos arányával adható meg. Az ábrákon 5 mérés átlagát szórással tüntettük fel, a maradék aktivitást a szerves oldószer térfogatszázalékának (tf%) és az inkubálási időnek függvényében ábrázoltuk.

Stabilitásvizsgálatokat szénhidrátok jelenlétében is végeztünk 25 °C-on. Az inkubálási elegy (0,5 ml) 3 mM foszfát puffert (pH 8,0) és 20 µg enzimet tartalmazott 0–90 tf% szerves oldószer jelenlétében. A szénhidrátok hatását a következő koncentrációkban vizsgáltuk: 0,4–2,0 M D-ribóz, 0,2–1,6 M D-glükóz, 0,2–1,8 M D-fruktóz, 0,1–0,8 M D-szacharóz és 0,05–0,2 M D-raffinóz. A mintákat 0–120 percig inkubáltuk, majd azokból 0,05 ml-t adtunk a szubsztrátoldat

0,45 ml-éhez, és az aktivitásmérést a 3.2.2. alapján végeztük. Az ábrákon a szerves oldószer térfogatszázaléka (tf%) és az inkubálási idő függvényében a maradék aktivitást ábrázoltuk, 5 mérés átlagát tüntetve fel.

A módosított enzimformák tanulmányozásakor a stabilitásvizsgálatokat 0–90 tf% etanol, acetonitril és THF koncentrációnál végeztük. Az inkubálási elegy 0,5 ml-e 5,0 mM foszfát puffert (pH 8,0) és 3,3 µg enzimet tartalmazott. Az acilált enzimformákat 25 °C-on víz–szerves oldószer elegyben 2 órát inkubáltuk, és meghatározott időközönként ebből 0,05 ml-t kivéve a szubsztrátoldathoz adtuk, majd a 3.2.2. rész alapján jártunk el. 100%-nak a nem módosított enzim nulla időpillanatában mért aktivitását vettük. Az ábrákon 5 független mérés átlagát és a szórásokat tüntettük fel. Az aktivitást ez esetben is a szerves oldószer térfogatszázaléka (tf%) és az inkubálási idő függvényében ábrázoltuk.

### 3.2.4. Gibbs-féle szabadenergia-változás meghatározása

Meghatároztuk az enzim inaktiválódásának sebességi állandóját  $k_i$  60 tf% THF-ben szénhidrátok jelenlétében, ill. azok nélkül 25 °C-on 120 perc elteltével (Reichardt, 2003). Az inaktiválódás elsődrendű kinetikával jellemezhető szakaszát értékeltük. Az idő konstanst,  $\tau_i$  — az az idő, amely alatt az aktivitás tizedére csökken —, a következő egyenlet alapján adtuk meg:

$$\tau_i = \frac{1}{k_i} \quad (2)$$

Az inaktiválódás Gibbs-féle szabadenergia-változását adalékanyagok jelenlétében a következőképpen határoztuk meg (Tams és Welinder, 1996):

$$\Delta\Delta G_i^\ddagger = RT \ln \frac{k_{i, \text{additív nélkül}}}{k_{i, \text{additívvel}}} \quad (3)$$

### 3.2.5. A papain kémiai módosítása

A papaint inaktív, SH-csoport védett formában módosítottuk dimetil-szulfoxidban oldott 0,08–0,4 M koncentrációjú ecetsav-, propionsav-, citrakonsav-, maleinsav- és borostyánkősav-anhidriddel. Az enzimet 6 mg/ml koncentrációban 0,1 M-os foszfát pufferben (pH 8,0) oldottuk. A módosítás során a folyamatosan kevert 0,5 ml papain oldathoz 30 perc alatt 25 °C-on cseppenként 0,05 ml módosító reagenst adtunk. Az oldat kémhatását 1,0 N NaOH cseppenkénti

adagolásával pH 8,0-en tartottuk majd ezután a mintákat Sephadex G-25 oszlopon 0,1 M foszfát pufferrel (pH 8,0) gélszűrtük, hogy az el nem reagált módosítószert eltávolítsuk. A papaint a további mérések előtt 100-szoros molfeleslegű ditiotreitollal aktiváltuk.

### 3.2.6. Szabad aminosoporszám meghatározása

A papain szabad aminosoport-tartalmát szénhidrátok jelenlétében és az anhidrides módosításokat követően TNBS segítségével határoztuk meg (Fields, 1971). A szénhidrátok hatásának mérése során az enzimoldat (0,275 mg/ml) 0,25 ml-éhez 0,25 ml 0,1 M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  / 0,1 M NaOH oldatot adtunk. A reakciót 0,01 ml 5%-os TNBS oldattal indítottuk el, majd 5 perces 25 °C-os inkubálást követően 1 ml 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  / 0,015 M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  oldattal állítottuk le. A keletkező fehérje–trinitrofenil-származék mennyiségét 420 nm-en spektrofotometriásan határoztuk meg.

A kémiai módosításokat követően az enzim szabad aminosoport-tartalmát hasonlóan határoztuk meg. Ekkor a gélszűrt enzimmintához 1:1 arányban 9 M ureát mértünk, majd a meghatározás előtt 24 órát inkubáltuk, hogy a reagens számára az összes aminosoport hozzáférhetővé váljon. A mérések során kapott extinkció értékeket 0,01 mg/ml koncentrációjú glicin oldattal kapott adatokhoz viszonyítottuk, hogy meghatározhassuk a módosult aminosoportok számát.

### 3.2.7. Natív poliakrilamid gélelektroforézis

A natív és a módosított enzimformák homogenitásvizsgálatát is elvégeztük (Nitsawang és mtsai., 2006). Az elektroforézist 12%-os poliakrilamid elválasztógélben (1,2 M citromsav/NaOH puffer, pH 5,3) végeztük, amely fölé 4%-os koncentráció gél (0,5 M Tris/HCl puffer, pH 6,8) polimerizáltunk. Felső és alsó tankpufferként 34 mM  $\beta$ -alanin/ecetsav puffert (pH 5,5) alkalmaztunk. A gélezsekbe 10  $\mu\text{l}$  mintát vittünk fel: 5  $\mu\text{l}$  fehérjemintát (5  $\mu\text{g}$ ) duplájára hígítottunk 0,5 M Tris/HCl pufferrel (pH 6,8), amiben 10% szacharózt és 0,002% bázikus fukszint oldottunk. Az elektroforézist 40 mA állandó áramerősségnél végeztük 4 °C-on. Az elválasztás után a gél mosó oldatba helyeztük (13% TCA és 45 tf% metanol). Ezt követően fixáló oldattal kezeltük, ami 13% TCA-t és 5 tf% etanolt tartalmazott, majd Coomassie Brilliant Blue R-250 festékoldatba tettük. Többszöri mosás után a gél 5 tf% ecetsavoldatban tároltuk.

### 3.2.8. A papain $K_M$ és $V_{max}$ paramétereinek meghatározása

Meghatároztuk a natív, a citrakonil- és a propionil-papain kinetikai paramétereit, a maximális reakciósebességet ( $V_{max}$ ) és a Michaelis állandót ( $K_M$ ). A méréseket 25 °C-on végeztük 0,67 µg/ml koncentrációjú enzimmel 0,05 M Tris/HCl pufferben és 10 tf% etanolban. A Z-Arg-AMC szubsztrátoldat koncentrációját 20 és 200 µM között változtattuk. Az aktivitásmérés körülményei 3.2.2. résznek megfelelően választottuk meg.

### 3.2.9. *N*-acetyl-L-tirozil-etylészter szintézise

A kontroll és a módosított gélszűrt enzimmintákat felhasználás előtt dializáló csőben PEG<sub>35000</sub>-rel 1/6-ára töményítettük. A reakcióelegy 2 ml-e 4 mM *N*-acetyl-L-tirozint, 8 mM foszfát puffert (pH 8,0) és 0,2 mg kontroll, ill. módosított papaint tartalmazott 4 tf% víz jelenlétében etanolos közegben. Az észterszintézis során az *N*-acetyl-L-tirozin szubsztrát fogyását követtük 24 órás 25 °C-os inkubálást követően, melyet pH-stat titrálással pH 9,5 végpontig határoztunk meg 10 mM-os NaOH oldattal.

### 3.2.10. Belső fluoreszcencia mérése

A kísérleteket Hitachi F-2500 FL spektrofluoriméterrel végeztük, minden esetben 2,5 nm gerjesztési és 5,0 nm emissziós résbeállításokkal 1 cm-es rétegvastagság mellett. A spektrofluoriméter 1 nM-os rodamin-B oldattal szemben automatikusan korrigálta a rögzített színképeket. A mérésekhez 0,1 mg/ml koncentrációjú papaint használtunk. Az inkubálási elegyeket az előzetes stabilitási vizsgálatok alapján állítottuk össze. A fluoreszcencia emissziós spektrumokat 0–90 tf% oldószer-koncentráció között vettük fel 30–120 perces 25 °C-os inkubálást követően. A relatív fluoreszcencia-intenzitás egységének megválasztásánál a vizes enzimdát fluoreszcenciáját választottuk egységnyinek. Az oldószerek közvetlen hatásának vizsgálatához 25 mM-os *N*-acetyl-L-Trp-etylészter standardot használtunk. Az ábrákon három mérési sorozat átlagértékeit tüntettük fel. A papain belső (triptofán-) fluoreszcenciájának vizsgálatakor 295 nm gerjesztési hullámhossznál az emissziós spektrumokat 300–400 nm hullámhossz-tartományban vettük fel (Edwin és Jagannadham, 1998; Edwin és mtsai., 2002). A 290–300 nm közötti gerjesztési hullámhossz szelektíven a Trp-oldalláncokat gerjeszti (Lakowicz, 1983).



### 3.2.11. Cirkuláris dikroizmus mérése

A méréseket Jobin-Yvon Mark VI dikrográffal végeztük a távoli-UV-tartományban 190–250 nm között 0,02 cm rétegvastagság mellett, valamint a közeli-UV-tartományban 250–300 nm között 1,0 cm rétegvastagság mellett 2 nm résbeállítással. A spektrumok felvételekor 0,2 nm-enként rögzítettük az intenzitásértékeket. Az inkubálási elegyet a stabilitásvizsgálatainknak megfelelően állítottuk össze, és a kísérleteket 0–90 tf% szervesoldószer-koncentrációban végeztük 25 °C-on 30 illetve 120 perc inkubálást követően. Az enzim koncentrációja a távoli-UV-tartományban 0,1 mg/ml, a közeli-UV-tartományban 0,55 mg/ml volt. Az eredményeket átlagos aminosavmoltömeeggel (110 g/mol) számolva moláris ellipticitásban  $[\Theta]$  adtuk meg, melynek dimenziója  $\text{fok}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ . A spektrumokat háromszor vettük fel, és az ábrákon ezek átlagát tüntettük fel. A papain másodlagos szerkezeti elemeinek arányát Provencher–Glöckner spektrum analizáló algoritmus alapján számítottuk ki (Provencher és Glöckner, 1981).

## 4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

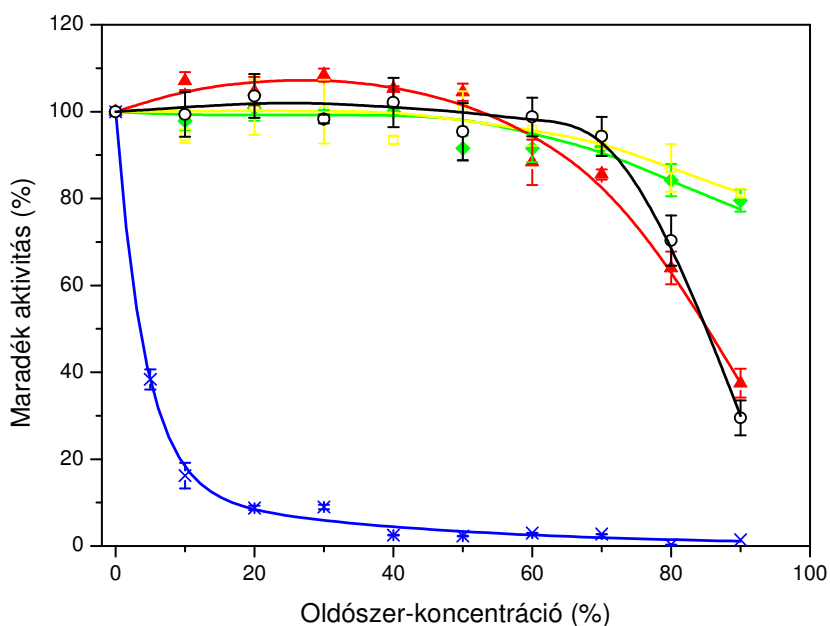
### 4.1. A PAPAİN AKTIVITÁSA ÉS STABILITÁSA SZERVES OLDÓSZERES KÖZEGBEN

A papain széles szubsztrátspecifitásának köszönhetően gyakran használják az iparban különböző szerves kémiai szintézisekben aminosav-észterek és peptidek előállítására vizes és szerves oldószeres közegben. A kitermelés hatékonyságának növelése céljából fontos a megfelelő polaritású közeg megválasztása. Az apoláros karakterű szubsztrátok oldékonyságának apoláros szerves oldószerek kedveznek, míg a poláros szubsztrátok a poláros oldószerekben oldódnak jól. Kísérleteinkben elsőként arra kerestük a választ, hogy a különféle szerves oldószerek milyen hatással vannak az enzim aktivitására és stabilitására. Méréseinkhez eltérő kémiai sajátságú, vízzel elegyedő [aceton, acetonitril (ACN) dimetil-formamid (DMF), dimetil-szulfoxid (DMSO), etanol, metanol, tetrahidrofurán (THF)], ill. nem vagy csak részben elegyedő (*n*-hexán, toluol, etilacetát) szerves oldószereket választottunk. Az ACN, az aceton, a DMF, a DMSO, THF és az etilacetát poláros aprotikus, az etanol és a metanol poláros protikus, míg az *n*-hexán és a toluol apoláros oldószerek.

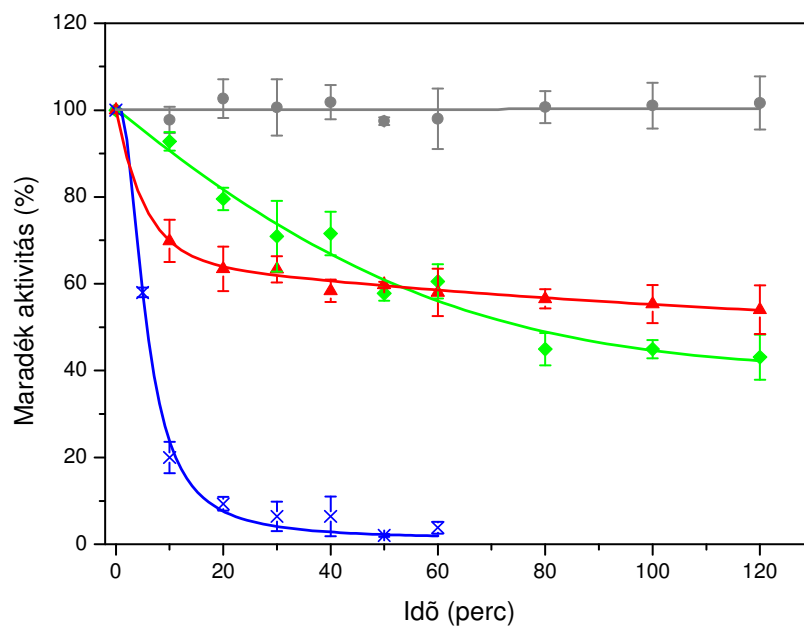
#### 4.1.1. Vízzel elegyedő szerves oldószerek hatása

A papain maradék aktivitását vízzel elegyedő szerves oldószerekben (etanol, metanol, ACN, aceton és THF) a 6. ábra mutatja. Eredményeink szerint a vizsgált oldószerek többsége (etanol, metanol, ACN, aceton) a kis oldószer-koncentrációknál nem csökkentette az enzimaktivitást 20 perc inkubálást követően, 50 tf% koncentráció fölött azonban egyre kisebb enzimaktivitást tapasztaltunk. 90 tf% szervesoldószer-tartalomnál leginkább etanolban és metanolban őrizte meg az enzim aktivitását (kb. 80–82%). 90 tf% ACN-ben és acetonban ennél nagyobb aktivitásvesztést tapasztaltunk, de ekkor is megmaradt a papain aktivitásának  $38 \pm 3$  illetve  $30 \pm 4\%$ -a. A THF ezzel szemben már kis koncentrációban jelentősen csökkentette az aktivitást, az 5 tf% szervesoldószer-tartalmú elegyben a papain aktivitásának mindössze  $38 \pm 2\%$ -át őrizte meg, 30 tf% THF koncentráció fölött pedig gyakorlatilag teljes mértékben inaktiválódott az enzim.

Szerves oldószeres közegben tanulmányoztuk az enzim aktivitásának időbeli változását is, melyet a 7. ábrán tüntettünk fel. Vizes közegben 120 perc alatt nem tapasztaltunk változást az enzim aktivitásában. A 90 tf% etanol és 80 tf% ACN viszont csökkentette a papain aktivitását.



**6. ábra.** Vízrel elegyedő szerves oldószerek hatása a papain aktivitására 25 °C-os 20 perces inkubálási idő után; aceton —○—, acetonitril —▲—, etanol —◆—, metanol —□—, tetrahidrofurán —×—.

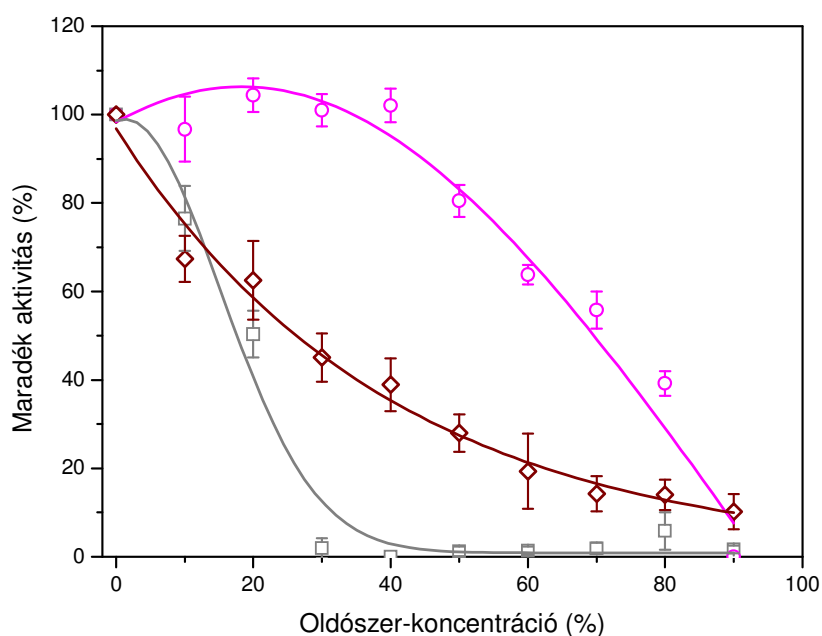


**7. ábra.** A papain stabilitása vízben (pH 6,2) —●—, 90 tf% etanolban —◆—, 80 tf% acetonitrilben —▲—, valamint 30 tf% THF-ben —×—.

90 tf% etanolban lassúbb aktivitásvesztés történt, és 120 perc után az aktivitás  $43 \pm 5\%$ -a maradt meg. ACN-es közegben a méréseket 80 tf% koncentrációnál végeztük, mert 90 tf% oldószer-koncentrációban az inkubálási idő folyamán csapadékképződést figyeltünk meg. 80 tf% ACN-ben az aktivitáscsökkenésnek volt egy gyors szakasza, ami 20 percig tartott körülbelül 37%-os aktivitásvesztéssel, majd ezt egy lassú lineáris csökkenő szakasz követte. THF-es közegben már a kis oldószer-koncentrációnál igen jelentős inaktiválódást mértünk. 30 tf% THF-ben a papain aktivitása drasztikusan csökkent, 20 perc elteltével gyakorlatilag teljesen inaktiválódott az enzim.

#### 4.1.2. Vízzel nem vagy csak részben elegyedő oldószer hatása

A papain maradék aktivitását vízzel nem vagy csak részben elegyedő *n*-hexános, toluolos és etilacetátos közegben a 8. ábra szemlélteti. Az apoláros karakterű szerves oldószert tartalmazó kétfázisú rendszerek is csökkentették az enzimaktivitást. A legstabilabb a vízzel nem elegyedő *n*-hexánt tartalmazó közegben volt az enzim. 40 tf% koncentrációig *n*-hexánban nem változott, e fölött viszont drasztikusan csökkent az enzim aktivitása a 20 perces inkubálási idő alatt. A szintén vízzel nem elegyedő toluolos és a részben elegyedő etilacetátos közegben a THF/víz elegyben mérthez hasonló, jelentős aktivitásvesztést tapasztaltunk már a kis oldószer-koncentrációnál is.

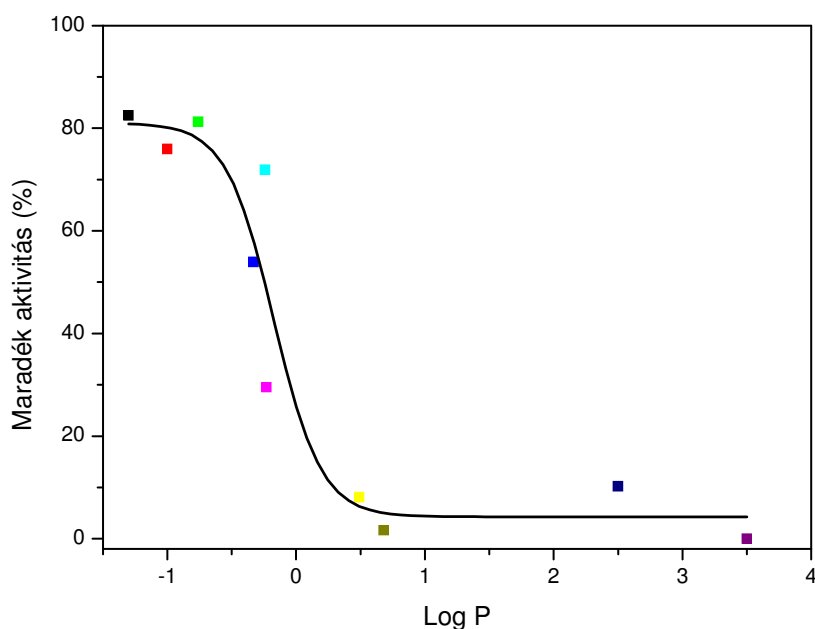


**8. ábra.** Vízzel nem elegyedő szerves oldószer hatása a papain aktivitására különböző oldószer-koncentrációnál 20 perces 25 °C-os inkubálás után; *n*-hexán —○—, toluol —◇—, etilacetát —□—.

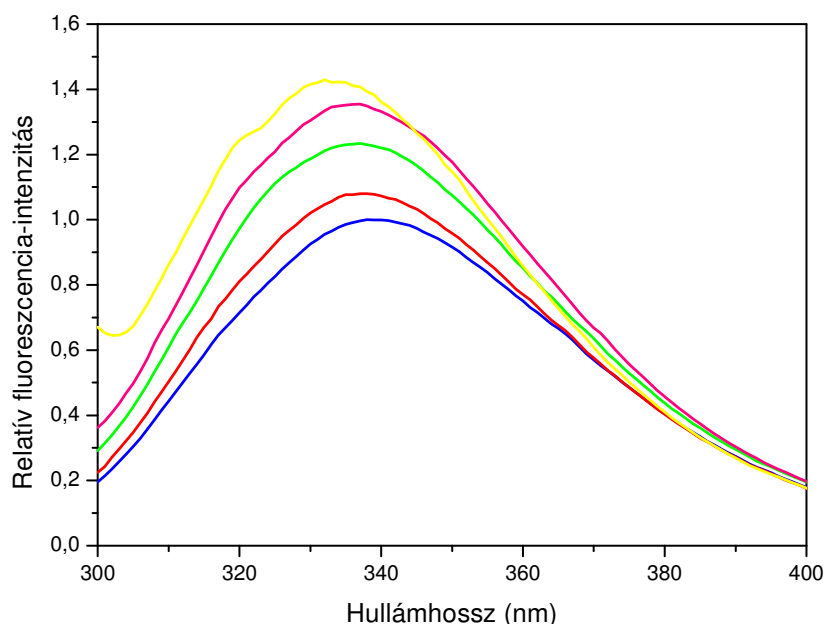
20 tf% etilacetát tartalomig azonban a papain megőrizte aktivitásának  $50 \pm 5\%$ -át, és közel hasonló aktivitás ( $63 \pm 9\%$ ) volt megfigyelhető toluolos közegben is.

#### 4.1.3. A papain aktivitása az oldószerek $\log P$ értékének függvényében

Az oldószerek  $\log P$  értéke az enzimaktivitással általában korreláló paraméter (Castro 1999). A papain 90 tf% szervesoldószer-koncentrációnál mért maradék aktivitását az oldószerek  $\log P$  értéke függvényében a 9. ábra mutatja. A  $\log P$  érték a szerves oldószer megoszlását adja meg az 1-oktanol és a víz között (lásd 2.3.1.). A  $\log P < -0,5$  értékkel rendelkező szerves oldószerekben [DMSO ( $\log P = -1,3$ ), DMF ( $\log P = -1,0$ ), metanol ( $\log P = -0,76$ )] az enzim megőrizte aktivitásának közel 76–83%-át a 20 perces inkubálás során. A  $-0,5 < \log P < 0,5$  hidrofóbicitású oldószerek azonban [ACN ( $\log P = -0,33$ ), etanol ( $\log P = -0,24$ ), aceton ( $\log P = -0,23$ )] 90 tf% koncentrációban ez idő alatt már jelentősen csökkentették az enzimaktivitást. Azok a szerves oldószerek [THF ( $\log P = 0,49$ ), etilacetát ( $\log P = 0,68$ ), toluol ( $\log P = 2,5$ ), *n*-hexán ( $\log P = 3,5$ )], melyeknek  $\log P > 0,5$  pedig gyakorlatilag teljesen inaktíválták a papaint.



**9. ábra.** A papain aktivitásváltozása szerves oldószeres közegben 90 tf% koncentrációnál a  $\log P$  érték függvényében: dimetil-szulfoxid ■, dimetil-formamid ■, metanol ■, acetonitril ■, etanol ■, aceton ■, tetrahydrofuran ■, etilacetát ■, toluol ■, hexán ■. A méréseket kazein szubsztráttal végeztük 25 °C-on 20 perc szerves oldószeres inkubálás után.



**10. ábra.** A papain belső fluoreszcenciája etanos közegben (pH 6,2): 0 —, 20 —, 40 —, 60 —, 90 tf% — etanol;  $\lambda_{\text{ex}}$ : 295 nm. A méréseket 120 perces 25 °C-os inkubálást követően végeztük.

#### 4.1.4. Szerves oldószeres közeg hatása az enzim szerkezetére

##### 4.1.4.1. Fluoreszcencia-spektroszkópiai mérések

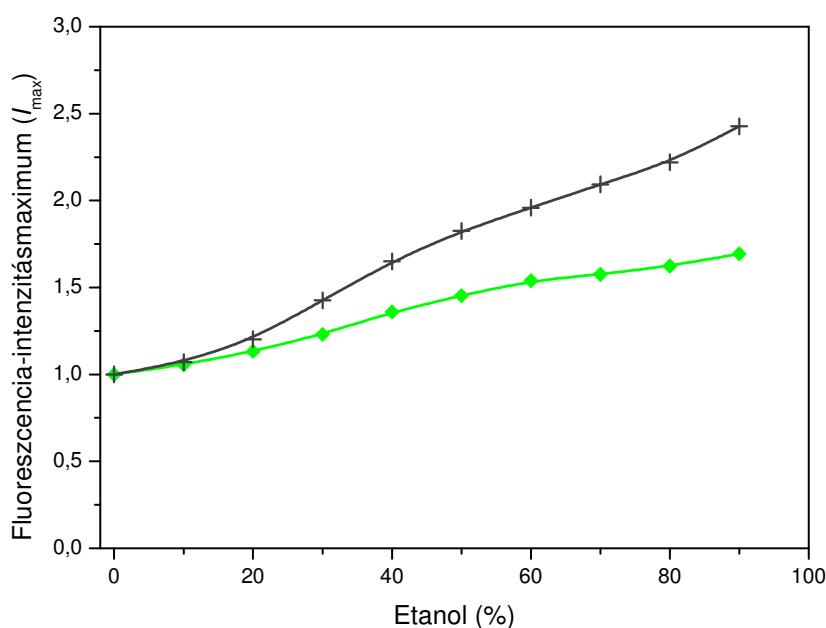
Tanulmányoztuk szerves oldószeres közegben a papain belső fluoreszcenciáját, amely során 295 nm-es monokromatikus fényel szelektíven a Trp-oldalláncokat gerjesztettük (Lakowicz, 1983). A papain triptofánfluoreszcencia-paramétereit etanos, metanos, ACN-es és THF-es közegben vizsgáltuk 2 órás inkubálás után. A fluoreszcencia-paramétereket befolyásolja az enzim szerkezetében lévő Trp-oldalláncok pozíciója és az oldószer polaritása egyaránt. A fluoreszcencia-paraméterek közül az intenzitásmaximumot ( $I_{\text{max}}$ ) és a maximális emisszióhoz tartozó hullámhosszt ( $\lambda_{\text{max}}$ ) vizsgáltuk. Az oldószerhatást *N*-ac-Trp-etilészter standard vizsgálatával követtük különböző szervesoldószer-koncentrációknál.

A 10. ábra a papain triptofánfluoreszcencia-paramétereit mutatja etanol/víz elegyben eltérő oldószer-koncentrációkban. Vizes közegben az enzim  $\lambda_{\text{max}}$  értéke 338 nm volt. Az etanol koncentráció növelésével a színek egyre rövidebb hullámhossz felé tolódott el, 90 tf% etanolban mintegy 6 nm-es eltérést tapasztaltunk 120 perc inkubálás után. A standard esetén a rövidebb hullámhossz felé történő eltolódás nagyobb mértékű volt. 90 tf% szervesoldószer-koncentrációnál az enzim és az *N*-ac-Trp-etilészter  $\lambda_{\text{max}}$  értékét az 1. táblázat mutatja. Vizes

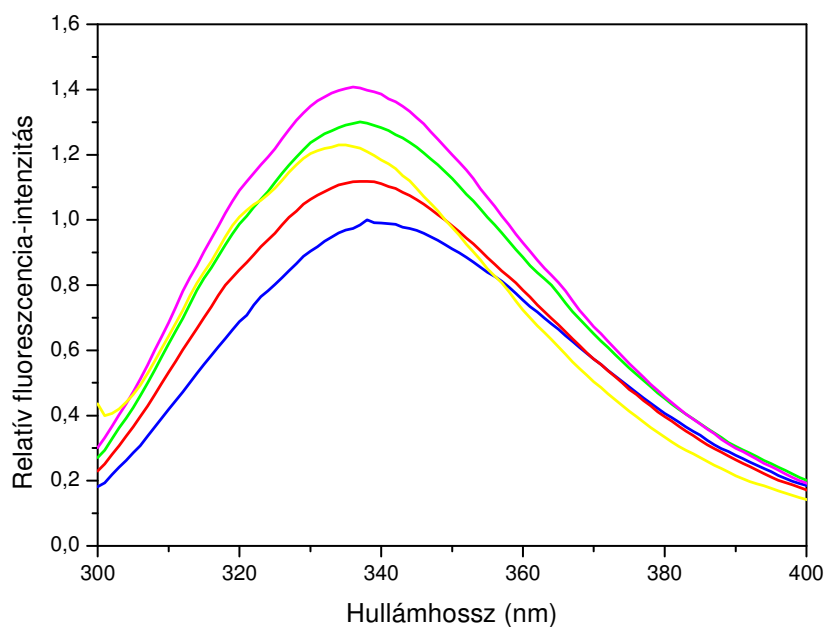
**1. táblázat.** A papain és az *N*-ac-L-Trp-etilészter fluoreszcencia  $\lambda_{\max}$  értéke 90 tf% szervesoldószer-tartalomnál 2 óra inkubálás után.

Komponens	$\lambda_{\max}$ (nm)			
	Víz	Etanol	Acetonitril	Tetrahidrofurán
<i>N</i> -ac-L-Trp-etilészter	350	338	336	333
Papain	339	333	331	332

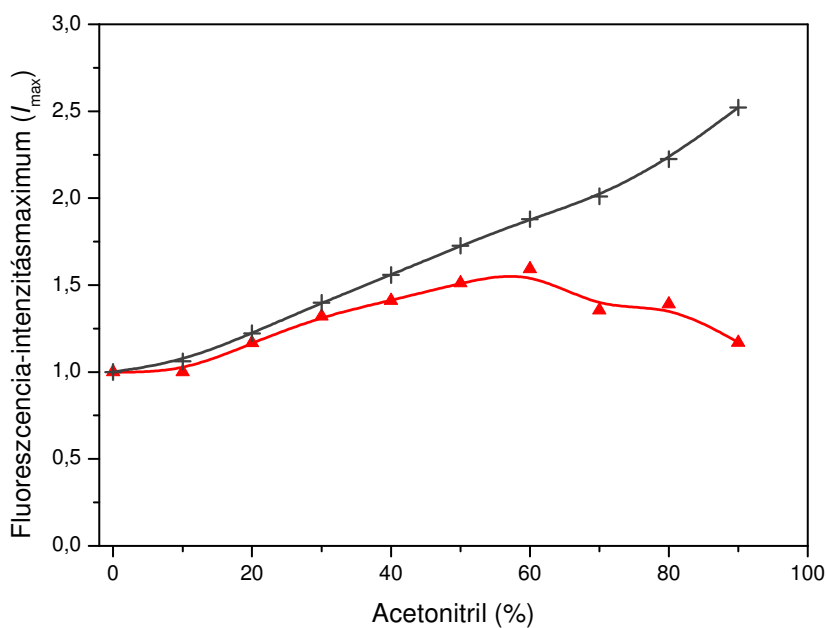
közegben a standard  $\lambda_{\max}$  értéke 350 nm volt, ami 90 tf% etanolban 12 nm-rel tolódott el. Az etanol koncentráció növelésével az  $I_{\max}$  érték emelkedése járt együtt mind a papain, mind a standard esetén (11. ábra). Az  $I_{\max}$  érték növekedése az enzim esetén kisebb volt, 90 tf% etanolban értéke 1,7-szeresére nőtt a vizes közegben tapasztalhoz képest, míg az *N*-ac-L-Trp-etilészter intenzitásnövekedése 2,4-szeres volt. Metanolos közegben a papain fluoreszcencia-paramétereinek változása nagyon hasonlóan alakult az etanolos közegben tapasztalhoz, valamivel kisebb mértékű (3 nm) rövidebb hullámhossz felé történő eltolódással 90 tf% szerves oldószerben.



**11. ábra.** A papain  $I_{\max}$  értékének változása az etanol —◆— koncentráció függvényében. Standardként *N*-ac-L-Trp-etilésztert —+— használtunk. A mérések előtt a mintákat 2 óráig inkubáltuk 25 °C-on.



**12. ábra.** Az enzim triptofán-fluoreszcenciája acetonitril/víz elegyben (pH 6,2): 0 —, 20 —, 40 —, 60 —, 90 tf% — acetonitril;  $\lambda_{\text{ex}}$ : 295 nm. A méréseket 2 óra inkubálást követően végeztük.

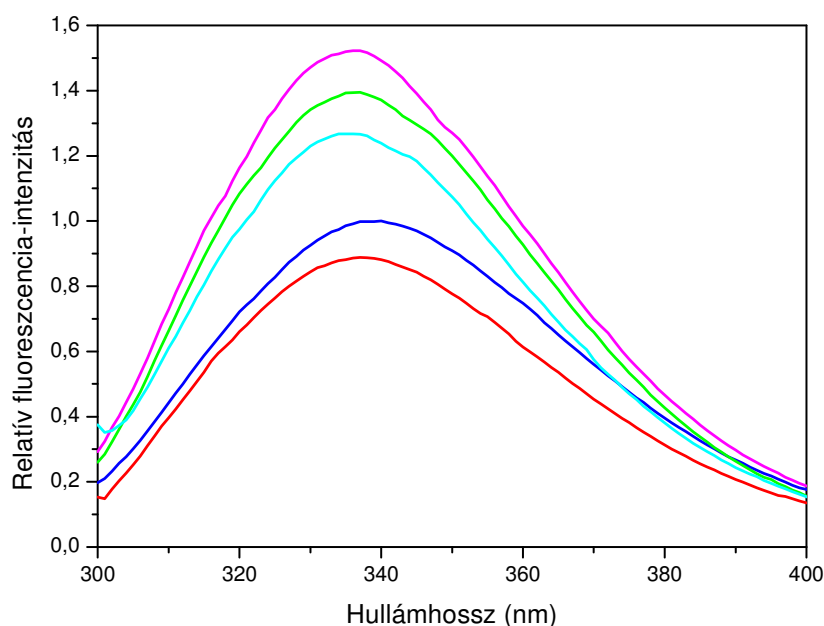


**13. ábra.** A papain  $I_{\text{max}}$  értékének alakulása acetonitriles —▲— közegben. Standardként *N*-ac-Trp-etilésztert —+— használtunk. A méréseket 2 óra inkubálást követően végeztük.

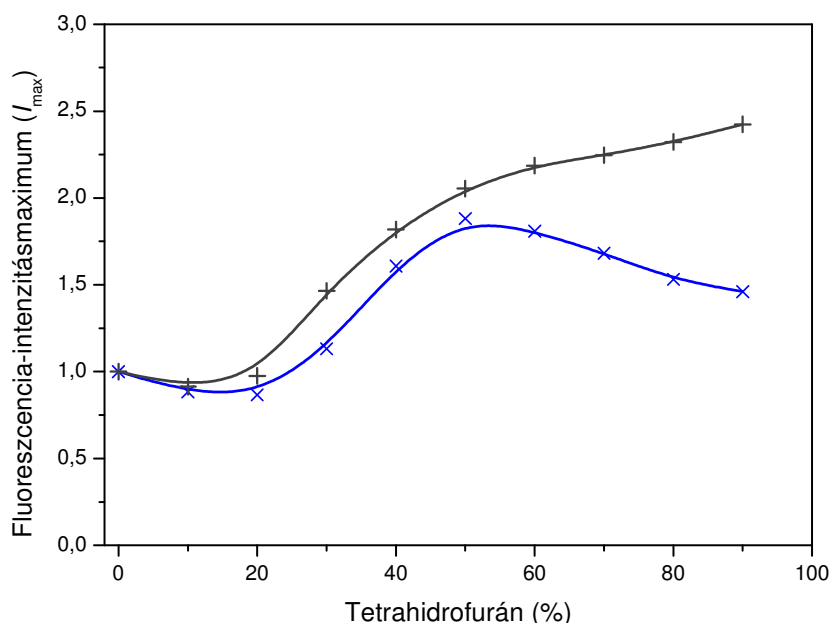


A fluoreszcencia-paramétereknek ACN-es és THF-es közegben az alkoholban tapasztaltnál nagyobb mértékű változását észleltük. A fluoreszcencia-színképeket az ACN koncentráció emelésével a 12. ábra mutatja. 90 tf% ACN-ben az etanolban tapasztaltnál nagyobb, mintegy 8 nm-es  $\lambda_{\max}$  csökkenést tapasztaltunk. A standard  $\lambda_{\max}$  értékének változása is nagyobb volt, mintegy 14 nm-rel csökkent 90 tf% ACN-ben 120 perc inkubálás után (1. táblázat). A Trp-standard intenzitása az ACN koncentráció emelésével folyamatosan nőtt. A papain  $I_{\max}$  értéke is növekvő tendenciát adott 60 tf% koncentrációig, ezt követően azonban a standardtól eltérően a papain esetén kismértékű  $I_{\max}$  csökkenést tapasztaltunk (13. ábra).

THF/víz elegyben is jelentős változásokat kaptunk az enzim fluoreszcenciájában, melyet a 14. ábra szemléltet. 90 tf% szervesoldószer-koncentrációnál 7 nm-rel a rövidebb hullámhossz-tartomány felé tolódott a spektrum, a standard esetén a változás 17 nm-nyi volt (1. táblázat). Az enzim és a standard  $I_{\max}$  értéke 50 tf% koncentrációig együtt haladt: 20 tf% THF koncentrációig kicsit csökkent, majd ezt követően nőtt az intenzitásuk. A nagyobb szervesoldószer-koncentrációnál viszont eltérést mutattunk ki az  $I_{\max}$  változás tendenciájában. 90 tf% THF-ben a vizes közegben tapasztaltnál képest a standard  $I_{\max}$  értéke kb. 2,4-szeresre emelkedett, míg az enzimé csupán 1,5-szer volt nagyobb annál (15. ábra).



**14. ábra.** A papain belső fluoreszcencia-színképei tetrahydrofurános elegyben (pH 6,2): 0 —, 20 —, 40 —, 60 —, 80 tf% tetrahydrofurán;  $\lambda_{\text{ex}}$ : 295 nm. A méréseket 120 perc inkubálást követően végeztük.

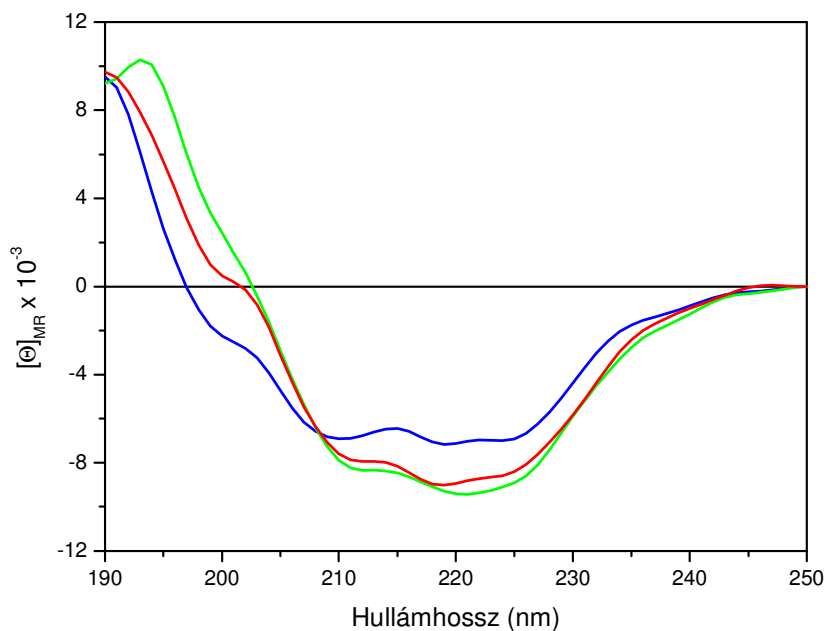


**15. ábra.** Az enzim  $I_{\max}$  értékének változása tetrahidrofurán/víz elegyben —x—. Standardként *N*-ac-Trp-etilészter —+— szolgált. A méréseket 2 órás 25 °C-os inkubálást követően végeztük.

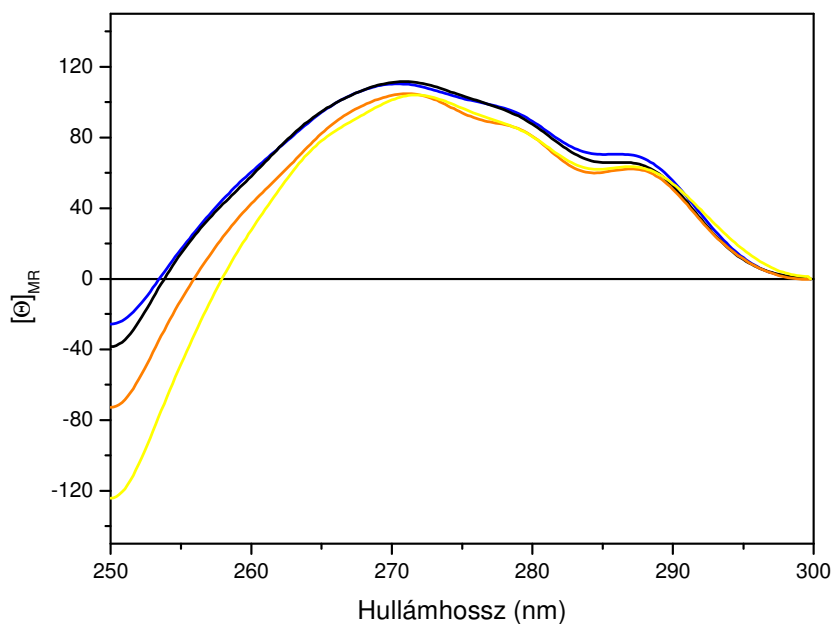
#### 4.1.4.2. Cirkuláris dikroizmus mérések eredménye

Távoli-UV-CD-mérésekkel vizsgáltuk az enzim másodlagos szerkezeti elemeinek változását. A 16. ábra a papain távoli-UV-CD-spektrumát mutatja vizes közegben, 90 tf% etanolban és ACN-ben. A THF ebben a hullámhossz-tartományban nagy abszorbanciával rendelkezik, ezért távoli-UV-CD-mérések nem végezhetők benne. Vízben az enzim a natív szerkezetre jellemző spektrális karakterisztikával rendelkezett, 190 nm környékén pozitív, 208 és 220 nm-nél negatív sávval. 90 tf% etanolban és ACN-ben a negatív CD-sávok intenzitása nőtt, a két oldószerben mért spektrumokban nem tapasztaltunk jelentős különbséget.

Szerves oldószeres közegben meghatároztuk az enzim közeli-UV-CD-spektrumát is a 250–300 nm-es hullámhossz-tartományban, amely a fehérje harmadlagos szerkezetére ad felvilágosítást. A papain natív állapotát egy jól definiálható pozitív CD-spektrum írja le három pozitív sávval 271, 279 és 287 nm-nél (Naeem és mtsai., 2006). A pozitív CD-spektrum az aromás kromofórok (Trp és Tyr) nagy mennyiségének és az aszimmetrikus diszulfidhidaknak tulajdonítható. A sávintenzitása nagymértékben függ az aromás oldalláncok kölcsönhatásaitól,

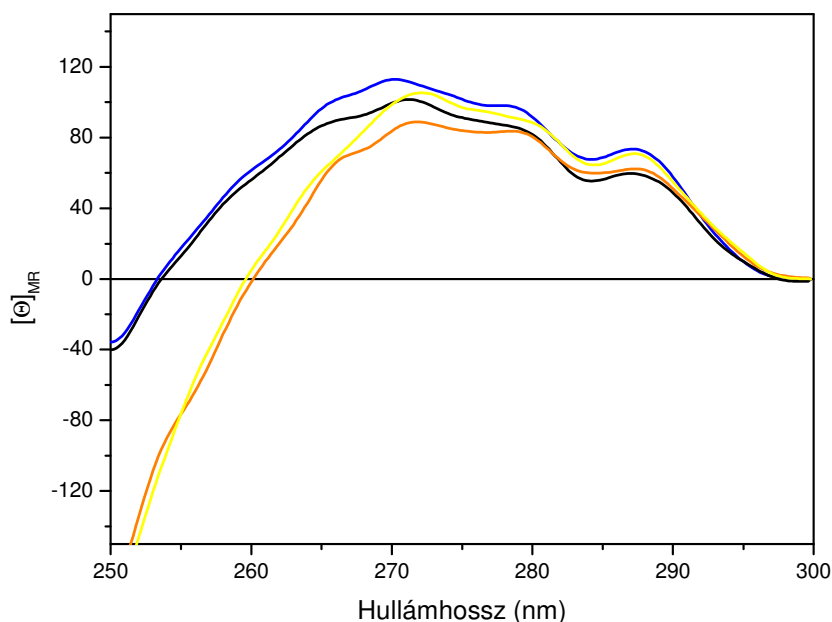


**16. ábra.** A papain távoli-UV-CD-spektruma vizes közegben —, 90 tf% etanolban — és acetónitriben — pH 6,2-en 120 perc inkubálás után.

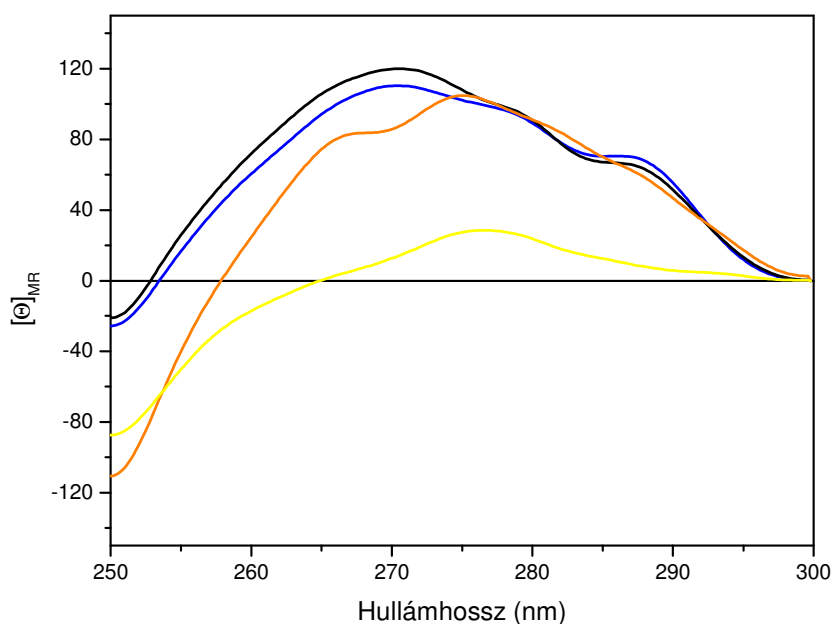


**17. ábra.** A papain közeli-UV-CD-spektruma etanolos közegben 120 perc inkubálás után (pH 6,2; 25 °C): 0 —, 30 —, 70 —, 90 tf% — etanol.

pozícióját pedig a közeg polaritása befolyásolja. A nem vizes környezet általában a sávok hosszabb hullámhossz felé történő eltolódását eredményezi. A 17. ábra a papain közeli-UV-CD-spektrumát mutatja etanolos közegben az oldószer-koncentráció függvényében. A szervesoldószer-koncentráció növelésével a sávok pozíciója nem változott jelentős mértékben. Csupán a rövidebb hullámhossz-tartományban (260 nm alatt) tapasztaltunk eltérést az intenzitásban, ami valószínűleg a diszulfid-kromofórok környezetének változásából adódhat. Valamivel nagyobb spektrális változásokat mutattunk ki 70–80 tf% ACN-ben, amikor a vizes közegben tapasztalt 270–273 nm-es sáv hosszabb hullámhossz felé toldott (18. ábra). A legjelentősebb spektrális különbségeket THF/víz elegyben mértük, melyet a 19. ábra mutat. A CD-spektrumok intenzitása fokozatosan csökkent a THF koncentráció növelésével. A legjelentősebb változást a 70–90 tf% koncentráció-tartományban kaptuk, amikor is a natív papainra jellemző CD-sávok gyakorlatilag teljesen hiányoztak a spektrumokból.



**18. ábra.** A papain közeli-UV-CD-spektruma acetonitril/víz elegyben 120 perc inkubálás után pH 6,2-en, 25 °C-on: 0 —, 30 —, 70 —, 80 tf% — acetonitril.

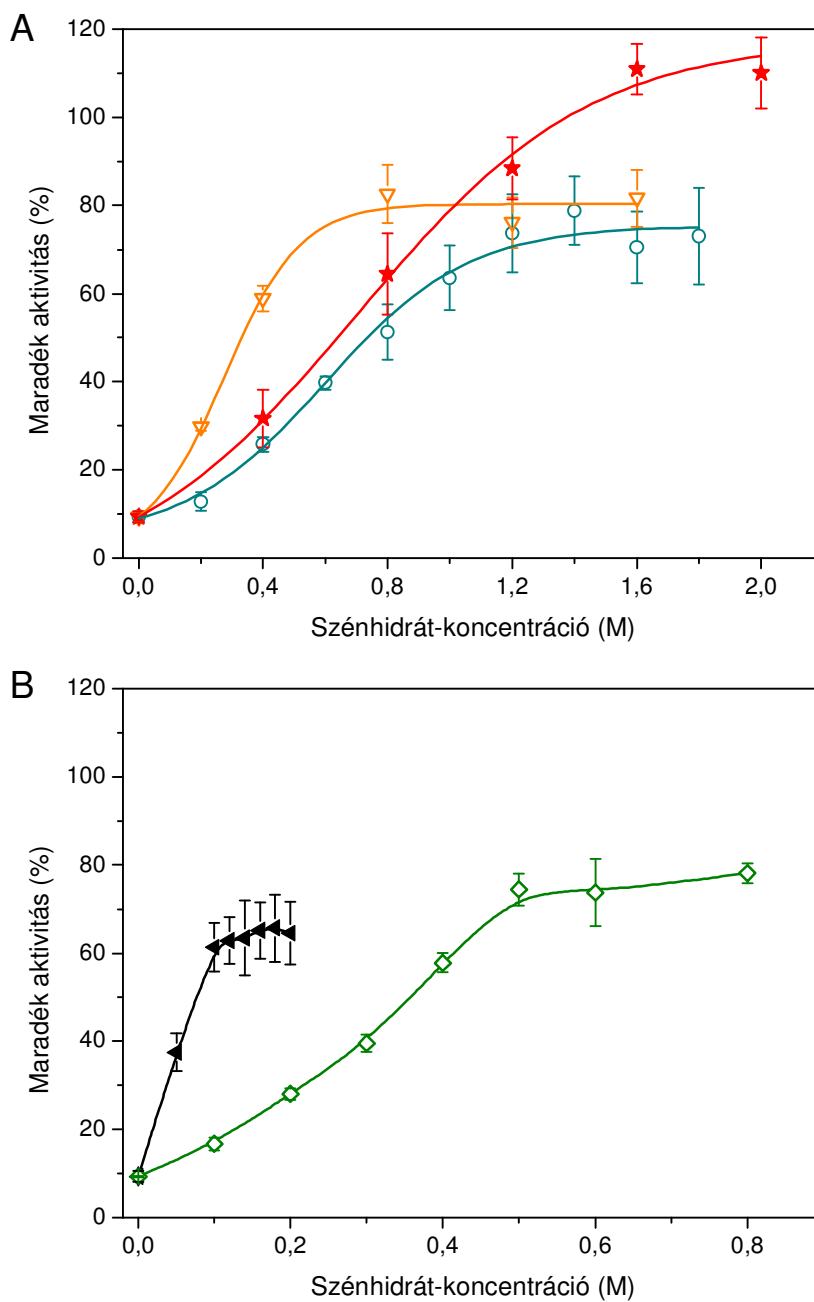


**19. ábra.** A papain közeli-UV-CD-színképe tetrahidrofurán/víz elegyben: 0 —, 30 —, 70 —, 90 tf% — tetrahidrofurán. A méréseket 120 perc inkubálás után pH 6,2-en 25 °C-on végeztük.

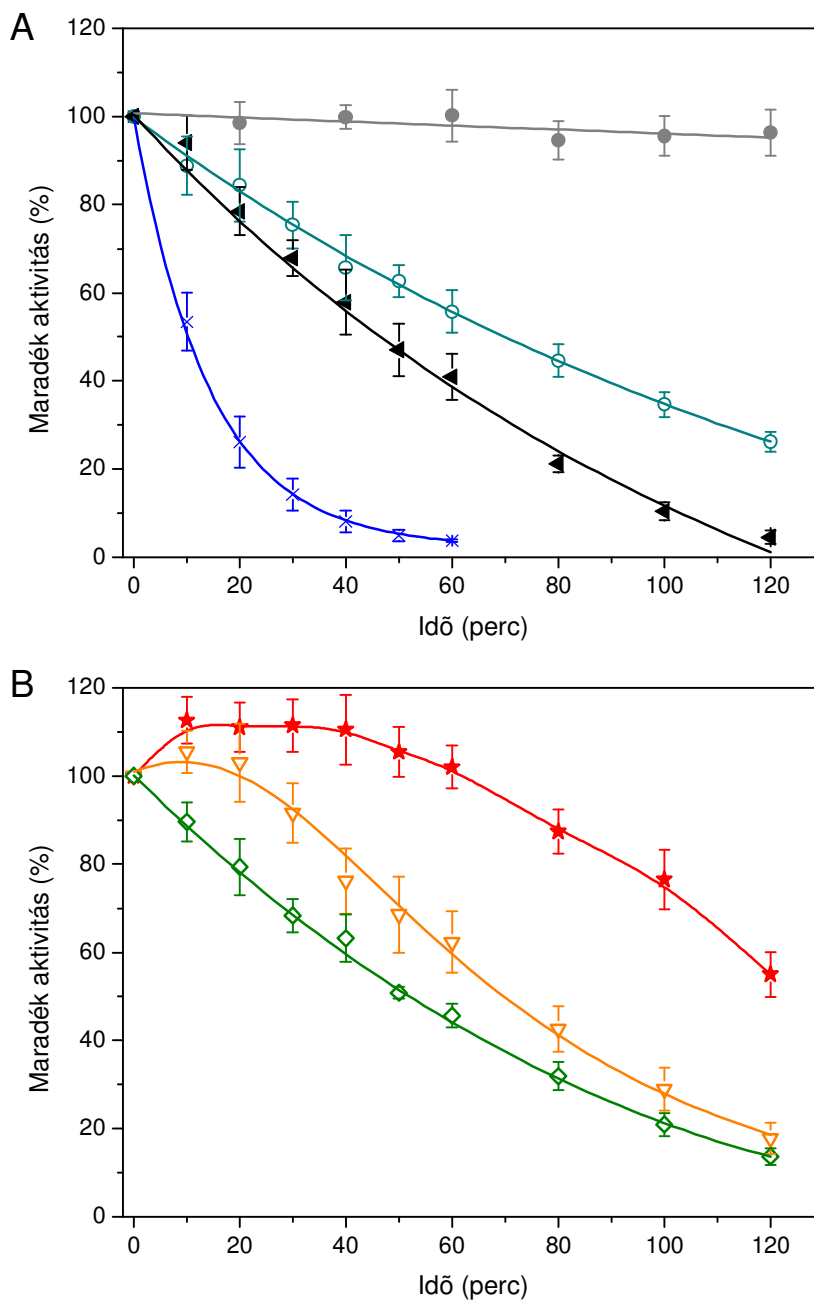
## 4.2. SZÉNHIDRÁTOK SZEREPE A PAPAIN STABILIZÁLÁSÁBAN

### 4.2.1. Szénhidrátok hatása a papain aktivitására és stabilitására

A vizsgált vízzel elegyedő szerves oldószerek többsége nem okozott drasztikus enzimaktivitás-változást, a THF azonban már kis koncentrációban inaktíválta az enzimet (6. ábra). Feladatunk az volt, hogy a polihidroxi-vegyületek közé tartozó szénhidrátok segítségével fokozzuk az enzim stabilitását THF-es közegben. Stabilizálószerként a monoszacharid D-fruktózt, D-glükózt, D-ribózt, D-maltózt, D-galaktózt és D-szorbitot; a diszacharid D-szacharózt és D-laktózt; a triszacharid D-raffinózt; valamint a PEG<sub>20000</sub> poliolt választottuk. Közülük jelentős hatással a ribózt, a glükózt, a fruktózt, a szacharózt és a raffinózt rendelkeztünk, az eredményeket a koncentráció függvényében a 20. ábrán tüntettük fel. 60 tf% THF-ben a papain aktivitása 30 perc alatt  $10 \pm 1\%$ -ra csökkent. A szénhidrátok koncentrációjuk függvényében szigmoid görbe szerint stabilizáltak. A fruktóz koncentráció 1,2 M-ig növelésével az enzimaktivitás egyre inkább megőrződött 60 tf% THF-ben 30 perces inkubálás alatt, ahol elért egy maximális kb. 70–75%-os értéket (20/A. ábra). A glükóz maximális stabilizáló hatását már kisebb koncentrációban (0,8 M) elérte, amely során az aktivitás  $83 \pm 7\%$ -a maradt meg THF-es közegben (20/A. ábra). Az enzim aktivitásából legkevésbé a ribózt tartalmazó THF/víz elegyben veszített, 1,6 M ribózt



**20. ábra.** Szénhidrátok (A) D-fruktóz —○—, D-glükóz —▽—, D-ribóz —★—, és (B) D-szacharóz —◇—, D-raffinóz —◄— hatása a papain stabilitására 60% tetrahidrofuránban 30 perc inkubálást követően pH 8,0-en 25 °C-on.



**21. ábra.** A papain stabilitása (A) foszfát pufferben (pH 8,0) —●— és 60 tf% tetrahydrofuranban (pH 8,0) —x— szénhidrátok nélkül, ill. azok jelenlétében: 1,4 M D-fruktóz —○—, 0,16 M D-raffinóz —▲—, valamint (B) 0,8 M D-glükóz —◇—, 1,6 M D-ribóz —▽—, 0,5 M D-szacharóz —★—.

koncentráció fölött ugyanis a papain teljesen megőrizte aktivitását 60 tf%-os szerves oldószerben (20/A. ábra). A monoszacharidokhoz képest a diszacharid szacharóz már 0,5 M, a triszacharid raffinóz pedig 0,1 M koncentrációban kifejtette maximális stabilizáló hatását, amely a kiindulási aktivitás  $74 \pm 4$ , ill.  $65 \pm 6\%$ -a volt (20/B. ábra).

A szénhidrátok stabilizáló hatásának időbeli változását 60 tf% THF-ben a 21. ábra szemlélteti. Vizes közegben nem csökkent jelentősen a papain stabilitása 120 perc alatt, ezzel szemben 60 tf% THF-ben már 60 perc alatt teljesen inaktiválódott az enzim (21/A. ábra). A szénhidrátok az inaktiválódás sebességét csökkentették. A legkisebb stabilizáló hatással a 0,16 M-os raffinóz, míg a legnagyobb az 1,6 M-os ribóz rendelkezett. Ribóz jelenlétében az inkubálás első 40 percében mintegy 10%-os aktiválódás volt megfigyelhető a kezdeti időpillanatban mérthez képest, majd ezt követően fokozatos aktivitásvesztés történt, de még 2 óra elteltével is megmaradt a kezdeti aktivitás  $55 \pm 5\%$ -a (21/B. ábra). A raffinózhoz hasonló stabilizáló hatást mutatott az 1,4 M-os fruktóz, a 0,8 M-os glükóz és a 0,5 M-os szacharóz (21/A és B. ábra). A 60 tf% THF-ben tapasztaltnál hasonlóan raffinóz, szacharóz és fruktóz jelenlétében exponenciálisan csökkent az enzim aktivitása. Az inaktiválódás azonban jóval lassúbb volt: 120 perc elteltével a raffinóz, a szacharóz és a fruktóz tartalmú minták aktivitásának mintegy  $5 \pm 2$ ,  $14 \pm 2$ , ill.  $26 \pm 2\%$ -a maradt meg. A glükóz a ribózhoz hasonlóan kezdetben kismértékben növelte az enzimaktivitást, 30 perc elteltével azonban a papain aktivitása az előzőekhez hasonlóan csökkent.

60 tf% THF-ben szénhidrátok jelenlétében meghatároztuk az enzim inaktiválódásának termodinamikai paramétereit, mely alkalmas arra, hogy a különböző stabilizálók hatását összehasonlítsuk. Az eredményeket a 2. táblázat foglalja össze. A  $\tau$  azt az időt adja meg, amely alatt az aktivitás 90%-a elveszett. 60 tf% THF-ben 39,0 perc alatt az aktivitás erre az értékre csökkent, ellentétben a foszfát pufferre számolt 83,3 órával. A THF/víz elegyben szénhidrátok jelenlétében néhány órára tehető a papain aktivitásának tizedére csökkenése: 0,16 M-os raffinóz jelenlétében 2,0 óra, míg 1,6 M-os ribóz jelenlétében 3,9 óra. Az időállandóval összhangban vannak az inaktiválódás Gibbs-féle szabadenergia változás ( $\Delta\Delta G^\ddagger_i$ ) értékei. A  $\Delta\Delta G^\ddagger_i$  érték növekedése az enzim stabilitásnövekedését jelenti. A  $\Delta\Delta G^\ddagger_i$  értékek alapján megállapítható, hogy 60 tf% THF-ben a polihidroxi-adalékanyagok közül az 1,6 M-os ribóz jelenlétében volt legstabilabb az enzim.



**2. táblázat.** A papain termodinamikai paramétereinek változása 60 tf% tetrahydrofuranban különböző szénhidrátok jelenlétében.

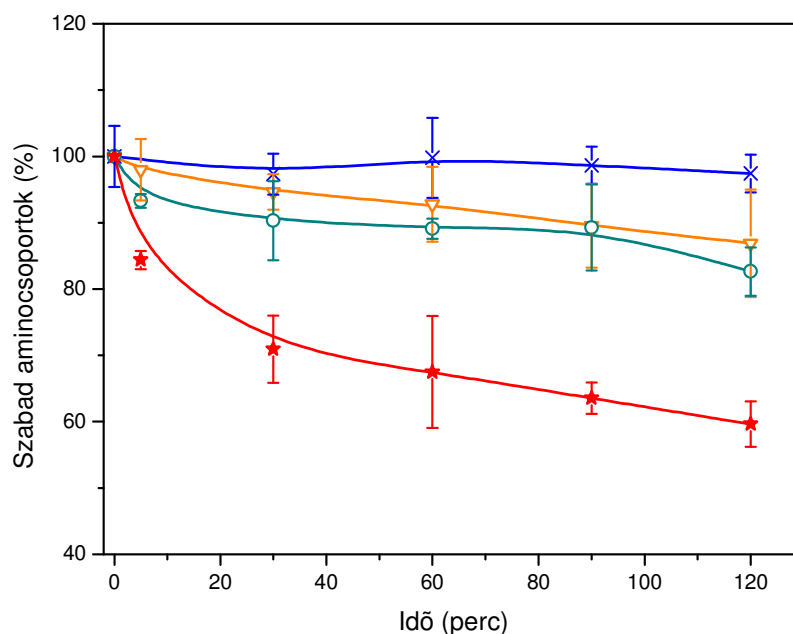
Összetétel	$\tau_i$ (h)	$\Delta\Delta G_i^\ddagger$ (kJ/mol)
víz (pH 8,0)	83,33	12,03
60% THF	0,65	0,00
60% THF + 0,16 M raffinóz	2,03	2,83
60% THF + 0,8 M glükóz*	2,19	3,02
60% THF + 0,5 M szacharóz	2,53	3,37
60% THF + 1,4 M fruktóz	3,61	4,26
60% THF + 1,6 M ribóz*	3,89	4,43

\* Az enzimaktiválódást követően a termodinamikai paramétereket attól az időpillanattól számoltuk, amikor az enzimaktivitás visszatért 100%-ra.

A szénhidrátok stabilizáló hatását vízzel nem vagy csak részben elegyedő szerves oldószerekben, etilacetátban, *n*-hexánban és toluolban is megvizsgáltuk, de az aktivitásvesztést ezekben a szerves oldószerekben nem sikerült kivédeni. A papain stabilitását D-maltóz, D-galaktoz, D-laktóz, D-szorbit és PEG<sub>20000</sub> segítségével is próbáltuk növelni, ezek a polihidroxi-molekulák azonban nem befolyásolták azt.

#### 4.2.2. A papain szabad primer aminocsoportjainak változása

A redukáló cukrok Schiff-bázis kialakítására képesek fehérjék primer aminocsoportjaival, melyek a polipeptidlánc N-terminális aminosaván és a lizil-oldalláncokon találhatóak. A 22. ábra a papain szabad primer aminocsoportjainak mennyiségi változását mutatja az idő függvényében 60 tf% THF-ben 0,4 M-os D-fruktóz, 0,2 M-os D-glükóz és 0,8 M-os D-ribóz jelenlétében, ill. azok nélkül. 60 tf% THF-ben nem változott a szabad aminocsoportok száma a 120 perc inkubálás során. Fruktóz és glükóz jelenlétében mennyiségük körülbelül 13–17%-kal csökkent 2 óra alatt, ribóz jelenlétében viszont jelentősen csökkent az aminocsoport-mennyiség már 5 perc inkubálás után. Két óra elteltével ribóz hatására  $40 \pm 3\%$ -os aminocsoportszám csökkenést mértünk. A további inkubálás során a fruktóz és a glükóz tovább már nem csökkentette az aminocsoportok számát, ribóz jelenlétében azonban egyre kevesebb szabad aminocsoportot detektáltunk, és 24 óra elteltével a ribóz a kezdeti érték kb. 20%-ára csökkentette a szabad aminocsoportok mennyiségét.

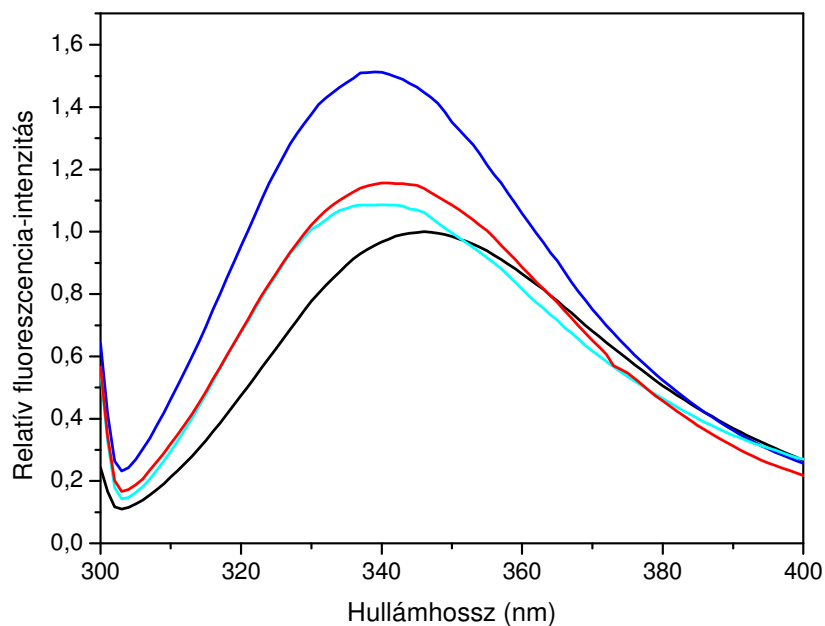


**22. ábra.** A papain szabad primer aminosoportjainak változása az idő függvényében 60 tf% tetrahydrofuranban (pH 8,0) szénhidrátok nélkül —×—, 0,4 M D-fruktóz —○—, 0,2 M D-glükóz —▽—, 0,8 M D-ribóz —★— jelenlétében.

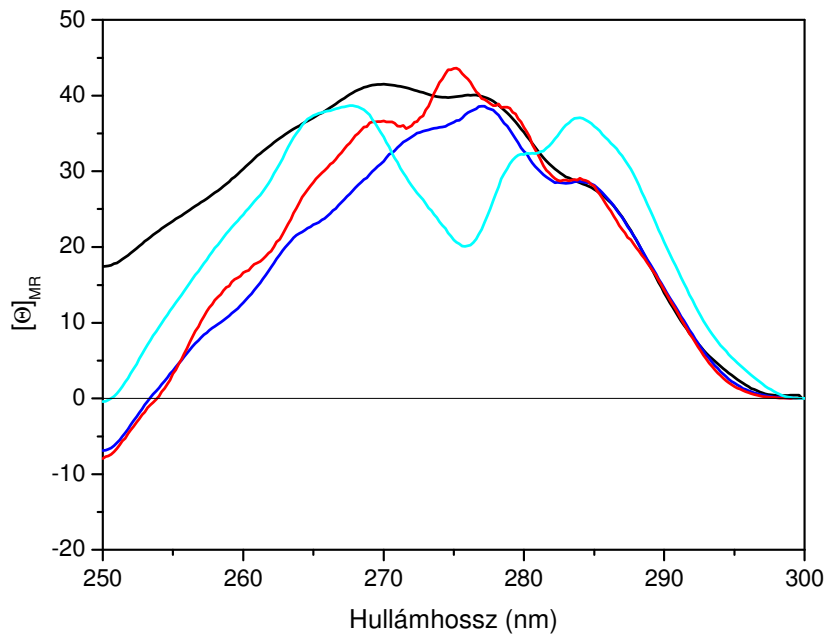
### 4.2.3. Szénhidrátok hatása a papain szerkezetére tetrahydrofuran/víz elegyben

#### 4.2.3.1. Szénhidrátok hatása az enzim triptofán-fluoreszcenciájára

A szénhidrátok jelenléte növelte az enzim stabilitását THF/víz elegyben. Azért, hogy tisztázzuk, milyen változások lehetnek ennek hátterében, megvizsgáltuk a papain belső-fluoreszcencia-paramétereire kifejtett hatásukat is. A 23. ábra a papain triptofán-fluoreszcenciáját mutatja vizes közegben és THF/víz elegyben szénhidrátok nélkül, ill. azok jelenlétében. Összhangban a korábbi mérésekkel 60 tf% THF-ben az  $I_{\max}$  érték jelentősen, kb. 1,50-szeresre nőtt a vizes közegben tapasztaltnál képest. Az intenzitásnövekedést a színkép 7 nm-es rövidebb hullámhossz felé történő eltolódása követte, ami elsősorban a közeg polaritásváltozásának tulajdonítható. 60 tf% THF-ben 0,8 M-os D-ribóz és 0,4 M-os D-fruktóz jelenlétében az  $I_{\max}$  érték kisebb mértékű (1,16- és 1,09-szeres) növekedését tapasztaltuk a vizes közegben mérthez képest. Szénhidrátok jelenlétében a kisebb változás a Trp-oldalláncok papain belsejébe történő eltemetődésére utal. 0,2 M-os D-szacharóz jelenlétében is végeztünk méréseket, ahol az  $I_{\max}$  értékben nem tapasztaltunk jelentős különbséget a 60 tf% THF-ben mérttől, ami arra utal, hogy a szacharóz csak minimális stabilizáló hatást fejt ki a papain szerkezetére.



**23. ábra.** A papain triptofán-fluoreszcenciája 3 mM foszfát pufferben (pH 8,0) —, 60 tf% tetrahydrofuranban szénhidrát nélkül —, ill. 0,4 M D-fruktóz — és 0,8 M D-ribóz — jelenlétében



30 perces 25 °C-os inkubálás után.

**24. ábra.** A papain közeli-UV-CD-spektruma 5 mM-os foszfát pufferben (pH 8,0) —, 60 tf% tetrahydrofuranban szénhidrát nélkül —, ill. 0,4 M D-fruktóz — és 0,8 M D-ribóz — jelenlétében 30 perces 25 °C-os inkubálás után.

#### 4.2.3.2. Szénhidrátok hatása az enzim harmadlagos szerkezetére

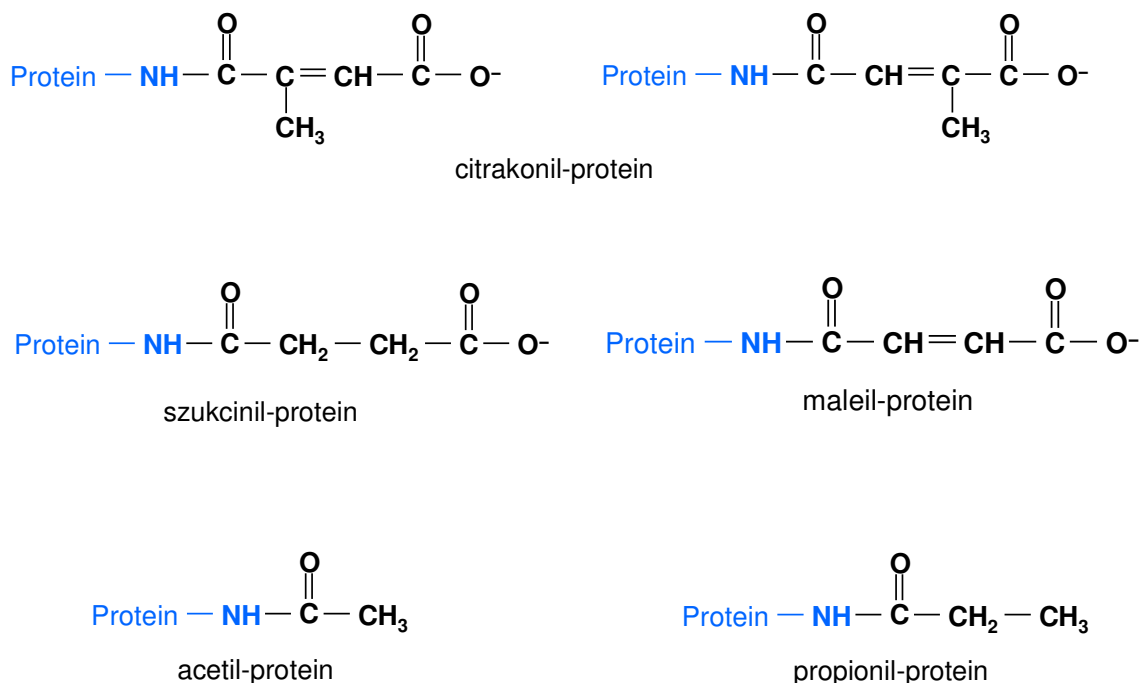
0,8 M-os D-ribóz és 0,4 M-os D-fruktóz jelenlétében közeli-UV-CD-méréseket is végeztünk, melyet a 24. ábra mutat. Vizes közegben a papain natív szerkezetére utaló pozitív CD-spektrumot kaptunk. 60 tf% THF-ben a 250–280 nm-es tartományban a CD-sávok intenzitása a vizes közegben mérthez képest csökkent. A THF-ben rögzített spektrum a papain inaktív konformációjára utal. 60 tf% THF-ben fruktóz jelenlétében a natív és az inaktív enzim spektrumától eltérő színeképet detektáltunk két maximummal 267 és 285 nm környékén, és egy minimummal 275 nm-nél. THF-es közegben ribóz jelenlétében is mind a natív, mind az inaktív állapotra jellemző spektrumtól eltérőt kaptunk a 250–280 nm-es hullámhossz-tartományban, a spektrum ez esetben 275 nm környékén egy maximumot adott.

### 4.3. SZERVES SAVANHIDRIDEK SZEREPE A PAPAIN STABILIZÁLÁSÁBAN

#### 4.3.1. Kémiai módosítás karbonsav-anhidridekkel

Kémiai módosításokkal is növelhető az enzimek stabilitása. A karbonsav-anhidridek stabil kovalens kötés kialakításával acilálni képesek a fehérjék primer aminocsoportjait, lizil-oldalláncait. Kísérleteinkben monokarbonsav- (ecetsav- és propionsav-anhidrid), valamint dikarbonsav-anhidrideket (citrakonsav-, maleinsav- és borostyánkősav-anhidrid) használtunk a papain módosításához. A módosult aminocsoportokat a 25. ábrán szemléltetjük. A monokarbonsav-anhidridek a kémiai reakció során semlegesítik a lizil-oldalláncok pozitív töltését, míg a dikarbonsav-anhidridek negatív töltést visznek be a fehérje szerkezetébe. Az anhidridek stabil származékot képezve SH-csoportokkal is reagálhatnak. A papainban egyetlen szabad SH-csoport van, ami a katalízisben játszik szerepet. A módosítás során azonban ez a csoport védve volt, így nem léphetett reakcióba aciláló reagenssel. A felhasznált anhidridek közül a citrakonsav-anhidrid reakciója során kétféle terméket képezhet, a többinek viszont csak egyféle származéka keletkezik (25. ábra). A borostyánkősav-anhidridből származó szukcinilcsoportok, továbbá az acetil- és propionilcsoportok telítettek, míg a citrakonil- és maleilcsoportok telítetlenek.

A papain–anhydrid molarányát minden esetben optimalizáltuk, hogy a leghatékonyabb enzimformákat hozzuk létre a módosítás körülményei között. A kémiai módosítások után 2,4,6-

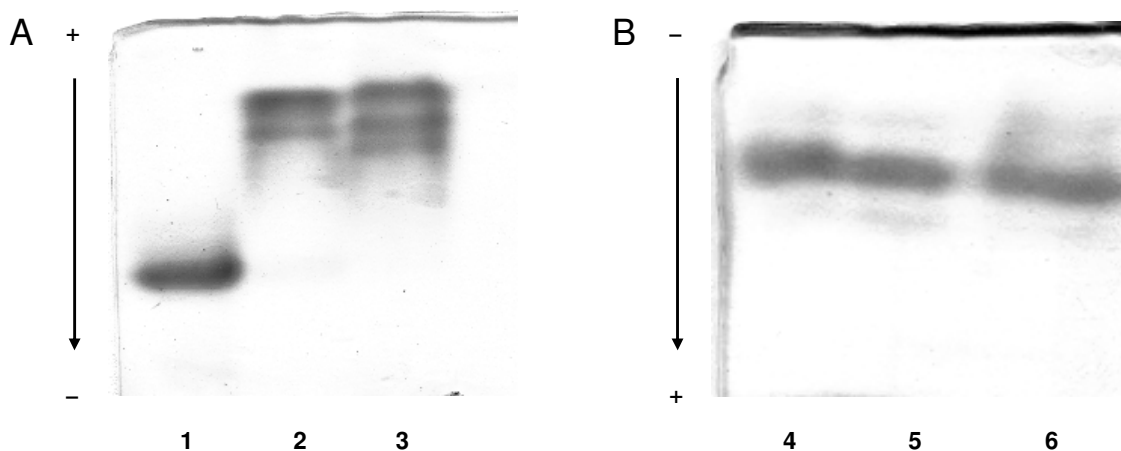


**25. ábra.** Mono- és dikarbonsav-anhidridek acil-termékei, módosult primer aminos csoportok.

trinitrobenzol-szulfonsavas reakcióval meghatároztuk a papain primer aminos csoport-tartalmát. A kapott eredményeket a 3. táblázatban foglaltuk össze. A papain 10 lizil-oldalláncot és 1 N-terminális aminos csoportot tartalmaz, melyekből átlagosan 7–10 módosult. A legkevesebb aminos csoport a citrakonsav-, míg a legtöbb a maleinsav-anhidrides módosításnál acilálódott. A módosítások után átlagosan 2–3 enzimforma dominált a mintákban, melyeket natív poliakrilamid gélelektroforézissel mutattunk ki (26. ábra). A kontroll, az acetil- és a propionil-papain a katód felé, a szukcinil-, a citrakonil- és a maleil-papain pedig az anód felé vándorolt az elektroforézis során. A natív enzim 24 pozitív és 13 negatív töltéssel rendelkezik aminosav-oldalláncai révén, ami katód felé történő elmozduláshoz vezet. A monokarbonsav-anhidrides módosítás során 9–10

**3. táblázat.** Acilált primer aminos csoportok száma papain molekulánként.

Módosító szer	Módosult aminos csoportok száma
Citrakonsav-anhidrid	7,95 ± 0,54
Maleinsav-anhidrid	9,71 ± 0,47
Borostyánkősav-anhidrid	9,23 ± 0,14
Ecetsav-anhidrid	8,96 ± 0,37
Propionsav-anhidrid	9,17 ± 1,28



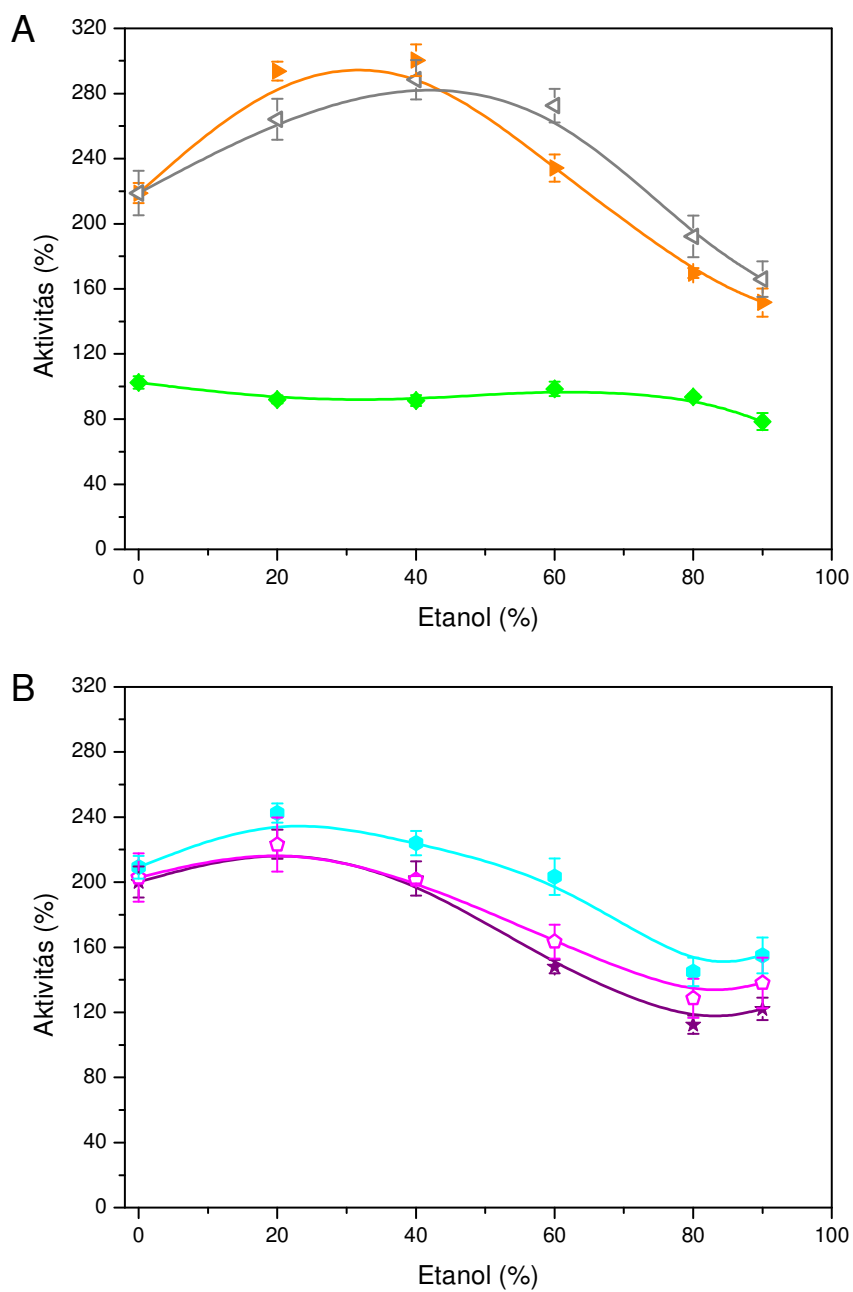
**26. ábra.** Acil-enzimformák natív poliakrilamid gélelektroforetikus mintázata: (A) 1 – kontroll, 2 – acetil-, 3 – propionil- és (B) 4 – szukcinil-, 5 – citrakonil-, 6 – maleil-papain.

aminocsoport semlegesítődött, ennek köszönhetően a papain pozitivitása csökkent, ami a katód irányába történő vándorlási sebesség mérséklődéséhez vezetett. A dikarbonsav-anhidrides módosítások alkalmával 7–10 pozitív csoport vált negatívvá, ami nettó negatív töltésű enzimformákat eredményezett. Ezek az enzimformák az anód felé vándoroltak közel azonos sebességgel.

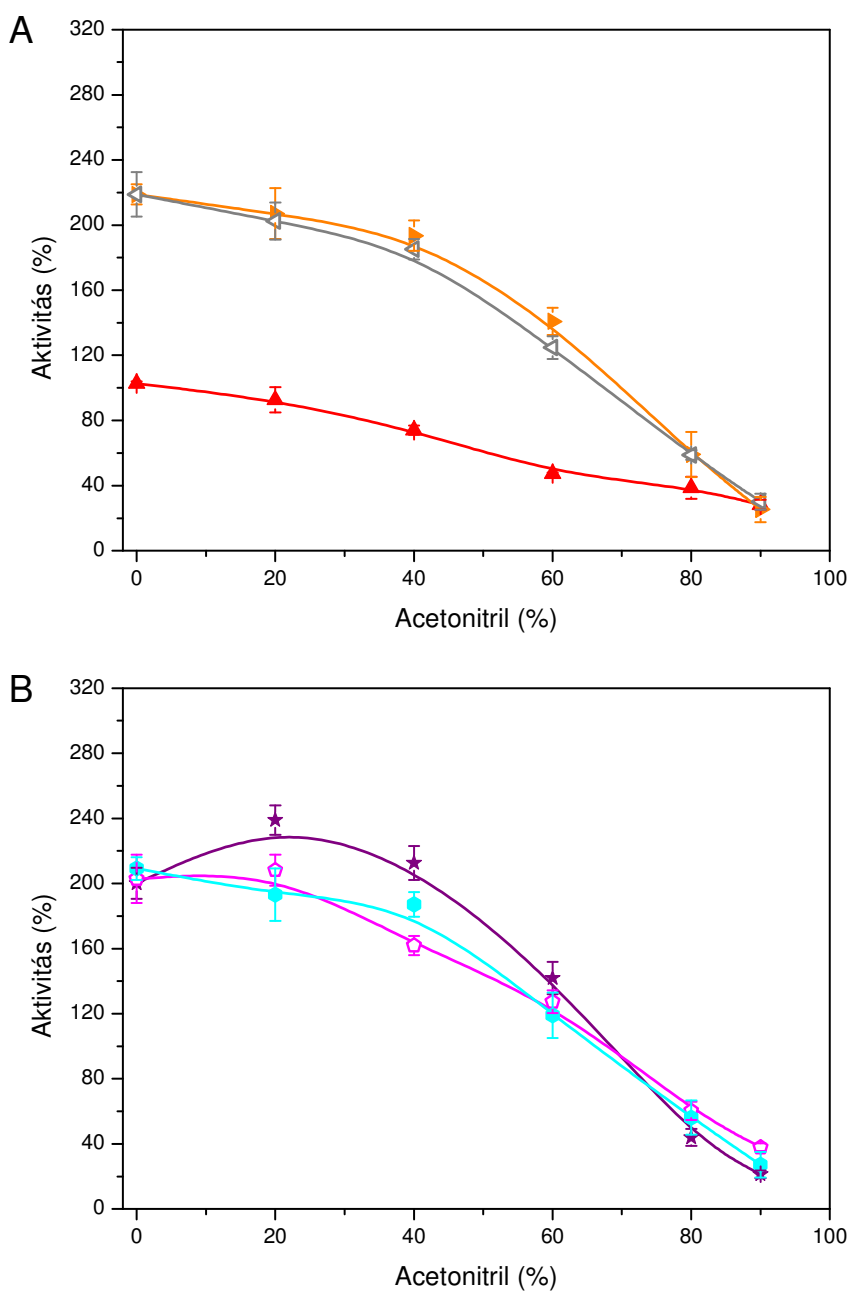
#### 4.3.2. A módosított enzimformák aktivitása szerves oldószeres közegben

A kémiai módosítások az enzim aktivitásának 1,9–2,2-szeres növekedését eredményezték pH 8,0-as 5 mM-os foszfát pufferben, 25 °C-on. Az aktivitásnövekedés a monokarbonsav-anhidriddel módosított enzimformáknál valamelyest nagyobb volt a dikarbonsav-anhidriddel módosítottnál. Összehasonlítottuk az acil-enzimformák 30 perc inkubálás után mért aktivitását etanolos, ACN-es és THF-es közegben egyaránt. Általánosan jellemző volt, hogy az egyes mono-, ill. dikarbonsav-anhidriddel módosított enzimformák aktivitása nagyon hasonló volt egymáshoz.

Etanol/víz elegyben az acilált papainformák aktivitását a 27. ábra mutatja. A módosított enzimformák etanolos közegben őrizték meg leginkább aktivitásukat. Az etanol koncentráció növekedésével a kontroll enzim aktivitása jelentősen nem változott. Az acil-enzimformák jóval nagyobb aktivitással bírtak etanol/víz elegyben a kontroll enzimmél még a nagy szervesoldószer-koncentrációkban is. 0–60 tf% etanolban az acetil- és a propionil-papain nagyobb aktivitással rendelkezett a dikarbonsav-anhidriddel módosított enzimformáknál (27/A. ábra). 40 tf% koncentrációban aktivitásuk elérte a 288–300%-ot, míg a kontroll enzim aktivitása  $91 \pm 3\%$  volt.

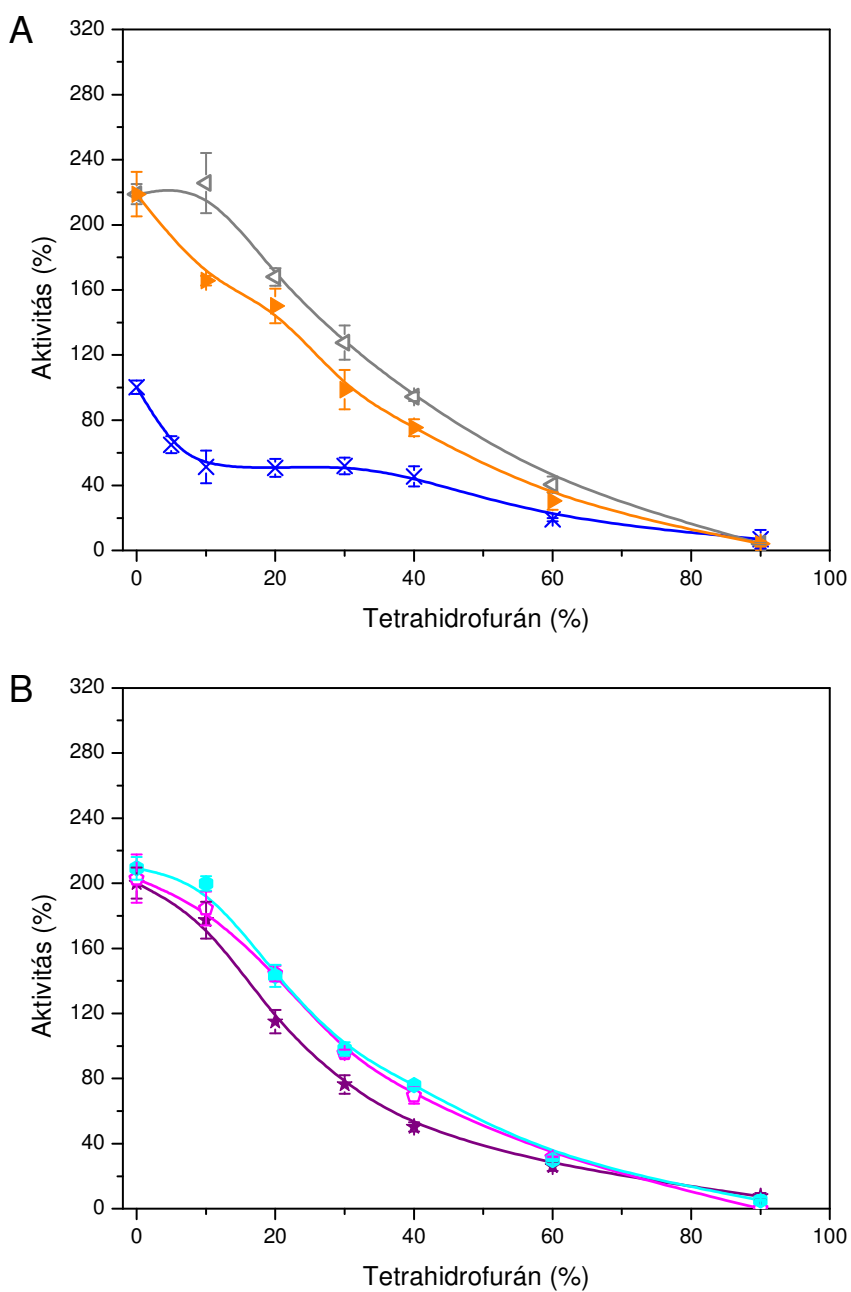


**27. ábra.** A mono- és dikarbonsav-anhidridekkel módosított papain aktivitása etanol/víz elegyben (pH 8,0) 30 perc inkubálás után 25 °C-on: (A) kontroll —♦—, acetil- —▶—, propionil- —◁—, (B) citrakonil- —★—, maleil- —◻—, szukcinil- —●— papain.



**28. ábra.** Acilált enzimformák aktivitása acetonitril/víz elegyben (pH 8,0) 30 perc inkubálást követően 25 °C-on: (A) kontroll enzim —▲—, acetil- —▶—, propionil- —◁—, (B) citraconil- —★—, maleil- —◻—, szukcinil- —◻—, papain- —●—.





**29. ábra.** (A) kontroll —×—, acetil- —▶—, propionil- —◁— és (B) citraconil- —★—, maleil- —◻—, szuccinil- —●— papain aktivitása tetrahidrofurán/víz elegyben, pH 8,0-en 30 perc inkubálást követően 25 °C-on.

A nagyobb oldószer-koncentrációknál azonban mindkét módosított enzimforma veszített aktivitásából, de még 90 tf% etanolban is a kontroll enzim  $79 \pm 5\%$ -os aktivitásához képest az acetil-papain  $152 \pm 9\%$ -os, míg a propionil-papain  $166 \pm 10\%$ -os aktivitással rendelkezett. A citrakonil-, maleil- és szukcinil-papain aktivitása nagyon hasonló volt ebben a közegben (27/B. ábra). 40 tf% etanol koncentrációig jól megőrizték aktivitástöbbletüket a kontroll enzimhez képest, ennél nagyobb oldószer-koncentrációnál azonban csökkent aktivitásuk, de 90 tf% etanolban is kb. 43–76%-kal aktívabbak voltak a nem módosított enzimmél.

ACN/víz elegyben a módosított papainformák aktivitását a 28. ábrán tüntettük fel. ACN-es közegben az oldószer-koncentráció emelésével a kontroll enzim aktivitása folyamatosan csökkent. A módosított enzimformák aktivitása azonban 40 tf% ACN koncentrációig alig változott, az acil-enzimformák kb. 88–139%-kal nagyobb aktivitással rendelkeztek a kontrollnál. A nagyobb szervesoldószer-koncentrációknál a módosított enzimformák aktivitása viszont jelentősen csökkent, és kisebb aktivitást mutatott, mint etanol/víz elegyben. Megállapítható az is, hogy a monokarbonsav-anhidriddel acilált enzimformák aktivitása ebben a közegben nem volt jobb a dikarbonsav-anhidriddel módosítottnál (28. ábra).

A módosított enzimformák aktivitásukat legkevésbé THF-es közegben őrizték meg, melyet a 29. ábra mutat. A kontroll enzim aktivitása THF/víz elegyben már kis szervesoldószer-koncentrációban jelentősen csökkent. 40 tf% koncentrációig a módosított enzimformák aktivitása szignifikánsan jobb volt a kontroll enziménél. 40 tf% THF-ben a legnagyobb aktivitással az acetil-papain rendelkezett, amely kb. 50%-kal nagyobb aktivitással bírt a kontroll enzimmél. Ez esetben is a mono- és a dikarbonsav-anhidriddel módosított papainformák aktivitásának lefutása nagyon hasonló volt.

#### 4.3.3. Az acil-enzimformák kinetikai paraméterei etanol/víz elegyben

A nem módosított enzimhez képest az acil-enzimformák etanolos közegben rendelkeztek a legjelentősebb aktivitáskülönbséggel. Kíváncsiak voltunk arra, hogyan változnak a papain kinetikai paraméterei ebben a közegben. A méréseket egy mono- és egy dikarbonsav-anhidriddel acilált enzimformával, a propionil- és a citrakonil-papainnal végeztük. A mérési eredményeket a 4. táblázatban tüntettük fel. Meghatároztuk az egyes enzimformák Michaelis-állandóját ( $K_M$ ) és maximális reakciósebességét ( $V_{max}$ ), valamint kiszámoltuk azok katalitikus hatékonyságát ( $k_{cat}/K_M$ ) Tris/HCl pufferben és 10 tf% etanolban (pH 7,0). A kontroll enzimhez képest mindkét

**4. táblázat.** A módosított papainformák kinetikai paramétereit 0,05 M Tris/HCl pufferben (pH 7,0) és 10 tf% etanolban tartalmazó pufferes közegben.

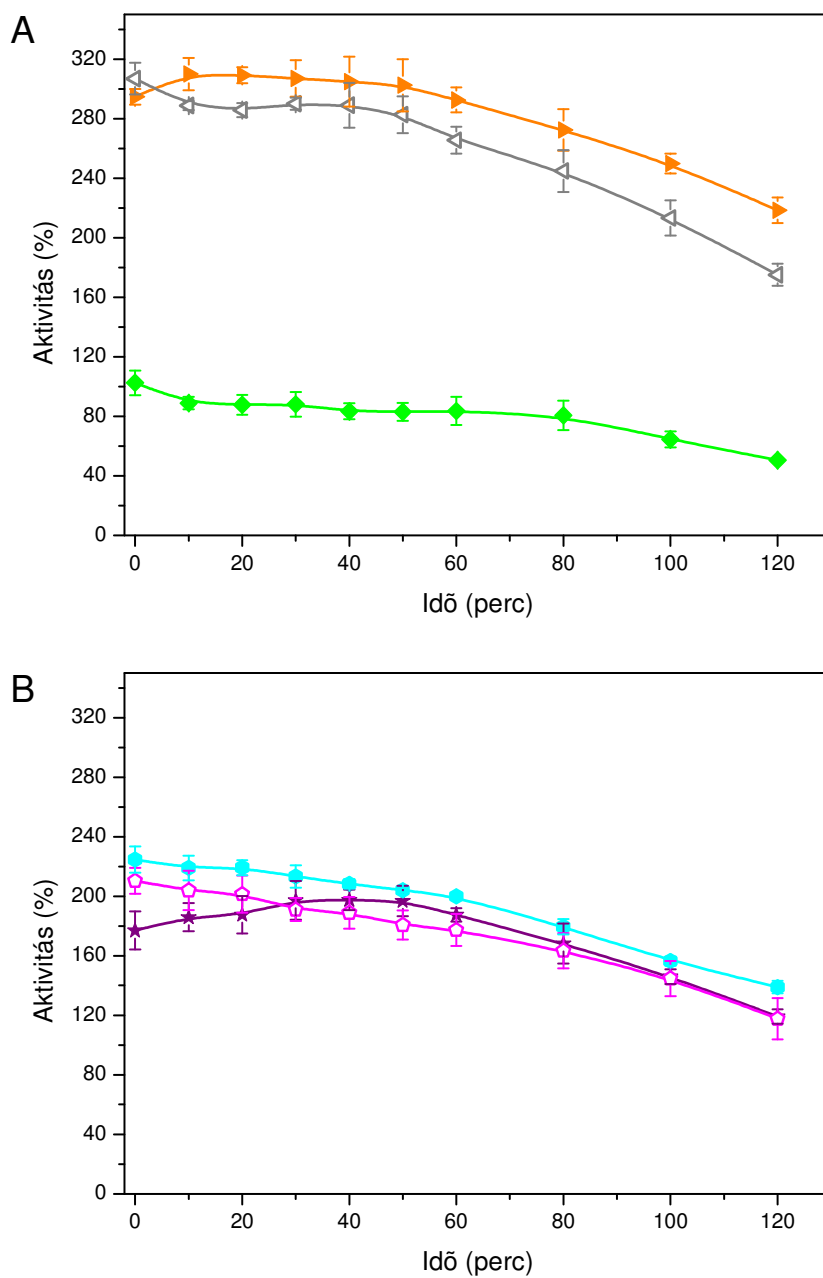
Papain enzimforma	Pufferben (pH 7,0)			10 tf% etanolban (pH 7,0)		
	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ )	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ )	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
kontroll	$1,27 \times 10^{-3}$	$154,3 \pm 2,0$	$4,79 \times 10^3$	$1,16 \times 10^{-3}$	$226,0 \pm 7,4$	$2,99 \times 10^3$
1. módosítás*	$2,66 \times 10^{-3}$	$262,2 \pm 3,6$	$5,91 \times 10^3$	$2,83 \times 10^{-3}$	$298,3 \pm 6,9$	$5,52 \times 10^3$
2. módosítás*	$2,25 \times 10^{-3}$	$214,1 \pm 13,7$	$6,12 \times 10^3$	$2,40 \times 10^{-3}$	$265,9 \pm 5,5$	$5,26 \times 10^3$

\* 1. módosítás – propionsav-anhidriddel módosított; 2. módosítás – citrakonsav-anhidriddel módosított

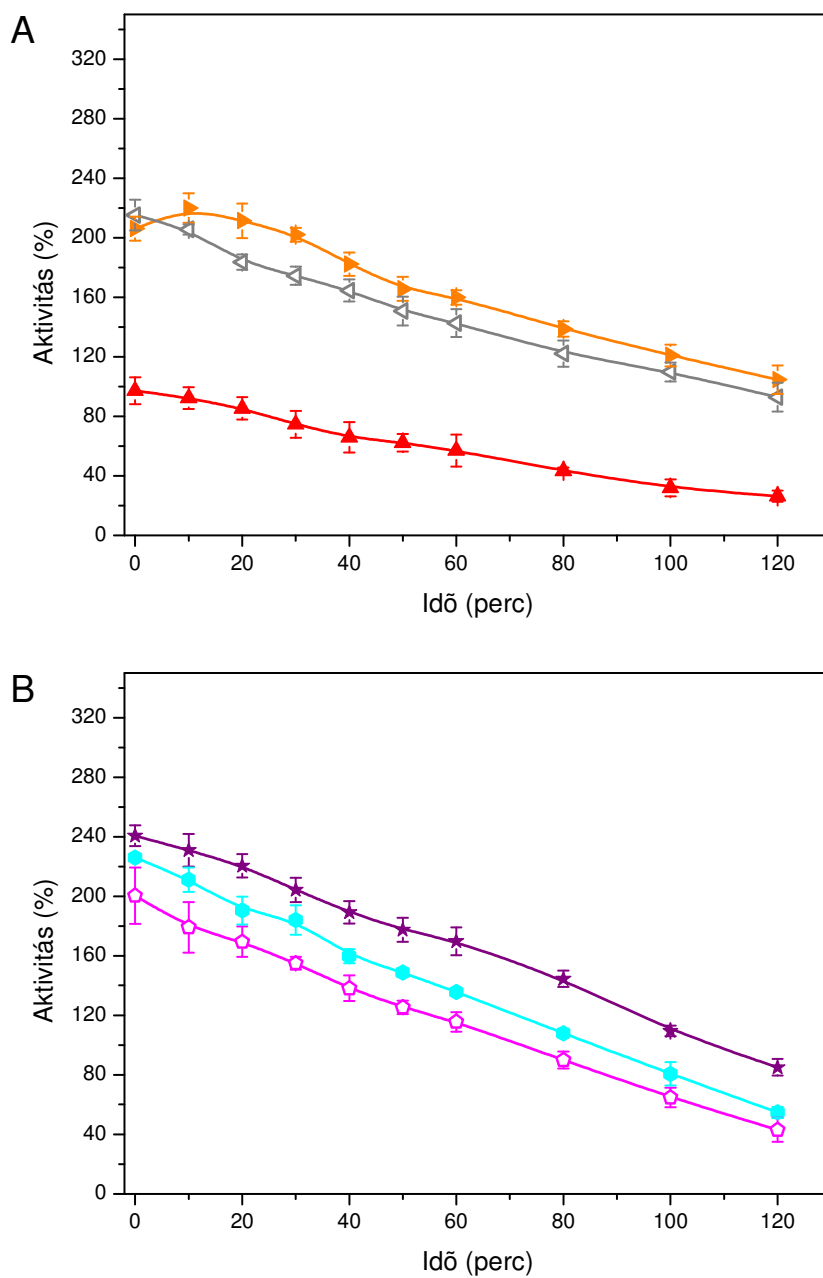
módosított enzimforma  $V_{max}$  értéke nőtt vizes és etanolos közegben egyaránt. A maximális reakciósebesség növekedését mindkét közegben a  $K_M$  érték emelkedése kísérte, ami a szubsztrát enzimhez való affinitásának csökkenésére utal. Amikor meghatároztuk az enzimformák  $k_{cat}/K_M$  értékét mind vizes és etanolos közegben növekedést tapasztaltunk, amely azt igazolja, hogy a módosítások során katalitikusan hatékonyabb enzimformák keletkeztek. A módosítások hatására az enzim hatékonyságában nagyobb különbség volt megfigyelhető 10 tf% etanolban, mint vizes közegben.

#### 4.3.4. Az acil-enzimformák stabilitása szerves oldószeres közegben

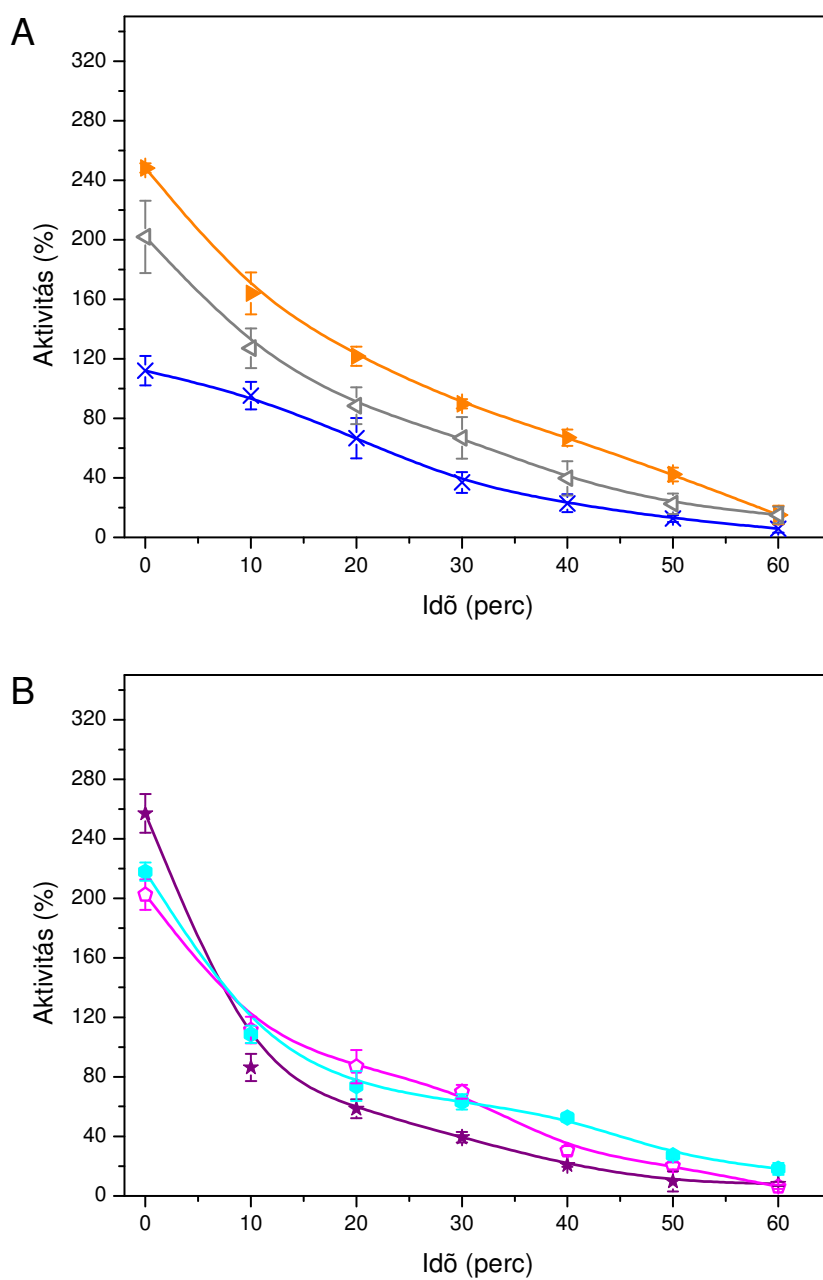
A módosított enzimformák aktivitását az idő függvényében is tanulmányoztuk etanolos, ACN-es és THF-es közegben. 40 tf% etanolban a 30. ábra mutatja a különböző enzimformák aktivitásának időbeli alakulását. A nem módosított enzim 120 perc alatt elvesztette aktivitásának közel 50%-át. Az acilálás az idő függvényében is aktívabb enzimet eredményeztek az összes esetben. A monkarbonsav-anhidrides módosítások egymáshoz nagyon hasonló enzimaktivitáshoz vezettek, és ugyanezt lehet elmondani a dikarbonsav-anhidrides módosításokról is. Megállapítható az is, hogy az acetil- és a propionil-papain a kísérleti idő alatt közel 1,5-szer aktívabb volt a citrakonil-, maleil- és szukcinil-papainnál. 40 tf%-os etanolban a 120 perces inkubálás során legkevésbé stabil a citrakonil- és a maleil-papain volt,  $119 \pm 5$  és  $117 \pm 13\%$ -os aktivitással. Ezeket követte a szukcinil-papain  $139 \pm 4\%$ -kal, míg a propionil- és az acetil-papain  $175 \pm 7$  ill.  $218 \pm 9\%$ -os aktivitással rendelkezett a kontroll enzim  $51 \pm 1\%$ -os aktivitásához képest 2 óra elteltével.



**30. ábra.** Acil-papainformák stabilitása 40 tf% etanol jelenlétében. Az inkubálást pH 8,0-es 5,0 mM-os foszfát pufferben, 25 °C-on 120 percig végeztük. (A) kontroll enzim —◆—, acetil- —▶—, propionil- —◁—, (B) citraconil- —★—, maleil- —◻—, szukcinil- —●— papain.



**31. ábra.** Acil-enzimformák stabilitása 40 tf% acetonitril jelenlétében (5,0 mM foszfát puffer pH 8,0): (A) kontroll enzim —▲—, acetil- —▶—, propionil- —◁—, (B) citrakonil- —★—, maleil- —△—, szukcinil- —●— papain.



**32. ábra.** Karbonsav-anhidridekkel módosított papain stabilitása 40 tf% tetrahydrofuran jelenlétében az idő függvényében pH 8,0-es 5,0 mM-os foszfát fufferben 25 °C-on: (A) kontroll enzim —×—, acetyl- —▶—, propionil- —◁—, (B) citraconil- —★—, maleil- —△—, szukcinil- —●— papain.

A 31. ábra a módosított enzimformák aktivitásának időbeli változását mutatja ACN-es közegben. 40 tf% ACN-ben a kontroll enzim aktivitása 120 perc alatt az etanolos közegben tapasztaltnál nagyobb mértékben,  $26 \pm 4\%$ -ra csökkent. A módosított enzimformák aktivitása az inkubálási idő során ez esetben is végig jobb volt a kontroll enzim aktivitásánál, noha az idő függvényében aktivitásuk jelentősen csökkent. A monokarbonsav-anhidriddel módosított enzimformák aktivitása nem volt jelentősen nagyobb a dikarbonsav-anhidriddel módosítottnál. Az acil-enzimformák stabilitása 120 perc elteltével a következőképpen alakult. A legkevésbé stabil a maleil-papain volt,  $43 \pm 8\%$ -os aktivitással, a szukcinil- és a citrakonil-enzim ennél nagyobb stabilitással ( $55 \pm 4$  és  $85 \pm 6\%$ ) rendelkezett. 2 óra inkubálás után a propionil-papain aktivitása  $93 \pm 9\%$ , míg az acetil-enzimformáé  $105 \pm 9\%$  volt.

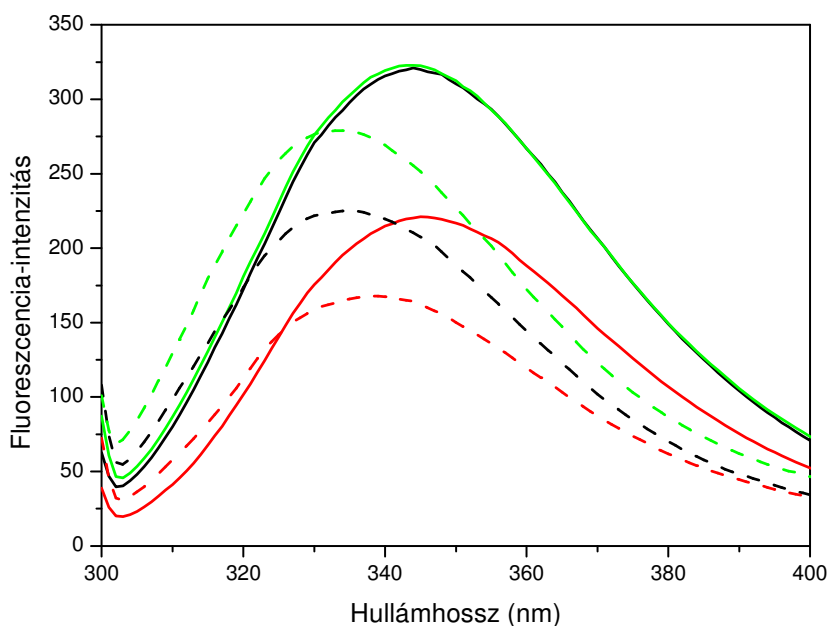
THF-es közegben a módosított papainformák aktivitását az idő függvényében a 32. ábra szemlélteti. A legkevésbé stabil THF-es közegben volt az enzim, 40 tf% THF-ben az enzimaktivitás szinte teljesen elveszett 60 perc alatt. A módosított enzimformák sem tudták aktivitásukat hosszú ideig megőrizni ebben a közegben. A dikarbonsav-anhidriddel módosított papain enzimformák aktivitása gyakorlatilag nem különbözött már 10 perc elteltével a kontroll enzimétől. Az acetil- és propionil-papain valamivel stabilabb volt, noha aktivitásuk az idő függvényében drasztikusan csökkent, 50 percig kismértékben nagyobb volt a nem módosított enziménél.

Stabilitásvizsgálatokat a monokarbonsav-anhidriddel módosított enzimformákkal vízzel nem vagy csak részben elegyedő szerves oldószerekben is végeztünk. 40 tf% toluolban és *n*-hexánban a módosított enzimformák nem rendelkeztek nagyobb stabilitással a kontroll enzimnél. 40 tf% etilacetátban viszont valamelyest stabilabbnak bizonyult az acetil-papain. A papain stabilitását aldehides (benzaldehyd, hexanal, tridekanal) módosításokkal is próbáltuk növelni, de ezek a kísérletek nem jártak sikerrel.

#### **4.3.5. A módosított papain szerkezete szerves oldószeres közegben**

##### **4.3.5.1. Az acil-enzimformák fluoreszcencia-paraméterei**

A mono- és dikarbonsav-anhidrides kémiai módosítások során a papain primer aminocsoportjait aciláltuk. A módosított enzimformák stabilitása etanolos közegben volt a legjelentősebb. Arra kerestük a választ, hogy a kémiai módosítások változást idéznek-e elő az enzim szerkezetében, és az aktiválódás egyúttal szerkezeti változással jár-e a szerves oldószeres



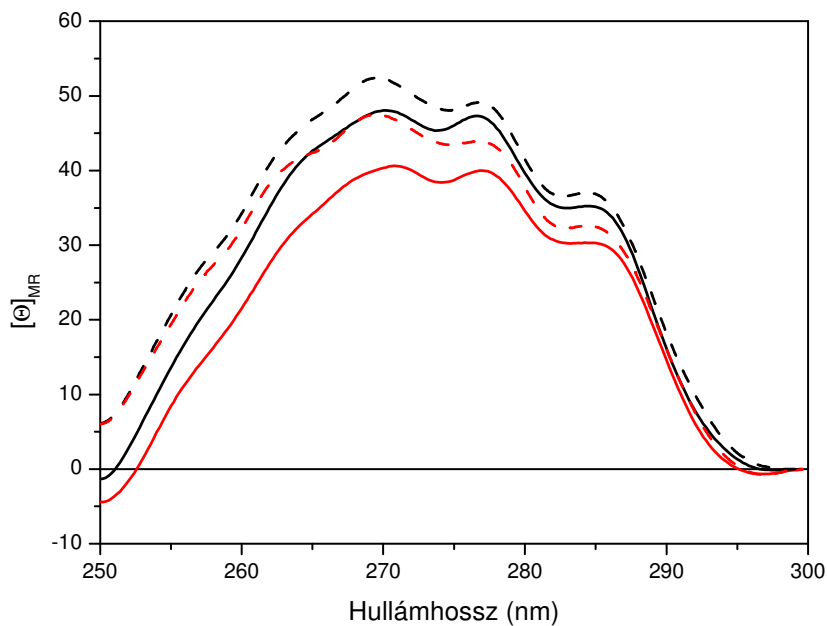
**33. ábra.** A nem módosított —, a citrakonil- —, és a propionil-papain — triptofánfluoreszcencia-színképe foszfát pufferben (folytonos vonal), ill. 40 tf% etanolban (szaggatott vonal) pH 8,0-en 25 °C-on.

közegben. Megvizsgáltuk a citrakonil- és a propionil-papain triptofánfluoreszcencia-paramétereit ( $I_{\max}$ ,  $\lambda_{\max}$ ) etanolos közegben, a színképeket a 33. ábrán tüntettük fel. A papain  $\lambda_{\max}$  értéke vizes közegben 344 nm volt, melyet nem befolyásolt a papain acilálása 30 perc inkubálást követően sem. 40 tf% etanolban a kontroll és a módosított enzimformák spektrumának 7–9 nm-es rövidebb hullámhossz felé történő eltolódását észleltük. Míg a  $\lambda_{\max}$  értékek egymástól jelentősen nem különböztek, az  $I_{\max}$  értékekben eltérést tapasztaltunk. Vizes közegben a propionil-papain  $I_{\max}$  értéke megegyezett a kontroll papainéval, az  $I_{\max}$  érték a citrakonil-papain esetén viszont kb. 60%-a volt a kontrollénak. 40 tf% etanolban a nem módosított enzim  $I_{\max}$  értéke kb. 30%-kal csökkent a vizes közegben mérthez képest, míg a citrakonil- és a propionil-papain esetén a csökkenés kisebb mértékű volt: 24, ill. 14%.

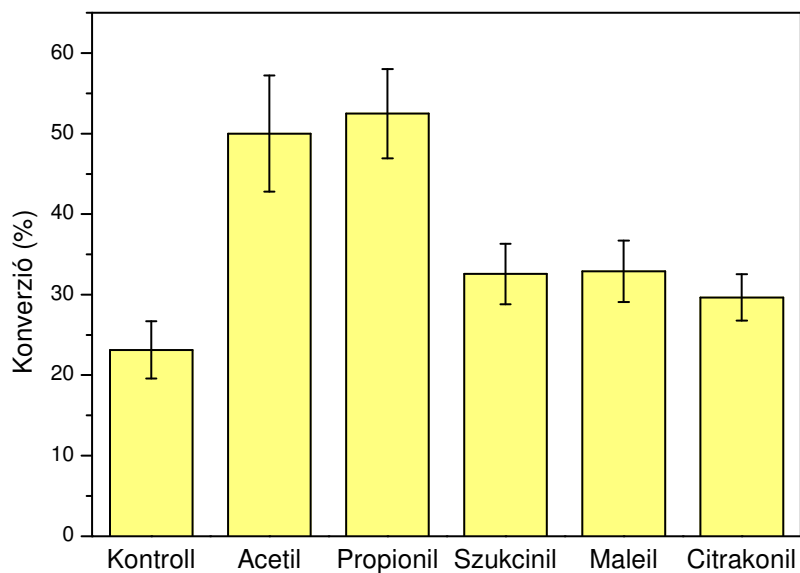
#### 4.3.5.2. A módosított enzimformák közeli-UV-CD-spektruma

A nem módosított és citrakonil-papain közeli-UV-CD-spektrumát vizes és etanolos közegben a 34. ábra szemlélteti. A két enzimforma egymáshoz nagyon hasonló pozitív CD-spektrumokkal rendelkezett. Vizes közegben a sávintenzitás a citrakonil-papain esetén valamelyest kisebb volt a kontroll enziménél, 40 tf% etanolban pedig a két spektrum között még





**34. ábra.** A nem módosított — és a citrakonil-papain — közeli-UV-CD-spektruma foszfát pufferben (folyamatos vonal), ill. 40 tf% etanolban (szaggatott vonal) pH 8,0-en és 25 °C-on.



**35. ábra.** Az acil-papainformák *N*-acetyl-L-tirozil-etilészter szintézise etanolos közegben 24 órás 25 °C-os inkubálás után, pH 8,0-en. A víztartalom 4% volt.

kisebb intenzitáskülönbséget detektáltunk. A spektrumokban megfigyelhető változások kismértékű harmadlagos szerkezetbeli eltéréseket sejtetnek. Megvizsgáltuk a citrakonil-papain távoli-UV-CD-spektrumát is vizes és etanolos közegben, mely szignifikánsan nem tért el a kontroll enzim spektrumától.

#### 4.4. *N*-ACETIL-L-TIROZIL-ETILÉSZTER SZINTÉZIS

A módosított enzimformákat egy modellreakcióban *N*-ac-L-Tyr észteresítésében is összehasonlítottuk etanolos közegben, 4 tf% víztartalom mellett. A módosított enzimformák konverzióját a 35. ábra mutatja. A mérési eredmények összhangban voltak a korábbi aktivitásmérésekkel. A módosított enzimformák katalitikus hatékonysága szignifikánsan nagyobb volt a kontroll enziménél. A nem módosított enzim 24 óra alatt  $23 \pm 4\%$ -os konverziót ért el nem optimalizált körülmények között. A szukcinil-, maleil-, és citrakonil-papain ezzel szemben  $33 \pm 4$ ,  $33 \pm 4$  és  $30 \pm 3\%$  konverzióra volt képes, míg az acetil- és propionil-papain az *N*-ac-L-Tyr szubsztrát  $50 \pm 7$  és  $52 \pm 6\%$ -át észteresítette. Azaz a primer aminocsoportok, lizil-oldalláncok pozitív töltésének semlegesítése hatékonyabb enzimformát eredményezett azok negatívra cserélésénél.

A módosított enzimformák *N*-ac-L-Tyr-etilészter szintézisét ACN-es és THF-es közegben is összehasonlítottuk. Ez esetben azonban nem mutattunk ki különbséget a módosított és a kontroll enzimformák hatékonyságában.

## 5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

### 5.1. A PAPAIN KONFORMÁCIÓSTABILITÁSA SZERVES OLDÓSZERES KÖZEGBEN

#### 5.1.1. Szerves oldószerek hatása a papain aktivitására és stabilitására

A kilencvenes évektől kezdődtek azok a kutatások, amelyek az enzimek nem hagyományos közegű működésének vizsgálatára irányultak. Számos közlemény született e területen, azonban molekuláris szinten az oldószerek hatása az enzimek szerkezetére, katalitikus aktivitására még nem tisztázott. Általános érvényű törvényszerűségek nem születtek, egyes enzimekre vonatkozó adatokat közöltek az irodalomban, melyek azonban abban megegyeztek, hogy szerves oldószeres közegben csökken az enzimek aktivitása és stabilitása (Adlercreutz, 1994; Cui és mtsai., 2008; Iyer és Ananthanarayan, 2008). Az eltérő tulajdonságú szerves oldószerek különböző mértékben hathatnak az enzimek aktivitására, stabilitására, kinetikai paramétereire és szubsztrátspecifitására, mindazonáltal befolyásolhatják az enzimátikus szintézisek során a szubsztrátok és a termékek oldékonyságát is (Schumacher és mtsai., 2006; Sergeeva és mtsai., 1997; Simon mtsai., 2001; Tanaka és mtsai., 1999).

Megvizsgáltuk, hogy a közeg hidrofóbicitása ( $\log P$ ) hogyan befolyásolja a papain maradék aktivitását (9. ábra). A különböző szerves oldószeres elegyek papain aktivitására gyakorolt hatása eltérő volt, és jól korrelált a szerves oldószer  $\log P$  értékével. 90 tf% szervesoldószer-tartalomnál a hidrofil karakterű ( $\log P < 0,5$ ) szerves oldószert (DMSO, DMF, etanol, metanol, ACN, aceton) tartalmazó közegben általában megőrződött az enzimaktivitás legalább 40–50%-a még 120 percet követően is. A hidrofóbabb karakterű ( $\log P > 0,5$ ) szerves oldószert (THF, etilacetát, toluol, *n*-hexán) tartalmazó elegyek viszont már kis koncentrációban rövid idő alatt drasztikusan csökkentették a papain aktivitását.

Az irodalomban ezzel megegyező és eltérő adatok is olvashatók. Az *Alcaligenes faecalis* nitriláz aktivitása szintén csökkent az oldószer  $\log P$  értékének növekedésével szerves oldószeres elegyekben (Kaul és Banerjee, 2008). Más esetekben viszont ennek épp ellenkezőjét igazolták, pl. *Bacillus* lipáz esetén a nagy  $\log P$  értékű szerves oldószerek bizonyultak alkalmasabbnak katalízisre (Eltaweel és mtsai., 2005). Az alifás-alkoholokról és a DMF-ről mindemellett tudott, hogy csökkenthetik a papain aktivitását és az aktív centrumok számát azáltal, hogy hidrofób kölcsönhatást képesek kialakítani az enzim szubsztrátkötő zsebével (Szabalski és mtsai., 2001).

A szerves oldószerek többféle mechanizmussal inaktiválhatják az enzimet: szerkezetet stabilizáló vízmolekulákat távolíthatnak el az enzim hidrátburkából; bejuthatnak az enzim szerkezetébe, ahol szerkezeti vízmolekulákat helyettesíthetnek, és lokális szerkezeti változást okozhatnak; illetve az aktív centrumhoz kötődve gátolhatják az enzim működését (Fágáin, 1995). A fenti tényezők közül leggyakrabban a vízelvonó hatás érvényesül, melyet jelentős aktivitásvesztés kísérhet (Mozhaev, 1998; Yang és mtsai., 2004).

Részletesen a vízzel elegyedő szerves oldószerek közül az acetont, az ACN-t, az etanolt, a metanolt és a THF hatását vizsgáltuk a papain aktivitására (6. ábra). Közülük a legnagyobb polaritású az ACN, míg a legkisebb a THF volt. A nagy szervesoldószer-koncentrációknál a papain megőrizte aktivitásának jelentős részét a poláros, protikus etanolt és metanolt tartalmazó közegben, de az enzim a poláros, aprotikus acetont és ACN-t tartalmazó közegben is meglehetősen aktívnak bizonyult a 20 perces inkubálás során. A poláros szerves oldószerek közül egyedül a ciklikus szerkezetű, aprotikus THF csökkentette jelentősen már kis koncentrációban az enzimaktivitást (Szabó és mtsai., 2006). Az irodalomból ismert, hogy a papain molekulában 35 szerkezeti vízmolekula található (Kamphuis és mtsai., 1984). A poláros oldószerek (pl. ACN, THF) nagy koncentrációban valószínűleg beépülnek a hidrátburokba, valamint szerkezeti vízmolekulákat távolíthatnak el, melyek nagyon fontosak a papain stabilitásában, és aktivitásának megőrzésében.

A papainhoz hasonlóan a sertés pepszin aktivitása is csökkent a szintén apolárosabb karakterű, ciklikus, aprotikus 1,4-dioxánban (Simon és mtsai., 2007), az aminoaciláz enzim működését pedig a dioxán teljesen gátolta már 25–30 tf% koncentrációban (Boross és mtsai., 1998). Szubsztrát jelenlétében azonban kivédhető volt a dioxán *Penaeus vannamei*  $\beta$ -N-acetil-D-glükózaminidáz inaktiváló hatása, ezért valószínűleg az apolárosabb karakterű, ciklikus szerkezetű szerves oldószerek a vízelvonó hatás mellett az enzim aktív centrumát és szerkezetét stabilizáló másodlagos kötéseket is megbontják (Xie és Chen, 2004).

Az idő függvényében, 90 tf% etanolban nem csökkent az enzim aktivitása olyan rövid idő alatt, mint ACN-ben és THF-ben (7. ábra). ACN-es és THF-es közegben a kezdeti gyors, és az azt követő lassú aktivitásvesztés valószínűleg azzal magyarázható, hogy ezekben az oldószerekben az enzim két doménjének stabilitása nem egyforma az eltérő kiterjedésű hidrofób magjuknak köszönhetően (Hernandez-Arana és Soriano-Garcia, 1988). A papain jelentős szerves oldószerekkel szembeni stabilitással rendelkezik. Ezt igazolja az is, hogy a papain aminosav-

metilészterek szintézisében számos poláros és apoláros szerves oldószert tartalmazó közegben (ACN, toluol, tetraklórmetán) hatékonyan használható, bár itt a szubsztrátok és a termékek stabilizáló hatása is közrejátszott (Stevenson és Storer, 1990). Számos enzim, pl. a *Streptomyces* transzglutamináz már 50 tf% etanolban elvesztette aktivitásának 85%-át 60 perc alatt (Cui és mtsai., 2008). A termolizinnak pedig 20 tf% propanol, izopropanol, DMSO, DMF jelenlétében gyakorlatilag teljesen megszűnt az aktivitása 10–15 perc alatt (Pazhang és mtsai., 2006).

Vízzel nem, vagy csak részben elegyedő szerves oldószereket tartalmazó közegekben is vizsgáltuk a papain maradék aktivitását (8. ábra). Az apoláros *n*-hexánt tartalmazó közegben csak a nagy szervesoldószer-tartalomnál, az apoláros toluolt és a poláros, aprotikus etilacetátot tartalmazó közegben pedig már a kis oldószer-tartalomnál jelentősen csökkent az enzim aktivitása. A vízzel nem vagy csak részben elegyedő szerves oldószerek általában nem hatnak az enzimmolekulát körülvevő hidrátburok intaktságára (Yang és mtsai., 2004). Ezekben az oldószerekben a papain inaktiválódását az okozhatja, hogy a szerves és a vizes fázis határfelületén akkumulálódnak az enzimmolekulák, hidrofób oldalláncaikkal a szerves, hidrofil részükkel pedig a vizes fázis felé fordulva. A folyamat az enzim konformációváltozását eredményezheti, csökkentve katalitikus hatékonyságát. Ross és munkatársai (2000) igazolták, hogy tridekános emulzióban a tripszin, az  $\alpha$ - és a  $\beta$ -kimotripszin szerkezeti átrendeződésen megy keresztül.

### 5.1.2. A papain szerkezete vízzel elegyedő szerves oldószerekben

Vízzel elegyedő szerves oldószerekben (etanol, ACN, THF) tanulmányoztuk a papain belső fluoreszcencia- és CD-spektroszkópiai paramétereit is. A fluoreszcencia-spektroszkópiai mérések során alapvetően a papain Trp-oldalláncainak fluoreszcenciáját mértük. A papain 5 Trp-oldalláncot tartalmaz: ezek közül 2 az L-doménben, míg 3 az R-doménben található. A Trp7  $\beta$ -lemezben, a Trp26 és 69  $\alpha$ -hélixben, a Trp177 és 181 pedig rendezetlen régióban lokalizálódik (Kamphuis 1984). A közeli-UV-CD-méréseknél nagy jelentősége van a Tyr- és a Cys-oldalláncoknak is. Az enzim 19 Tyr-oldalláncából 10 az L-doménben, míg 9 az R-doménben van. A 7 Cys-oldalláncból egy az enzim aktív centrumában található (Cys25), 6 pedig diszulfidkötést alkot: Cys22–Cys63, Cys56–Cys95 és Cys153–Cys200 (Kamphuis 1984). A papain az ún.  $\alpha$ + $\beta$  fehérjék közé sorolható, melyek jellemzője, hogy elkülönülve tartalmaznak  $\alpha$ -hélixben és  $\beta$ -redőben gazdag régiókat. Ezeknek a fehérjéknek a CD-spektruma vizes közegben  $\alpha$ -hélix

dominanciát mutat, 208 és 222 nm-nél negatív, ill. 195 nm környékén pozitív sávval. Jellemzőjük még, hogy 200 nm-nél egy negatív váll is megjelenhet spektrumukban (Manavalan és Johnson 1983).

A szerves oldószerek, főleg nagyobb koncentrációban szerkezetváltozásokat idézhetnek elő enzimekben (Cui és mtsai., 2008). Szerves oldószeres közegben a papain és az *N*-ac-L-Trp-etilészter  $I_{\max}$  értékének alakulása 0–70 tf% szervesoldószer-tartalomnál nem mutatott jelentős szerkezetváltozást, de jól tükrözte a szervesoldószer-molekulák hatását azokra a Trp-oldalláncokra, melyek a papain felszínén helyezkednek el. A közeli-UV-CD-spektrumok is arra utalnak, hogy 70 tf% szervesoldószer-koncentrációig a papainban nem történt jelentős szerkezetváltozás főleg etanolos közegben. ACN-es és THF-es közegben a nagy szervesoldószer-koncentrációknál az  $I_{\max}$  érték csökkenését tapasztaltuk, ami a harmadlagos szerkezet lazulására utal (Szabó és mtsai., 2006).

#### 5.1.2.1. Szerkezet–aktivitás összefüggés etanolos és acetonitriles közegben

Az etanol koncentráció növelésével a papain  $I_{\max}$  értéke folyamatosan nőtt, összhangban a  $\lambda_{\max}$  érték csökkenésével (10. ábra). Ezzel szemben ACN-es közegben 60 tf% szervesoldószer-koncentrációig nőtt az  $I_{\max}$  érték, majd ezt egy kismértékű csökkenés követte (12. ábra). Mindkét szerves oldószeres közegben a távoli-UV-CD-spektrumok azt mutatták, hogy változott a papain rendezett másodlagos szerkezeti elemeinek mennyisége (rendezetlen  $\rightarrow$   $\alpha$ -hélix és/vagy  $\beta$ -redő  $\rightarrow$   $\alpha$ -hélix) (16. ábra). Provencher-Glückner algoritmus alapján a papain  $\alpha$ -hélix mennyisége vizes közegben 15% volt, amely 90 tf% etanol ill. ACN hatására 22 ill. 20%-ra nőtt. A változás egy köztes állapot kialakulását sejteti az enzim natív és a teljesen kitekeredett állapota között (Naeem és mtsai., 2004). A konformációs átrendeződés eredményeként a natív enzim  $\beta$ -lemezében található Trp-oldalláncok az újonnan kialakuló  $\alpha$ -hélix részei lettek. Az  $\alpha$ -hélixben az aminosav-oldalláncok érzékenyebben reagálnak az oldószer polaritásának változására, mint a  $\beta$ -redőben találhatóak (Szabó és mtsai., 2006).

Az etanol és az ACN jelenléte sertés pepszin esetén is növelte a helikális és csökkentette a  $\beta$ -redő másodlagos szerkezetek mennyiségét (Simon és mtsai., 2007). Ezzel szemben a papain szerkezetében savas (pH 2,0) kémhatáson  $\beta$ -redő tartalom növekedése volt megfigyelhető, miközben az enzimnek egy köztes szerkezeti állapota jött létre (Edwin és Jagannadham, 1998).

Az etanol és az ACN koncentráció emelésével az  $I_{\max}$  érték növekedése és a  $\lambda_{\max}$  érték csökkenése a Trp-oldalláncok egyre nagyobb expozícióját mutatták, és hasonló jelenséget figyeltünk meg metanolos közegben is. A közeli-UV-CD-spektroszkópiai mérések arra utalnak, hogy a papain 90 tf% ACN hatására nagyobb konformációs átalakuláson ment keresztül, mint etanolban (17. és 18. ábra). A papain aktív centrumának oxianion-üregét a molekula N-terminális végén található  $\alpha$ -hélix aminosav-oldalláncai (24–42. aminosavak) adják. Ezzel a régióval kölcsönhatásban áll a Cys25 katalitikus aminosav amidcsoportja, és a közelében helyezkedik el a Cys22–Cys63 diszulfidhíd is (Ménard és mtsai., 1995). Az etanolos közeghez képest a nagy ACN-koncentrációknál tapasztalt aktivitásvesztés valószínűleg a papain oxianion-üregének környezetében bekövetkező szerkezeti változásoknak tulajdonítható.

#### 5.1.2.2. Szerkezet–aktivitás összefüggés tetrahidrofurános közegben

Az etanollal és ACN-nel szemben a THF már kis koncentrációban jelentősen csökkentette az enzimaktivitást. 50 tf% THF koncentráció fölött a standardtól eltérő (csökkenő)  $I_{\max}$  és a csökkenő  $\lambda_{\max}$  érték az enzim szerkezetének változására utal (14. ábra). Ez a hatás ellentétes azzal, amit a magas hőmérséklet okozta „unfolding”-nál láthatunk, pl. a ribonukleáz Sa fluoreszcencia-paramétereiben (Alston és mtsai., 2004). A fluoreszcencia-paraméterek változása 90 tf% THF-ben a fehérjeszerkezet átrendeződésére utal, melyet a közeli-UV-CD-mérések is megerősítettek. A THF-es közeg indukált szerkezetlazulás eredményeként a Trp-oldalláncok jóval apolárosabb környezetbe kerültek, melyet az *N*-ac-L-Trp-etilészter  $\lambda_{\max}$  értékének csökkenése is mutat. A közeli-UV-CD-mérések alapján megállapítható, hogy a papain harmadlagos szerkezete nagymértékben lazult a THF koncentráció emelésével (19. ábra). A közeli-UV-tartományban hasonló változást mutattak ki magas hőmérséklet, alacsony pH és denaturálószer jelenlétében (Hernandez-Arana és Soriano-Garcia 1988, Edwin és Jagannadham 1998, Edwin és mtsai., 2002). A THF valószínűleg a vízelvonó hatás mellett, a szerkezetet stabilizáló másodlagos kötéseket megbontva, nagymértékű szerkezeti változásokat idéz elő a papain mindkét doménjében és a közöttük elhelyezkedő aktív centrumban (Szabó és mtsai., 2006).

## 5.2. A PAPAIN STABILITÁSÁNAK NÖVELÉSE SZERVES OLDÓSZERES KÖZEGBEN

### 5.2.1. A szénhidrátok stabilizáló hatása

A THF inaktíváló hatását a monoszacharid D-fruktóz, D-glükóz, D-ribóz, a diszacharid D-szacharóz és a triszacharid D-raffinóz segítségével sikerült csökkenteni (20. ábra). A szénhidrátok stabilizáló hatásukat csak lúgos közegben (pH 8,0) fejtették ki (Szabó és mtsai., 2009). Etanolos közegben az  $\alpha$ -kimotripszin polihidroxi-molekulákkal történő stabilizálása szintén csak lúgos kémhatáson volt eredményes (Simon és mtsai., 2002).

A maximális stabilizáló hatását a raffinóz 0,1 M, a szacharóz 0,5 M, a glükóz 0,8 M, a fruktóz 1,2 M, míg a ribóz 1,6 M koncentrációnál fejtette ki. A legkisebb stabilizáló hatással a raffinóz, a legnagyobbal a ribóz bírt. A THF inaktíváló hatása jelentős részben a fehérjékhez kötődő vízmolekulák számának csökkentésében rejlik (Yang és mtsai., 2004). A polihidroxi-molekulák azonban helyettesíteni képesek a távozó vízmolekulákat funkciócsoportjaik révén (Fatima és Khan, 2007), ugyanakkor a fehérjék szerkezetét kompakt állapotban képesek tartani (Kim és mtsai., 2003). A szénhidrátok stabilizáló hatásukat azáltal is kifejtethetik, hogy meggátolják a fehérjemolekulák aggregációját (Xia és mtsai., 2007). Poliol molekulák (xilóz, szacharóz, szorbit, glicerin) segítségével növelhető a papain stabilitása magas hőmérsékleten is (Sathish és mtsai., 2007).

Eredményeink azt mutatták, hogy a stabilizáló hatás a kis szénhidrát-koncentrációnál korrelált a cukormolekulák OH-csoport mennyiségével. A poliolkok hidroxilcsoport-száma gyakran összefügg stabilizáló hatásukkal (Tiwari és Bhat, 2006). 60 tf% THF-ben a papain aktivitása kb. 9%-ra csökkent. Ezzel szemben THF/víz elegyben a 4 OH-csoportot tartalmazó, 0,2 M-os ribóz jelenlétében a papain aktivitása kb. kétszerese volt az eredetinek. A szénhidrátok hidroxilcsoportszám növekedésével tovább fokozódott az enzimaktivitás: a 8 OH-csoporttal rendelkező szacharóz 0,2 M koncentrációban már kb. háromszorosára, a 11 OH-csoportot tartalmazó raffinóz jelenlétében pedig kb. hétszeresére nőtt. A  $\beta$ -laktoglobulin hőstabilitásának vizsgálata is azt mutatta butanol, butándiol, butántriol és butántetraol poliolkok jelenlétében, hogy a hidroxilcsoport-mennyiség növekedése csökkenti az alkohol denaturáló hatását (Romero és mtsai., 2007).

Nagy cukorkoncentrációnál a redukáló cukrok (fruktóz, glükóz, ribóz) jelentősen növelték a papain stabilitását (21. ábra). Stabilitást fokozó hatásával telítési cukorkoncentrációnál a ribóz kitűnt a többi szénhidrát közül. A redukáló cukrok a fehérjék hidratáltsági állapotának



fenntartásán túl nyílt láncú formában kovalens kémiai kötést képesek kialakítani a fehérjék primer aminocsoportjaival, lizil-oldalláncaival (Ulrich és Cerami, 2001). Fruktóz, glükóz és ribóz jelenlétében megmértük a papain szabad aminocsoport-számát (22. ábra). Két óra inkubálás után mennyiségük a fruktóz és a glükóz hatására csak kismértékben, míg a ribóz jelenlétében jelentősen csökkent. A kialakuló Schiff-bázisok mennyisége függ az oldatban levő nyílt láncú cukormolekulák számától és reaktivitásától. Glükóz oldatban mennyiségük mindössze 0,002%-ra tehető, ribóz oldatban viszont akár 0,05%-ot is elérhet (Bunn és Higgins, 1981). Valószínűleg ezzel magyarázható a köztük levő szignifikáns reaktivitásbeli különbség. A fruktóz oldatban noha nagyobb arányban van jelen nyílt láncú formában (0,7%), ez az egyik legkevésbé reaktív ketóz.

Szénhidrátok jelenlétében meghatároztuk a papain inaktiválódásának termodinamikai paramétereit ( $\tau$ ,  $\Delta\Delta G^\ddagger_1$ ) is THF-es közegben (2. táblázat). A szénhidrátok növelhetik a fehérjék termodinamikai stabilitását, azáltal hogy a proteint a natív állapothoz közeli konformációban tartják (Kim és mtsai., 2007). A termodinamikai paraméterek alakulása összecsengett a stabilitásvizsgálatok eredményeivel, melyek arra utaltak, hogy THF-es közegben a ribóz stabilizálta legnagyobb mértékben a papaint.

### 5.2.2. A papain szerkezete szénhidrátok jelenlétében tetrahidrofurános közegben

A liofilizálás során az enzimek hidratáltsági állapotának változása gyakran csökkenti aktivitásukat, és változásokat okozhat szerkezetükben. Polioloak (pl. szacharóz, PEG) jelenlétében viszont csökkenthetők ezek a kedvezőtlen változások (Dai és Klibanov, 1999). THF jelenlétében a papainhoz kötődő vízmolekulák számának csökkenésén túl az enzimnek jelentősen lazult a szerkezete is. A magas hőmérséklet (75 °C) szintén a papain inaktiválódását és szerkezeti változását idézi elő (Sathish és mtsai., 2007). A papain triptofánfluoreszcencia-paramétereinek eltéréseit követve 60% THF-ben a  $\lambda_{\max}$  érték csökkenését tapasztaltuk szénhidrátok nélkül és jelenlétükben egyaránt, ami a Trp-oldalláncok apolárosabb környezetbe kerülésére utal (23. ábra). THF-es közegben az  $I_{\max}$  érték kevésbé nőtt fruktóz és ribóz jelenlétében, mint azok nélkül. Ribóz és fruktóz jelenlétében a csökkenő fluoreszcencia-intenzitás a Trp-oldalláncok a fehérje belsejébe történő eltemetődését sugallja, létrehozva egy valamivel kompaktabb szerkezetet.

60 tf% THF-ben a fluoreszcencia-intenzitás növekedésével összhangban a közeli-UV-CD-sávok csökkenését tapasztaltuk, ami a szerkezet lazulását sejteti (24. ábra). Szénhidrátok jelenlétében a fluoreszcencia- és a CD-spektrumok változása azt mutatta, hogy a szacharidok az

enzim harmadlagos szerkezetét stabilizálják. Mivel a CD spektrális változások az aromás kromofórok és a diszulfidhidak környezetének módosulásából adódnak, azt feltételezhetjük, hogy lokális és specifikus változások történnek a papain szerkezetében a megváltozott körülmények hatására (Szabó és mtsai., 2009). A szénhidrátok másodlagos kötésekkel kölcsönhatásba léphetnek fehérjékkel. Például a glükózzal igazolták, hogy vizes oldatban kapcsolódni képes dipól-dipól kölcsönhatásokkal egy maltózkötő fehérjéhez hidrofil réteget kialakítva a protein körül (Duan és mtsai., 2001).

60 tf% THF-ben, 0,4 M fruktóz jelenlétében a papain CD-spektruma két maximummal és egy minimummal rendelkezett. 275 nm környékén, ahol a fruktóz jelenlétében minimumot tapasztaltunk, ribóz jelenlétében egy maximum csúcs jelent meg. Ezek a spektrális változások valószínűleg a papain primer aminocsoportjai és a nyílt láncú cukormolekulák között kialakuló Schiff-bázisoknak tulajdoníthatók (Aronson, 2004; Yim és mtsai., 1995). A CD-spektrumokban megfigyelt minimum és maximum a fruktózt, illetve a ribózt tartalmazó mintákban abból adódhat, hogy a keletkező Schiff-bázis termékek konfigurációja különböző.

### 5.2.3. A papain módosítása szerves savanhidridekkel

A papain enzim aktivitását és stabilitását mono- és dikarbonsav-anhidrides kémiai módosításokkal is növeltük, melyek primer aminocsoportokkal, Lys-oldalláncokkal reagálnak. A papainban az L-domén 6, míg az R-domén 4 Lys-oldalláncot tartalmaz, melyek közül 2–2  $\alpha$ -hélixben és  $\beta$ -redőben lokalizálódik, 6 oldallánc pedig rendezetlen régiókban található (Kamphuis és mtsai., 1985). Módosítószerként a monokarbonsav-anhidridek közül a citrakonsav-, maleinsav- és borostyánkósav-anhidridet, míg a dikarbonsav-anhidridek közül az ecetsav- és propionsav-anhidridet választottuk. A papain szerves savanhidrides acilálása során az enzim primer aminocsoportjainak többsége (64–91%) módosult (3. táblázat). A kémiai módosítások megváltoztathatják az enzim natív elektroforetikus mobilitását (Masuda és mtsai., 2005). A papain szerkezetében nagy számban található pozitív töltésű Arg- és Lys-oldalláncok (Nitsawang és mtsai., 2006). A monokarbonsav-anhidrides acilálások az aminocsoportok pozitív töltésének semlegesítése által csökkentették a papain pozitivitását (26/A. ábra). A dikarbonsav-anhidrides módosítások pedig negatív töltéseket vittek be a papain szerkezetébe, nettó negatív töltést eredményezve az enzimnek (26/B. ábra). A módosítások után heterogén enzimpopulációk

jöttek létre, a minták 2–3 különböző mértékben módosult enzimformát tartalmaztak (Szabó és mtsai., 2009).

#### 5.2.4. Karbonsav-anhidridek hatása a papain aktivitására és stabilitására

A karbonsav-anhidrides módosítások hatására a papain aktivitása közel kétszeresére nőtt. Etanolos közegben az acil-enzimformák jóval aktívabbnak bizonyultak a kontroll papainnál, különösen a kis szervesoldószer-koncentrációknál (27. ábra). 20–40 tf% etanolban a monokarbonsav-anhidriddel módosított papain aktivitása hozzávetőleg 20%-kal nagyobb volt a dikarbonsav-anhidriddel módosítottnál. A nagy etanolkoncentrációkban azonban nem tapasztaltunk ilyen jelentős különbséget az acil-enzimformák aktivitása között. Az  $\alpha$ -kimotripszin piromellitinsav-anhidriddel történő módosítása is jelentősen növelte az enzim aktivitását etanolos közegben (Vinogradov és mtsai., 2001).

A kémiai módosítások megváltoztathatják az enzimek számos tulajdonságát. Anhidrides módosítások hatására vizes közegben nőtt a papain specifikus aktivitása, detergensekkel szembeni stabilitása, hőstabilitása és eltolódott a pH optimuma (pH 6,0  $\rightarrow$  8,0) is (Khaparde és Singhal, 2001; Roy és mtsai., 2005; Sangeetha és Abraham, 2006).

A módosított papain kinetikai paraméterei is változtak a módosítások hatására vizes közegben és etanol/víz elegyben (4. táblázat) egyaránt. A kontroll papain reakciósebessége és a szubsztráthoz való affinitása egyaránt csökkent etanol/víz elegyben a vizes közegben mérthez képest. A citrakonil- és a propionil-papain szubsztátkötő képessége csökkent a kontroll enzimhez viszonyítva, a katalizált reakció sebessége viszont nőtt, ami összességében a katalízis hatékonyságának ( $k_{cat}/K_M$ ) növekedéséhez vezetett, mind etanolos, mind vizes közegben (Szabó és mtsai., 2009).

A kinetikai paraméterek kedvező változását figyelték meg *Bacillus*  $\alpha$ -amilázok citrakonsav-anhidrides és a torna-peroxidáz ftálsav-anhidrides módosításánál is (Khajeh és mtsai., 2001; Song és mtsai., 2005). A papain katalitikus hatékonyságának növekedése valószínűleg azzal magyarázható, hogy a Lys-oldalláncok pozitivitásának csökkenése növeli az aktív centrumban található His159 pozitív imidazólium ionjának  $pK_a$  értékét (Migliorini és Creighton, 1986).

ACN-es és THF-es közegben már kevésbé voltak aktívak a módosított enzimformák (28. és 29. ábra). ACN-es közegben 80 tf% szervesoldószer-koncentrációig az acil-papainformák az etanolos közegben tapasztalhoz hasonlóan nagyobb aktivitással rendelkeztek a nem módosított

enzimnél, a nagy ACN koncentrációknál azonban nem mutattunk ki jelentős aktivitáskülönbséget a módosított enzimformák és a kontroll papain között. Az acil-papainformák aktivitása legkevésbé THF-es közegben őrződött meg. A szervesoldószer-koncentráció növelésével az enzimformák aktivitása drasztikusan csökkent, 60 tf% THF koncentráció fölött nem különbözött a módosított enzimformák aktivitása a kontroll enzimétől.

A töltésállapot változása kedvezett a papain katalitikus paramétereinek alakulására. 40 tf% etanolban az idő függvényében is megőrizte nagyobb aktivitását mindegyik módosított enzimforma a nem módosítottéhoz képest (30. ábra). A monokarbonsav-anhidriddel módosított papain stabilitása nagyobb volt a dikarbonsav-anhidriddel módosítottnál. 40 tf% ACN-ben is stabilabbak voltak a módosított enzimformák a kontroll papainnál, noha stabilitásuk 120 perc alatt jelentősen csökkent (31. ábra). THF-es közegben azonban a módosított enzimformák sem tudták stabilitásukat megőrizni a szerves oldószer inaktíváló hatásával szemben (32. ábra).

#### 5.2.5. A kémiailag módosított papain szerkezete szerves oldószeres közegben

Etanolos közegben a módosítások jelentősen növelték az enzim stabilitását. A monokarbonsav-anhidriddel módosított papain aktívabbnak és stabilabbnak bizonyult a dikarbonsav-anhidriddel módosítottnál. Amikor megvizsgáltuk a citrakonil- és a propionil-papain triptofán-fluoreszcenciáját, azt tapasztaltuk, hogy az oldószerhatással kapcsolatba hozható  $\lambda_{\max}$  érték egyformán változott a kontroll és a módosított enzimformák esetén (33. ábra). Eltérést az  $I_{\max}$  értékekben tapasztaltunk. A citrakonilcsoportok bevitelével vizes közegben az  $I_{\max}$  érték csökkenését detektáltuk, és az  $\alpha$ -kimotripszin oligoaminokkal történő komplexképzése is hasonló intenzitásváltozást eredményezett (Kudryashova és mtsai., 2003).

Etanol hatására az  $I_{\max}$  értékek csökkentek mind a kontroll és a módosított enzimformák esetén, a változás azonban kisebb volt a módosított enzimformáknál. A módosítás olyan szerkezeti, töltésállapotbeli változást eredményezett a papainban, amely az enzim katalitikus hatékonyságának növekedését eredményezte (Szabó és mtsai., 2009).

A közeli-UV-CD-spektroszkópiai mérések a módosítások hatására kismértékű térszerkezet-lazulást mutattak vizes és etanolos közegben egyaránt (34. ábra). A kontroll enzimhez képest vizes közegben a módosított papain harmadlagos szerkezete kevésbé volt kompakt, míg etanol/víz elegyben a módosított enzim valamelyest jobban megőrizte a natívhoz közeli állapotot.

A citrakonsav-anhidrides módosítás *Bacillus*  $\alpha$ -amilázok térszerkezetében is kismértékű változásokat eredményeztek (Khajeh és mtsai., 2001).

### 5.3. KÉMIAI MÓDOSÍTÁSOK HATÁSA AZ ENZIM SZINTETIKUS AKTIVITÁSÁRA

Szerves oldószeres közegben, a kis víztartalomnak köszönhetően az enzimek által katalizált hidrolitikus reakciók egyensúlya a szintézis irányába tolódik (Klibanov, 2001). A szerves savanhidrides kémiai módosítások etanolos közegben a papain nagymértékű aktivitás- és stabilitásnövekedését eredményezték, ezért összehasonlítottuk az egyes módosított enzimformák hatékonyságát *N*-ac-L-Tyr észteresítésében is (35. ábra). A papain egy széles szubsztrát-specifitású enzim, ezért jól alkalmazható peptidek és aminosav-észterek előállítására (Morcelle és mtsai., 2006). Az acilálások minden esetben növelték a konverziót: a dikarbonsav-anhidrides módosítások 7–10%-kal, a monokarbonsav-anhidrides módosítások pedig 27–29%-kal növelték az észterszintézist 96 tf% etanolban 24 órás inkubálás alatt (Szabó és mtsai., 2009). A monokarbonsav-anhidrides módosítások tehát a nagyobb hidrolitikus aktivitás mellett nagyobb szintetikus aktivitást is eredményeztek a dikarbonsav-anhidrides módosításoknál.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Napjainkban az enzimeket kiterjedten alkalmazzák szerves oldószeres közegben különféle szintéziseknél. A szerves oldószerek jelenléte azonban általában az enzimek aktivitásának és stabilitásának csökkenésével jár. Az aktivitásvesztés háttere kevésbé tisztázott, ennek jobb megismeréséhez modellként a papaint választottuk, melyet széles szubsztrátspecifitásának köszönhetően gyakran használnak szerves kémiai szintézisekben. Munkánk célja az volt, hogy tanulmányozzuk a különféle szerves oldószerek hatását a papain aktivitására és stabilitására. További célunk az volt, hogy a szerkezetben bekövetkező változásokat az enzim triptofán-fluoreszcenciájának vizsgálatával, valamint közeli- és távoli-UV-CD-mérésekkel határozzuk meg. Várható volt, hogy a szerves oldószerek inaktiválódást eredményeznek, melyet szénhidrátok alkalmazásával és szerves savanhidrides kémiai módosításokkal kívántunk csökkenteni.

Kísérleti eredményeinket a következőkben foglaljuk össze:

1. Kísérleteink során megvizsgáltuk a papain aktivitását és stabilitását különböző vízzel elegyedő (etanol, metanol, aceton, ACN, THF) és nem elegyedő szerves oldószereket (toluol, *n*-hexán, etilacetát) tartalmazó közegben. A különféle szerves oldószerek eltérő mértékben hatottak az enzim katalitikus aktivitására. Kimutattuk, hogy a vízzel elegyedő szerves oldószerek többsége (etanol, metanol, aceton, ACN) nem csökkenti jelentősen a papain stabilitását, az apolárosabb THF viszont már kis koncentrációban drasztikus aktivitásvesztést okoz. Eredményeink azt is mutatták, hogy a vízzel nem elegyedő szerves oldószerek közül az *n*-hexán csak a nagy szervesoldószer-koncentrációknál csökkenti az enzimaktivitást, a toluol és az etilacetát pedig a THF-hez hasonlóan jelentős inaktiválódást eredményez. Igazoltuk, hogy a közeg hidrofóbicitásának csökkenésével az enzimaktivitás egyre inkább megőrződik. A papain aktivitáscsökkenéséhez, inaktiválódásához valószínűleg nagyban hozzájárul, hogy a vízzel elegyedő szerves oldószerek poláros karakterüknek köszönhetően vízmolekulákat távolíthatnak el az enzim hidrátburkából és szerkezetéből. A vízzel nem elegyedő oldószerekben pedig a határfelületen bekövetkező inaktiválódással kell számolni.
2. A vízzel elegyedő szerves oldószerekben tanulmányoztuk a papain másod- és harmadlagos szerkezetét, melyeket a papain triptofán-fluoreszcenciájának vizsgálatával, valamint közeli- és távoli-UV-CD-spektroszkópiai mérésekkel követtünk. Kimutattuk, hogy etanol és ACN hatására az enzim helikális szerkezeti elemeinek mennyisége nőtt, ugyanakkor nagymértékű

konformációváltozást ezek a szerves oldószerek nem okoztak. Jelentősebb szerkezetváltozást a THF eredményezett – főként 60 tf% koncentráció fölött –, ami végül a harmadlagos szerkezet teljes felbomlásához vezetett. Igazoltuk tehát, hogy a THF a vízmolekulák kiszorításán túl a papainban jelentős szerkezeti változásokat is előidéz.

3. A vízzel elegyedő THF inaktíváló hatását szénhidrátok segítségével sikerült csökkentenünk. Eredményeink azt mutatták, hogy a szénhidrátok lúgos kémhatáson fejtik ki stabilizáló hatásukat, mely maximális stabilizálási szénhidrát-koncentrációknál a következő sorrendben alakult: D-ribóz > D-fruktóz > D-glükóz > D-szacharóz > D-raffinóz. Kimutattuk, hogy a szacharidok stabilizáló hatása a kis koncentrációknál jól korrelál hidroxilcsoport-számukkal. Stabilizáló hatás tekintetében a ribóz kitűnt a többi szénhidrát közül, melyet a papain inaktíválódásának termodinamikai paraméterei ( $\tau$ ,  $\Delta\Delta G^\ddagger_1$ ) is megerősítettek. Eredményeink azt mutatták, hogy mindegyik stabilizáló poliol hidroxilcsoportjai révén helyettesíteni képes a szerves oldószer által az enzim hidrátburkából elvont vízmolekulákat. Ugyanakkor igazoltuk azt is, hogy a vizsgált redukáló cukrok (ribóz, fruktóz, glükóz) nyílt láncú formában kovalens kötést képesek létrehozni a papain primer aminocsoportjaival. A redukáló cukrok stabilizáló hatása eltérő volt, ami abból adódhat, hogy oldatban más arányban vannak jelen nyílt láncú és gyűrűs formában, ill. az aldózok reaktivitása nagyobb a ketózokénál.
4. A fluoreszcencia- és CD-mérések rámutattak arra, hogy a THF vízelvonó hatása mellett megbontja a papain szerkezetét is. A triptofánfluoreszcencia-paraméterek változása arra utalt, hogy fruktóz és ribóz jelenlétében THF/víz elegyben a Trp-oldalláncok egy apolárosabb környezetbe kerülnek, eltemetődnek a papain belsejébe, létrehozva egy kompaktabb szerkezetet. Összhangban a fluoreszcencia-mérésekkel a közeli-UV-CD spektrális változások azt mutatták, hogy a szénhidrátok stabilizálni képesek az enzim harmadlagos szerkezetét, melyben lokális és specifikus változások történnek. Kimutattuk, hogy a CD-sávokban tapasztalt változásokért redukáló cukrok jelenlétében a papain primer aminocsoportjai, és a szénhidrát-molekulák között kialakuló Schiff-bázisok tehetők felelőssé.
5. Kémiai módosítások hatását is megvizsgáltuk a papain aktivitására és stabilitására. A módosításokat mono- (ecetsav és propionsav) és dikarbonsav-anhidridekkel (citrakonsav, maleinsav, borostyánkősav) végeztük. Kimutattuk, hogy az acilálások során a papain primer aminocsoportjainak többsége módosul. A monokarbonsav-anhidrides módosítások csökkentették a papain pozitivitását, a dikarbonsav-anhidrides módosítások pedig negatív

töltéseket vittek be az enzim szerkezetébe. A kémiailag módosított papain elektroforetikus mintázata minden esetben 2–3 enzimforma egyidejű jelenlétét mutatta.

6. Kísérleti eredményeink arra is rámutattak, hogy a kémiai módosítások stabilizáló hatása nagymértékben függ az oldószer karakterétől. Kimutattuk, hogy a módosított enzimformák a vizes közeg mellett etanolos közegben is jelentősen aktívabbak a kontroll enzimnél, azonban ez a hatás ACN-es és THF-es közegben kevésbé érvényesült. Eredményeink azt is mutatták, hogy etanolos közegben a mokokarbonsav-anhidriddel módosított enzim stabilitása kétszer akkora, mint a dikarbonsav-anhidriddel módosított papainé. Igazoltuk, hogy a kémiai módosításokkal együtt jár a papain katalitikus hatékonyságának növekedése is. Kísérleti eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a kémiai módosítások az aktív centrum közelében olyan Lys-oldalláncot érintenek, amelynek acilálása kedvező hatással van az enzim katalitikus triádjának működésére.
7. A triptofánfluoreszcencia-paraméterek arra utaltak, hogy etanol hatására a módosított papain szerkezetében valamelyest kisebb változás történik, mint a kontroll enzimében. Közeli-UV-CD-mérésekkel kimutattuk azt is, hogy az enzim konformációjában nem okozott jelentős változást az anhidrides módosítás sem vizes, sem etanolos közegben.
8. Meghatároztuk a módosított enzimformák szintetikus aktivitását is etanolos közegben, szubsztrátként *N*-ac-L-Tyr-t használtunk. Kimutattuk, hogy a módosítások minden esetben szignifikánsan növelik az észterszintézis konverzióját. A monokarbonsav-anhidriddel módosított papain jóval hatékonyabbnak bizonyult a dikarbonsav-anhidriddel módosítottnál. Tehát a papain pozitív töltéseinek semlegesítése egy hatékonyabb enzimformát eredményezett a pozitív töltések negatívra cserélésénél.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy a papain stabilitása függ az oldószer tulajdonságaitól. Eredményeink azt is igazolták, hogy szerves oldószer hatására a papain másod- és harmadlagos szerkezetében jelentős változások történhetnek. A papain szerves oldószerek okozta inaktiválódását szénhidrátok alkalmazásával és anhidrides kémiai módosításokkal sikerült csökkenteni. A szénhidrátok közül a ribóz, az anhidridek közül a monokarbonsav-anhidridek voltak igazán alkalmasak az enzim stabilitásának növelésére. Kimutattuk, hogy a szénhidrátok stabilizálni képesek az enzim harmadlagos szerkezetét; a szerves savanhidrides kémiai módosítások viszont nem okoznak jelentős szerkezetváltozást, a papain aktivitás- és stabilitásnövekedése inkább töltésállapotbeli változással magyarázható.



## 7. SUMMARY

Enzymatic reactions in aqueous organic solvent systems have recently received a great deal of attention. The use of hydrolytic enzymes in organic solvents has extended the scale of their practical applications and allowed the syntheses of polymeric, biologically active enantiomers that are difficult to obtain with conventional chemical catalysts. However, organic solvents can inactivate enzymes in several ways: Organic solvent molecules can interact with the biocatalyst, disrupting the secondary bonds in the native structure; they can strip the essential water molecules from the hydration shell and the structure of the enzyme; or they can interact with the active site of the biocatalyst, causing inactivation. A number of techniques have therefore been developed in order to reduce the inactivation, involving immobilization, chemical modification and genetic engineering. Papain is a highly stable enzyme, one of the sulfhydryl proteases of *Carica papaya* latex. In view of its wide substrate specificity, papain is frequently used in the chemical synthesis of peptides and amino acid esters. Papain is an  $\alpha+\beta$  protein; its molecular structure consists of two distinct domains, with the active site in the groove between the domains. The L domain contains mainly the  $\alpha$ -helix, while the R domain has a large content of the antiparallel  $\beta$ -sheet and a lesser amount of the  $\alpha$ -helix.

The aim of our work was to investigate the effects of water-miscible [ethanol, methanol, acetone, acetonitrile (ACN) and tetrahydrofuran (THF)] and water-immiscible [ethyl acetate, *n*-hexane and toluene] solvents on the stability of papain. We also studied the effects of additive carbohydrates and chemical modifications with organic acid anhydrides on the catalytic activity and stability of papain in water-miscible organic solvent mixtures. The structural changes were followed by means of fluorescence and CD spectroscopy measurements. In a model reaction, the modified enzyme forms were used to catalyse the synthesis of *N*-acetyl-L-tyrosine ethyl ester in order to compare the efficiencies of these biocatalysts.

The results of our experiments can be summarized as follows:

1. The effects of the organic solvents on the activity of papain in aqueous solutions were different, but the data correlated well with the hydrophobicity ( $\log P$ ) of the solvents. While papain in 90 v/v% ethanol, methanol, acetone and ACN preserved 30–82% of its catalytic activity, *n*-hexane, toluene, ethyl acetate and THF caused dramatic reductions in the activity. The decrease of the activity of papain correlated with the increasing hydrophobicity of the

organic solvents. The stability of papain was investigated in aqueous ethanol, methanol, ACN and THF. In water (pH 6.2) the stability of papain did not change during 120 min, whereas 90 v/v% ethanol, methanol and ACN decreased its stability. It is possible that organic solvent molecules can replace water molecules in the structure and the hydration shell of papain, resulting in inactivation. In biphasic systems, papain molecules may be accumulated in the interface, leading to structural changes and a reduction in catalytic activity.

2. The fluorescence properties of the Trp residues were studied in aqueous ethanol, methanol, ACN and THF. The different aqueous organic solvents affected the fluorescence parameters, the maximum fluorescence intensity ( $I_{\max}$ ) and the maximum emission wavelength ( $\lambda_{\max}$ ). Our results showed that aqueous ethanol and methanol did not alter the structure of papain. However, in aqueous ACN and THF, more significant changes were observed in the structure of the enzyme. The far-UV CD spectra of papain in 90 v/v% ethanol and ACN indicated increases in the ordered secondary structural elements (random  $\rightarrow$   $\alpha$ -helix) and conformational transition ( $\beta$ -sheet  $\rightarrow$   $\alpha$ -helix). The far-UV CD spectra also indicated that the tertiary structural changes of papain were moderate in aqueous ethanol, but were more significant in aqueous ACN and THF, especially at high concentrations. In THF/water mixtures, the intensity of the CD spectra gradually decreased in the concentration range 30–70 v/v%, and at 90 v/v% THF the low-intensity spectrum completely eliminated the bands typical of native papain.
3. At 60 v/v% THF content, the residual activity of papain after 30 min was only about 10%. The THF-induced inactivation of papain could be compensated by the addition of carbohydrates. The stabilizing effects of polyols on the activity of papain decreased in the sequence D-ribose > D-fructose > D-glucose > D-saccharose > D-raffinose. The highest activity of papain was maintained in the presence of ribose, glucose or fructose. The thermodynamic parameters ( $\tau$  and  $\Delta\Delta G_i^\ddagger$ ) calculated from these measurements also supported the stabilizing effect of these carbohydrates. We clarified that ribose exhibited the most marked stabilizing effect.
4. The Trp fluorescence parameters of papain were investigated in the presence of carbohydrates. The changes in the fluorescence parameters suggested a THF-induced denaturation. 0.8 M ribose and 0.4 M fructose in 60 v/v% THF resulted in significant changes in the fluorescence parameters as compared with those observed in 60 v/v% THF. In

THF/water mixtures the presence of saccharose indicated only a minimal stabilizing effect on the structure of papain. In the near-UV CD spectrum of papain, a considerable decrease was observed between 275 and 250 nm in 60 v/v% THF as compared with that in water. Ribose resulted in a smaller and fructose in a higher increase in the band intensity in this spectral region relative to that observed in 60 v/v% THF. The decreased CD spectral change probably reflects a less compact tertiary structure of the enzyme in this solvent. The increased spectral intensities in the presence of fructose and ribose in 60 v/v% THF indicate that these sugars exert protective effects on the tertiary structure of papain. The carbohydrates may incorporate into the hydration shell of the enzyme.

In 60 v/v% THF in the presence of fructose, the CD spectrum displays two maxima and one minimum. At the wavelength where the CD spectrum in the presence of fructose exhibited a minimum, a peak appeared in the presence of ribose. Monosaccharides such as ribose and fructose are known to have the ability to react non-enzymatically in their open chain form with free amino groups of proteins, producing Schiff bases. The formation of Schiff bases is expected to result in opposite CD contributions for ribose and fructose since the configurations of the chiral centre adjacent to the Schiff base chromophore are opposite. To support the formation of Schiff bases between papain and reducing sugars, we determined the free amino group content of papain in the presence of glucose, fructose and ribose in 60 v/v% THF. Without sugars the number of free amino groups did not change, while in the presence of ribose, glucose and fructose a loss in free amino group was detected. The number of free amino groups decreased significantly, especially in the presence of ribose. The ability of a reducing sugar to form a Schiff base is dependent upon the amount of the open-chain form and the reactivity.

5. Chemical modification of the primary amino groups of enzymes (amino-terminal and lysine residues) with organic acid anhydrides is another useful strategy for enhancing the stability of biocatalysts. Modifications were carried out with acetic, propionic, citraconic, succinic and maleic anhydrides. Monocarboxylic acid anhydrides (acetic and propionic anhydrides) neutralized the positive charge on the lysine residues, whereas dicarboxylic acid anhydrides (citraconic, succinic and maleic anhydrides) replaced the positive charges on the amino groups of lysines with negatively charged carboxyl groups in the enzyme structure. On the use of acid anhydrides, 7–10 of the 11 primary amino groups of papain were modified. These

modifications changed the native polyacrylamide gel electrophoresis pattern of the enzyme. The native, acetyl and propionyl papain moved toward the cathode with different mobilities, while citraconyl, maleyl and succinyl papain migrated to the anode during electrophoresis. The modified enzyme forms exhibited heterogenic patterns, containing 2 or 3 bands, because the primary amino groups of the papain molecules were not acylated equally, and consequently there may be some variances in modification between the enzyme molecules.

6. In comparison with unmodified papain, the modified enzymes exhibited an increase of about 2-fold in catalytic activity in phosphate buffer (pH 8.0). The activities of the modified enzyme forms were studied at different concentrations of aqueous ethanol, ACN and THF. The activity of the unmodified enzyme did not vary significantly with increasing ethanol concentration. Working in buffer, the catalytic activities of the forms of papain modified by treatment with monocarboxylic acid anhydrides were higher than those of the enzyme forms modified with dicarboxylic acid anhydrides. Further increases in the catalytic activity of propionyl and acetyl papain were measured in 20–40 v/v% ethanol. This activation might be explained in terms of the difference in net charge between the modified enzyme forms and the native enzyme. The stabilizing effects of the modifications were more moderate in aqueous ACN, while in the THF/water mixture the modifications did not influence the catalytic activity of the enzyme.

The kinetic properties ( $V_{\max}$  and  $K_M$ ) of citraconyl and propionyl papain were studied in an ethanol/water mixture to compare the catalytic efficiencies ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ) of the enzyme forms. Both in buffer and in aqueous ethanol, the  $V_{\max}$  and  $K_M$  values of the modified enzymes were higher than those of the unmodified enzyme. These differences in the kinetic parameters reflect a decreased substrate affinity of the acyl forms, accompanied by a higher reaction rate. The modifications enhanced the  $k_{\text{cat}}/K_M$  value of papain both in aqueous media and in the ethanol/water mixture. These results demonstrate that the chemical modifications influence the binding and cleavage of the substrate molecules. The higher catalytic efficiency of papain might be explained by the charge of a Lys residue near the active site changed by the chemical modifications.

The stabilities of the modified papain forms were also investigated in 40 v/v% ethanol, ACN and THF. Both in aqueous ethanol and in ACN, the acyl derivatives proved more stable than unmodified papain. Nevertheless, in aqueous ethanol, the stabilities of propionyl and acetyl

papain were significantly higher than those of citraconyl, maleyl and succinyl papain. The difference in stability might be a consequence of the altered net charge of the modified enzyme forms. In aqueous THF, the activities of the unmodified and modified enzymes were sharply decreased, and after 60 min the activities of the unmodified and modified papain forms practically did not differ. Our results show that the stabilities of the acyl papain forms depend on the chemical properties of the medium.

7. Near-UV CD measurements were performed to elucidate the tertiary structures of the native and citraconyl papain in aqueous solutions and ethanol/water mixtures. Significant changes in band intensities were not detected between the citraconyl and unmodified forms of papain either in water or in 40 v/v% ethanol. However, the band intensity of citraconylated papain in aqueous media was lower than that of the unmodified enzyme and the decrease was smaller in ethanol. Consequently, in water the tertiary structure of the modified enzyme is less compact than that of the unmodified form, whereas in aqueous ethanol the modified enzyme preserves a native structure similar to that detected for the unmodified enzyme in buffer. Acylation of papain with citraconic or propionic anhydride did not influence  $\lambda_{\max}$  in buffer, but in 40 v/v% ethanol, blue shifts were observed for both unmodified and modified papain. The  $I_{\max}$  values exhibited different responses to variation of the surface charge and solvent. In buffer, the  $I_{\max}$  of propionyl papain did not differ from that of the unmodified enzyme, whereas a significant decrease was observed in the case of citraconyl papain. In aqueous ethanol,  $I_{\max}$  for the unmodified enzyme was 30% lower than that in aqueous media. The decreases in  $I_{\max}$  for citraconyl or propionyl papain were more moderate.
8. A model reaction for the synthesis of *N*-acetyl-L-Tyr ethyl ester was carried out in ethanol containing 4 v/v% water to investigate the efficiencies of the modified papain forms under non-optimized conditions. For citraconyl, succinyl and maleyl papain, the esterification conversion was 30–33%, whereas with acetyl and propionyl papain it attained 50–52%, in contrast with the unmodified papain (23%). The results indicate that neutralization of the lysine residues with acetic or propionic anhydride establishes a more effective enzyme than does modification with the dicarboxylic acid anhydride.

In the course of our experiments, the unfavourable effects of organic solvents on the catalytic activity and stability of papain were compensated by means of the addition of carbohydrates and chemical modifications with organic acid anhydrides. Our results may help shed light on the effects of organic solvents on the activities and stabilities of enzymes and on the activity–structure relationship with a view to improving their industrial applications.

## 8. IRODALOM

- Adlercreutz P (1994) Biocatalysis in non-conventional media. In: Applied Biocatalysis (Eds. Cabral JMS, Best D, Boross L, and Tramper J), Harwood Academic Publishers, Switzerland, pp 279–298
- Allen KGD, Stewart JA, Johnson PE, Wettlaufer DG (1978) Identification of the functional ionic groups of papain by pH/rate profile analysis, *Eur. J. Biochem.*, **87**, 575–582
- Alston RW, Urbanikova L, Sevcik J, Lasagna M, Reinhart GD, Scholtz JM, Pace CN (2004) Contribution of single tryptophan residues to the fluorescence and stability of ribonuclease Sa, *Biophys. J.*, **87**, 4036–4047
- Arakawa T, Bhat R, Timasheff S (1990) Preferential interactions determine protein solubility in three component solutions: the magnesium chloride system, *Biochemistry*, **29**, 1914–1923
- Arnon, R. (1970) Papain, *Methods Enzymol.*, **19**, 226–244
- Aronson D (2004) Pharmacological prevention of cardiovascular aging – targeting the Maillard reaction, *Brit. J. Pharmacol.*, **142**, 1055–1058
- Athawale MV, Dordick JS, Garde S (2005) Osmolyte Trimethylamine-*N*-oxide does not affect the strength of hydrophobic interactions: origin of osmolyte compatibility, *Biophys. J.*, **89**, 858–866
- Back JF, Oakenfull D, Smith MB (1979) Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols, *Biochemistry*, **18**, 5191–5196
- Bell G, Halling PJ, Moore BD, Partridge J, Rees DG (1995) Biocatalyst behaviour in low-water system, *Trends Biotechnol.*, **13**, 468–473
- Berti PJ, Storer AC (1995) Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases, *J. Mol. Biol.*, **246**, 273–283
- Bhatti HN, Rashid MH, Asqher M, Nawaz R, Khalid AM, Perveen R (2007) Chemical modification results in hyperactivation and thermostabilization of *Fusarium solani* glucoamylase, *Can. J. Microbiol.*, **53**, 177–185
- Boross L, Kosáry J, Stefanovits-Bányai É, Sisak C, Szajáni B (1998) Studies on the stability of aminoacylase in some organic solvents. In: Stability and stabilization of biocatalysts (Eds. Ballesteros A, Plou FJ, Iborra JL, Halling PJ) *Prog. Biotechnol.*, **15**, 477–482
- Brocklehurst K, Willenbrock F, Salih E (1987) Cysteine proteinases, In *New Comprehensive Biochemistry* (Eds. Neuberger A, Brocklehurst K) Elsevier: Amsterdam, New York, Vol. **16**, pp 39–158
- Bunn HF, Higgins PJ (1981) Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance, *Science*, **213**, 222–224
- Butler PJG, Harris JJ, Hartley BS, Leberman R (1969) The use of maleic anhydride for the reversible blocking of amino groups on polypeptide chains, *Biochem. J.*, **112**, 679–689
- Cao L, van Langen LM, van Rantwijk F, Sheldon RA (2001) Cross-linked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **11**, 665–670
- Castillo B, Solá RJ, Rerrer A, Barletta G, Griebenow K (2008) Effect of PEG modification on subtilisin Carlsberg activity, enantioselectivity, and structural dynamics in 1,4-dioxane, *Biotechnol. Bioeng.*, **99**, 9–17
- Castro, G.R. (1999) Enzymatic activities of proteases dissolved in organic solvents, *Enzyme Microb. Technol.*, **25**, 689–694
- Chojnacka A, Obara R, Wawrzencyk (2007) Kinetic resolution of racemic secondary aliphatic allylic alcohols in lipase-catalyzed transesterification, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **18**, 101–107

- Clapés P, Morán C, Infante MR (1999) Enzymatic synthesis of arginine-based cationic surfactants, *Biotechnol. Bioeng.*, **63**, 333–343
- Cohen L, Coghlan V, Dihel L (1986) Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA, *Gene*, **48**, 219–227
- Cui L, Du G, Zhang D, Fan X, Chen J (2008) Stability and conformational changes of transglutaminase from *Streptomyces hygrosopicus* in ethanol-aqueous medium, *Process Biochem.*, **43**, 887–889
- Dai L, Klibanov AM (1999) Striking activation of oxidative enzymes suspended in nonaqueous media, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 9475–9478
- Dardenne LE, Werneck AS, Neto MO, Bisch PM (2003) Electrostatic properties in the catalytic site of papain: A possible regulatory mechanism for the reactivity of the ion pair, *Proteins*, **52**, 236–256
- Davis BG (2003) Chemical modification of biocatalysts, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 379–386
- Drenth J, Jansonius J., Koekoek R, Swen HM, Wolthers BG (1968) Structure of papain, *Nature*, **218**, 929–932
- Drenth J, Jansonius JN, Koekoek R., Wolthers BG (1971) The structure of papain, *Adv. Protein. Chem.*, **25**, 79–115
- Duan XH, Hall JA, Nikaido FA, Quicho J (2001) Crystal structures of the maltodextrin/maltose-binding protein complexed with reduced oligosaccharides: flexibility of tertiary structure and ligand binding, *J. Mol. Biol.*, **306**, 1115–1126
- Edwin F, Jagannadham MV (1998) Sequential unfolding of papain in molten globule state, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **252**, 654–660
- Edwin F, Sharma YV, Jagannadham MV (2002) Stabilization of molten globule state of papain by urea, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290**, 1441–1446
- Eltaweel MA, Rahman RNZRA, Salleh AB, Basri M (2005) An organic solvent-stable lipase from *Bacillus* sp. Strain 42, *Annals Microb.*, **55**, 187–192
- Fágáin CÓ (1995) Understanding and increasing protein stability, *Biochim. Biophys. Acta*, **1252**, 1–14
- Fágáin CÓ (2003) Enzyme stabilization – recent experimental progress, *Enz. Microb. Technol.*, **33**, 137–149
- Fan KK, Ouyang P, Wu X, Lu Z (2001) A model of interfacial inactivation for papain in aqueous organic biphasic systems, *Enz. Microb. Technol.*, **28**, 3–7
- Fatima S, Khan RH (2007) Effect of polyethylene glycols on the function and structure of thiol proteases, *J. Biochem.*, **142**, 65–72
- Fields R (1971) The measurement of amino groups in proteins and peptides, *Biochem. J.*, **124**, 581–590
- Fitzpatrick PA, Steinmetz ACU, Ringe D, Klibanov AM (1993) Enzyme crystal structure in a neat organic solvent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8653–8657
- Freedman MH, Grossberg AL, Pressman D (1968) The effects of complete modification of amino groups on the antibody activity of antihapten antibodies. Reversible inactivation with maleic anhydride, *Biochemistry*, **7**, 1941–1950
- Gupta MN (1992) Enzyme function in organic solvents, *Eur. J. Biochem.*, **203**, 25–32
- Halling PJ (1990) High-affinity binding of water by proteins is similar in air and in organic solvents, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1040**, 225–228
- Haque I, Islam A, Singh R, Moosavi-Movahedi AA, Ahmad F (2006) Stability of proteins in the presence of polyols estimated from their guanidinium chloride-induced transition curves at different pH values and 25 °C, *Biophys. Chem.*, **119**, 224–233



- Haque I, Singh R, Moosavi-Movahedi AA, Ahmad F (2005) Effect of polyol osmolytes on  $\Delta G_D$ , the Gibbs energy of stabilisation of proteins at different pH values, *Biophys. Chem.*, **117**, 1–12
- Harris JL, Backes BJ, Leonetti F, Mahrus S, Ellman JA, Craik CS (2000) Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries, *PNAS*, **97**, 7754–7759
- Hassani L, Ranjbar B, Khajeh K, Naderi-Manesh H, Naderi-Manesh M, Sadeghi M (2006) Horseradish peroxidase thermostabilization: The combinatorial effects of the surface modification and the polyols, **38**, 118–125
- Hernandez-Arana A, Soriano-Garcia M (1988) Detection and characterization by circular dichroism of a stable intermediate state formed in the thermal unfolding of papain, *Biochim. Biophys. Acta*, **954**, 170–175
- Hirano Y, Terai T, Goto K, Nakajima A (1991) Effect of polyethylene glycol on the synthesis of oligopeptide by papain in an organic medium, *Agric. Bio. Chem.*, **55**, 2461–2465
- Hollósi, M., Laczkó, I., Majer, Zs. (2004) A sztereokémia és kiroptikai spektroszkópia alapjai, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, pp 165–180
- Horvat S, Jakas A, Vass E, Samu J, Hollósi M (1997) CD and FTIR spectroscopic studies of Amadori compounds related to the opioid peptides, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2**, 1523–1528
- Hossainkhani S, Ranjbar B, Naderi-Manesh H, Nemat-Gorgani M (2004) Chemical modification of glucose oxidase: possible formation of molten globule-like intermediate structure, *FEBS Lett.*, **561**, 213–216
- Iyer PV, Ananthanarayan L (2008) Enzyme stability and stabilization – Aqueous and non-aqueous environment, *Process Biochem.*, **43**, 1019–1032
- Kamphuis IG, Kalk KH, Swarte MBA, Drenth J (1984) Structure of papain refined at 1.65 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **179**, 233–256
- Kamphuis IG, Drenth J, Baker EN (1985) Thiol proteases. Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and amino acid sequence information for cathepsin B and H, and stem bromelain, *J. Mol. Biol.*, **182**, 317–329
- Kaneko H, Minagawa H, Shimada J (2005) Rational design of thermostable lactate oxidase by analyzing quaternary structure and prevention of deamidation, *Biotechnol. Lett.*, **27**, 1777–1784
- Katchalski-Katzir E (1993) Immobilized enzymes-learning from past successes and failures, *Trends Biotechnol.*, **11**, 471–478
- Kaul P, Banerjee UC (2008) Predicting enzyme behavior on nonconventional media: correlating nitrilase function with solvent properties, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 713–720
- Kaushik JK, Bhat R (2003) Why Is Trehalose an Exceptional Protein Stabilizer?: An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose, *J. Biol. Chem.*, **278**, 26458–26465
- Khajeh K, Naderi-Manesh H, Ranjbar B, Moosavi-Movahedi AA, Nemat-Gorgani M (2001) Chemical modification of lysine residues in *Bacillus*  $\alpha$ -amilases: effect on activity and stability, *Enz. Microb. Technol.*, **28**, 543–549
- Khaparde SS, Singhal RS (2001) Chemically modified papain for applications in detergent formulation, *Biores. Technol.*, **78**, 1–4
- Kim YS, Jones LS, Domg A, Kendrick BS, Chang BS, Manning MC, Randolph TW, Carpenter JF (2007) Effects of sucrose on conformational equilibria and fluctuations within native-state ensemble of proteins, *Prot. Sci.*, **12**, 1252–1261
- Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC (2002) Industrial enzyme applications, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 345–351

- Klibanov AM (1989) Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents, *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 141–144
- Klibanov AM (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature*, **409**, 241–246
- Koeller KM, Wong CH (2001) Enzymes for chemical synthesis, *Nature*, **409**, 232–240
- Konno K, Hirayama C, Nakamura M, Tateishi K, Tamura Y, Hattori M, Kohno K (2004) Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex, *Plant J.*, **37**, 370–378
- Kudryashova EV, Artemova TM, Vinogradov AA, Gladilin AK, Mozhaev VV, Levashov AV (2003) Stabilization and activation of  $\alpha$ -chymotrypsin in water–organic solvent systems by complex formation with oligoamines, *Prot. Eng.*, **16**, 303–309
- Laane C, Boeren S, Vos K (1985) On optimizing organic solvents in multi-liquid-phase biocatalysis, *Trends Biotechnol.*, **3**, 251–252
- Lakowicz, JR (1983) *Principles of fluorescence spectroscopy*, Plenum Press, New York, pp 341–381
- Lambert D, Draper DE (2007) Effects of osmolytes on RNA secondary and tertiary structure stabilities and RNA-Mg<sup>2+</sup> interactions, *J. Mol. Biol.*, **370**, 993–1005
- László K (2002) Az  $\alpha$ -kimotripszin stabilitása és működése szerves oldószeres közegben, *Doktori értekezés, SZTE, TTK, Biokémiai Tanszék, Szeged*, pp 9–15
- Lecaille F, Serveau C, Gauthier F, Lalmanach G (1999) Revisiting the S2 specificity of papain by structural analogs of Phe, *FEBS Lett.*, **445**, 311–314
- Li G, Vaidya A, Viswanathan K, Cui J, Xie W, Gao W, Gross RA (2006) Rapid regioselective oligomerization of L-glutamic acid diethyl ester catalysed by papain, *Macromol.*, **39**, 7915–7921
- Liu JZ, Wang TL, Huang MT, Song HY, Weng LP, Ji LN (2006) Increased thermal and organic solvent tolerance of modified horseradish peroxidase, *Prot. Eng.*, **19**, 169–173
- Liu P, Tian G, Lee KS, Wong MS, Ye Y. (2002) Full enzymatic synthesis of a precursor of bioactive pentapeptide OGP(10-14) in organic solvents, *Tetrahed. Lett.*, **43**, 2423–2425
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275
- Lozano P, Cano J, Iborra JL, Manjón A (1993) Glycylglycylphenylalaninamide synthesis catalysed by papain in a medium containing polyols, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **18**, 67–74
- Malone LA, Todd JH, Burgess EPJ, Philip BA (2005) Effects of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) cystein protease on growth and survival of *Spodoptera litura* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) fed with control or transgenic avidin-expressing tobacco, *NZ. J. Crop. Horticult. Sci.*, **33**, 99–105
- Manavalan P, Johnson WC (1983) Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class, *Nature*, **305**, 831–832
- Masuda T, Ide N, Kitabatake N (2005) Effects of chemical modification of lysine residues on the sweetness of lysozyme, *Chem. Sense*, **30**, 253–264
- Mateo B, Palomo JM, van Langen LM, van Rantwijk F, Sheldon RA (2004) A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates, *Biotechnol. Bioeng.*, **86**, 273–276
- Ménard R, Carmona E, Plouffe C, Brömme D, Konoshi Y, Lefebvre J, Storer AC (1993) The specificity of the S1' subsite of cysteine proteases, *FEBS Lett.*, **328**, 107–110
- Ménard R, Plouffe C, Laflamme P, Vernet T, Tessier DC, Thomas DY, Storer AC (1995) Modification of the electrostatic environment is tolerated in the oxyanion hole of the cysteine protease papain, *Biochemistry*, **34**, 464–471

- Migliorini M, Creighton DJ (1986) Active-site ionizations of papain. An evaluation of the potentiometric difference titration method, *Eur. J. Biochem.*, **156**, 189–192
- Mitin YV, Braun K, Kuhl P (1996) Papain catalysed synthesis of glyceril esters of N-protected amino acids and peptides for the use in trypsin catalysed peptide synthesis, *Biotech. Bioeng.*, **54**, 287–290
- Morcelle SR, Barberis S, Priolo N, Caffini NO, Clapés P (2006) Comparative behaviour of proteinases from the latex of *Carica papaya* and *Funastrum clausum* as catalysts for the synthesis of Z-Ala-Phe-OMe, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **41**, 117–124
- Mossavarali S, Hosseinkhani S, Ranjbar B, Miroliaej M (2006) Stepwise modification of lysine residues of glucose oxidase with citraconic anhydride, *Int. J. Biol. Macromol.*, **39**, 192–196
- Mozhaev VV (1998) Engineering stability of enzymes in systems with organic solvents. In: *Stability and stabilization of biocatalysts* (Eds. Ballesteros A, Plou FJ, Iborra JL, Halling PJ) *Prog. Biotechnol.*, **15**, 355–362
- Naeem A, Fatima S, Khan RH (2006) Characterization of partially folded intermediate of papain in the presence of cationic, anionic and nonionic detergents at low pH, *Biopolymers*, **83**, 1–10
- Naeem A, Khan KA, Khan RH (2004) Characterization of partially folded intermediate of papain induced by fluorinated alcohols at low pH, *Arch. Biochem. Biophys.*, **432**, 79–87
- Nitsawang S, Hatti-Kaul R, Kanasawud P (2006) Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation, *Enz. Microb. Technol.*, **39**, 1103–1107
- Padilla-Zúniga AJ, Rojo-Domínguez A (1998) Non-homology knowledge-based prediction of the papain prosegment folding pattern: a description of plausible folding and activation mechanisms, *Fold. Des.*, **3**, 271–284
- Palackal N, Brennan Y, Callen WN, Dupree P, Frey G, Goubet F, Hazlewood GP, Healey S, Kang YE, Kretz KA, et al. (2004) An evolutionary route to xylanase process fitness, *Protein Sci.*, **13**, 494–503
- Panella L, Broos J, Jin J, Fraaije MW, Janssen DB, Jeronimus-Stratingh M, Feringa BL, Minnaard AJ, Vries JG (2005) Merging homogeneous catalysis with biocatalysis; papain as hydrogenation catalyst, *Chem. Commun.*, 5656–5658
- Pazhang M, Khajeh K, Ranjbar B, Hosseinkhani S (2006) Effects of water-miscible solvents and polyhydroxy compounds on the structure and enzymatic activity of thermolysin, *J. Biotechnol.*, **127**, 45–53
- Peppas M, Uribarri J, Vlassara H (2003) Glucose advanced glycation end products, and diabetes complications: What is new and what works, *Clin. Diab.*, **21**, 186–187
- Perczel, A., Laczkó, I., Hollósi, M. (1994) Peptidek térszerkezet-vizsgálata, A kémia újabb eredményei **77**, Akadémiai Kiadó, Budapest, 38–62
- Polgár L, Halász P (1982) Current problems in mechanistic studies of serine and cysteine proteases, *Biochem. J.*, **207**, 1–10
- Polizzi KM, Bommaris AS, Broering JM, Chaparro-Riggers JF (2007) Stability of biocatalysts, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **11**, 220–225
- Portaro FCV, Santos ABF, Cezari MHS, Juliano MA, Juliano L, Carmona E (2000) Probing the specificity of cysteine proteinases at subsites remote from the active site: analysis of P<sub>4</sub>, P<sub>3</sub>, P'<sub>2</sub> and P'<sub>3</sub> variations in extended substrates, *Biochem J.*, **347**, 123–129
- Provencher SW, Glöckner J (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism, *Biochemistry*, **20**, 33–37
- Qu Y, Bolen CL, Bolen DW (1998) Osmolyte-driven contraction of a random coil protein, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 9268–9273

- Record MT, Courtenay ES, Cayley DS, Guttman HJ (1998) Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water, *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 143–148
- Reddy VP, Beyaz A (2006) Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases, *Drug Discov. Today*, **11**, 646–654
- Reichardt C (2003) Solvents and solvents effects in organic chemistry, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 3rd ed., pp 93–146
- Reslow M, Adlercreutz P, Mattiasson B (1987) Organic solvents for bioorganic synthesis. 1. Optimization of parameters for a chymotrypsin catalysed process, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 1–8
- Roig MG, Kennedy JF (1992) Perspectives for chemical modifications of enzymes, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **12**, 391–412
- Romero CM, Lozano JM, Sancho J, Giraldo GI (2007) Thermal stability of  $\beta$ -lactoglobulin in the presence of aqueous solution of alcohols and polyols, *Int. J. Biol. Macromol.*, **40**, 423–428
- Ross AC, Bell G, Halling PJ (2000) Effect of pH on rate of interfacial inactivation of serine proteases in aqueous-organic systems, *Biotech. Bioeng.*, **67**, 498–503
- Roy JJ, Sumi S, Sangeetha K, Abraham TE (2005) Chemical modification and immobilization of papain, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **80**, 184–188
- Sangeeta DY, Nair UB, Bhat R (1998) Effect of a mixed stabilizer-denaturant system on the stability of enzyme activity at high temperatures: lysozyme as a model. In: *Stability and stabilization of biocatalysts* (Eds. Ballesteros A, Plou FJ, Iborra JL, Halling PJ) *Prog. Biotechnol.*, **15**, 263–268
- Sangeetha K, Abraham TE (2006) Chemical modification of papain for use in alkaline medium, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **38**, 171–177
- Sakurai K, Kashimoto K, Kodera Y, Inida Y (1990) Solid phase synthesis of peptides with polyethylene glycol modified protease in organic solvents, *Biotechnol. Lett.*, **12**, 685–688
- Sathish HA, Kumar PR, Prakash V (2007) Mechanism of solvent induced thermal stabilization of papain, *Int. J. Biol. Macromol.*, **41**, 2007, 383–390
- Schechter I, Berger A (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 157–162
- Schumacher J, Eckstein M, Kragl U (2006) Influence of water-miscible organic solvents on kinetics and enantioselectivity of the *R*-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*, *Biotechnol. J.*, **1**, 574–581
- Sergeeva MV, Paradkar VM, Dordick JS (1997) Peptide synthesis using proteases dissolved in organic solvents, *Enz. Microb. Technol.*, **20**, 623–628
- Shapira E, Arnon R (1969) Cleavage of one specific disulfide bond in papain, *J. Biol. Chem.*, **244**, 1026–1032
- Sheldon RA (2007) Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts, *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 1583–1587
- Simon LM, Kotormán M, Garab G, Laczkó I (2001) Structure and activity of  $\alpha$ -chymotrypsin and trypsin in aqueous organic media, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **280**, 1367–1371
- Simon LM, Kotormán M, Garab G, Laczkó I (2002) Effects of polyhydroxy compounds on the structure and activity of  $\alpha$ -chymotrypsin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 416–20
- Simon LM, Kotormán M, Szabó A, Garab G, Laczkó I (2004) Effects of polyethylene glycol on stability of alpha-chymotrypsin in aqueous ethanol solvent, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, 610–613

- Simon LM, Kotormán M, Szabó A, Nemcsók J, Laczkó I (2007) The effects of organic solvent/water mixtures on the structure and catalytic activity of porcine pepsin, *Process Biochem.*, **42**, 909–912
- Singer MA, Lindquist S (1998) Multiple Effects of Trehalose on Protein Folding In Vitro and In Vivo, *Mol. Cell.*, **1**, 639–648
- Sluyterman LA, de Graaf MJ (1969) The activity of papain in crystalline state, *Biochim. Biophys. Acta*, **171**, 277–287
- Smyth DG, Blumenfeld OO, Konigsberg W (1964) Reactions of N-ethylmaleimide with peptides and amino acids, *Biochem J.*, **91**, 589–595
- Song HY, Yao JH, Liu JZ, Zhou SJ, Xiong YH, Ji LN (2005) Effects of phthalic anhydride modification on horseradish peroxidase stability and structure, *Enzyme Microb. Technol.*, **36**, 605–611
- St. Clair NL, Navia MA (1992) Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 7314–7316
- Stevenson DE, Storer AC (1990) Papain in organic solvents: Determination of conditions suitable for biocatalysis and the effect on substrate specificity and inhibition, *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 519–527
- Storer AC, Ménard R (1994) Catalytic mechanism in the papain family of cysteine peptidases, *Methods Enzymol.*, **244**, 486–500
- Street TO, Bolen DW, Rose GD (2006) A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **103**, 13997–14002
- Szabelski M, Stachowiak K, Wiczak W (2001) Influence of Me<sub>2</sub>SO and incubation time on papain activity studied using fluorogenic substrates, *Acta. Biochim. Pol.*, **48**, 995–1002
- Szabelski M, Stachowiak K, Wiczak W (2001) Influence of organic solvents on papain kinetics, *Acta. Biochim. Pol.*, **48**, 1197–1201
- Szabó A, Kotormán M, Laczkó I, Simon LM (2006) Spectroscopic studies of stability of papain in aqueous organic solvents, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **41**, 43–48
- Szabó A, Kotormán M, Laczkó I, Simon LM (2009) Improved stability, catalytic activity of chemically modified papain in aqueous organic solvents, *Process Biochem.*, **44**, 199–204
- Szabó A, Kotormán M, Laczkó I, Simon LM (2009) Influence of carbohydrates on stability of papain in aqueous tetrahydrofuran mixture, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **84**, 133–138
- Szalay, L., Damjanovich, S. (1983) *Lumineszcencia a biológiában és az orvostudományban*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 146–190; 269–317
- Tams JW, Welinder KG (1996) Unfolding and refolding of *Coprinus cinereus* at high pH, in urea, and at high temperature, effect of organic and ionic additives on these processes, *Biochemistry*, **35**, 7573–7579
- Tanaka T, Matsuzawa H, Ohta T (1999) Substrate specificity of aqualysin I altered by an organic solvent, DMSO, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 446–448
- Taylor M, Baker K, Briggs G, Connerton I, Cummings N, Pratt K, Revell D, Freedman R, Goodenough P (1995) Recombinant pro-regions from papain and papaya proteinase IV are selective high affinity inhibitors of the mature papaya enzymes, *Protein Eng.*, **8**, 59–62
- Thakurta PG, Biswas A, Chakrabarti C, Sundd M, Jagannadham MV, Dattagupta JK (2004) Structural basis of the unusual stability and substrate specificity of ervatamin C, a plant cysteine protease from *Ervatamia coronaria*, *Biochemistry*, **43**, 1532–1540
- Tiwari A, Bhat R (2006) Stabilization of yeast hexokinase A by polyol osmolytes: Correlation with the physicochemical properties of aqueous solutions, *Biophys. Chem.*, **124**, 90–99
- Ulrich P, Cerami A (2001) Protein glycation, diabetes, and aging, *Recent Prog. Horm. Res.*, **56**, 1–21

- Vinogradov AA, Kudryashova EV, Grinberg VY, Grinberg NV, Burova TV, Levashov AV (2001) The chemical modification of  $\alpha$ -chymotrypsin with both hydrophobic and hydrophilic compounds stabilizes the enzyme against denaturation in water–organic media, *Prot. Eng.*, **14**, 683–689
- Vivian JT, Callis PR (2001) Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins, *Biophys. J.*, **80**, 2093–2109
- Walsh G (2002) *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*, John Wiley, Chichester, pp 369–433
- Wang A, Bolen DW (1997) A Naturally Occurring Protective System in Urea-Rich Cells: Mechanism of Osmolyte Protection of Proteins against Urea Denaturation, *Biochemistry*, **36**, 9101–9108
- Wang P, Sergeeva MV, Lim L, Dordick JS (1997) Biocatalytic plastics as active and stable materials for biotransformations, *Nature Biotechnol.*, **15**, 789–793
- Watkins NG, Thorpe SR, Baynes JW (1985) Glycation of amino groups in protein, *J. Biol. Chem.*, **260**, 10629–10636
- Wiederanders B (2003) Structure–function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides, *Acta Biochim. Pol.*, **50**, 691–713
- Xia Y, Park YD, Mu H, Zhou HM, Wang XY, Meng FG (2007) The protective effects of osmolytes on arginine kinase unfolding and aggregation, *Int. J. Biol. Macromol.*, **40**, 437–443
- Xie XL, Chen QX (2004) Inactivation kinetics of  $\beta$ -*N*-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*) in dioxane solution, *Biochemistry (Moscow)*, **69**, 1365–1371
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems, *Science*, **217**, 1214–1222
- Yang L, Dordick JS, Garde S (2004) Hydration of enzyme in nonaqueous media is consistent with solvent dependence of its activity, *Biophys. J.*, **87**, 812–821
- Yim HS, Kang SO, Hah YC, Chock PB, Yim MB (1995) Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. A model study of protein-cross-linked free radicals, *J. Biol. Chem.*, **270**, 28228–28233
- Zimmerman M, Ashe B, Yurewicz EC, Patel G (1977) Sensitive assay for trypsin, elastase, and chymotrypsin using new fluorogenic substrates, *Anal. Biochem.*, **78**, 47–51

## 9. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACN	acetonitril
AGE	(Advanced Glycation Endproduct) előrehaladott glikációs végtermék
ANS	8-anililnaftalin-1-szulfonsav
$a_w$	vízaktivitás
BAEE	$N_\alpha$ -benzoil-L-arginil-etilészter
CD	cirkuláris dikroizmus
DMF	dimetil-formamid
DMSO	dimetil-szulfoxid
FT-IR	Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia
$\log P$	megoszlási hányados logaritmus
<i>N</i> -ac-L-Trp	<i>N</i> -acetyl-L-tryptophan
Nle	norleucin
NMR	mágneses magrezonancia
PEG	polietilén-glikol
RAGE	(Receptor for Advanced Glycation Endproduct) előrehaladott glikációs végtermék receptor
TCA	triklórecetsav
Tf%	térfogatszázalék
THF	tetrahidrofurán
TNBS	2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav
TNS	2-p-toluidinilnaftalin-6-szulfonsav
VCD	vibrációs cirkuláris dikroizmus
Z-Arg-AMC	$N_\alpha$ -benzoil-L-arginil-7-amido-4-metil-kumarin

## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Lehoczkiné Dr. Simon Mária habil. egyetemi docensnek a munkám irányításáért, és a dolgozat megírásában nyújtott támogatásáért, valamint az eredmények értékelésében nyújtott segítségéért. Köszönöm Dr. Kotormán Márta egyetemi adjunktusnak és Brulichné Balázs Ágnes laboratóriumi asszisztensnek a kísérleti mérések során adott segítségét. Külön köszönet illeti Dr. Lehoczki Endre egyetemi tanárt a fluoreszcencia-mérések során nyújtott szakmai tanácsaiért, és Dr. Laczkó Ilonát az SZBK Biofizikai Intézetének tudományos tanácsadóját a CD-spektroszkópai kísérletek végzésében, értékelésében nyújtott segítségéért. Köszönöm Dr. Boros Imre tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette számomra, hogy a tanszéken dolgozhassak, és támogatta munkám sikeres elvégzését. Továbbá köszönöm Postáné Pető Györgyinek a dolgozat gondos, alapos nyelvi ellenőrzését.