

RÖGZITETT HEXOKINÁZ
ELŐÁLLITÁSA, JELLEMZÉSE ÉS ALKALMAZÁSA

EGYETEMI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

NAGY MÁRIA

1 9 8 6 .



B 2638

T A R T A L O M :

I.	RÖVIDÍTÉSEK	1. oldal
II.	BEVEZETÉS	2. "
III.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3. "
	1. A hexokináz előfordulása	3. "
	2. A hexokináz izoenzimeit	4. "
	3. A hexokináz szerkezete	6. "
	4. A hexokináz aktiv centrumának feltételezett szerkezete	11. "
	5. A hexokináz által katalizált reakció mechanizmusa	12. "
	6. A hexokináz élettani szerepe, lokalizációja	15. "
	7. A hexokináz tisztítása	16. "
	8. A hexokináz gyakorlati alkalmazása	17. "
	9. Enzimek rögzítése	18. "
	10. Rögzített hexokinázok előállítása és tulajdonságaik	24. "
IV.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	27. "
	1. Felhasznált anyagok	27. "
	2. A fehérjetartalom meghatározása	27. "
	3. A hexokináz katalitikus aktivitásának meghatározása	28. "
	4. Rögzített hexokináz előállítása	35. "
	5. A rögzített hexokináz aktivitásának meghatározása	38. "

6.	D-glükóz, illetve D-glükóz-6-foszfát meghatározása videodenzitometrián	39.	oldal
V.	KISÉRLETI EREDMÉNYEK	40.	"
1.	A hexokináz tisztítása	40.	"
2.	A hexokináz rögzítési-kísérletek eredménye	46.	"
3.	Az oldott és az Akrilex C-100 gélhez rögzített hexokináz katalitikus tulajdonságainak és stabilitásának összehasonlítása	47.	"
4.	A rögzített hexokináz gyakorlati alkalmazásának modellezése	51.	"
VI.	MEGVITATÁS	54.	"
VII.	ÖSSZEFOGLALÁS	60.	"
VIII.	ÁBRÁK, TÁBLÁZATOK	62.	"
IX.	IRODALOM	88.	"

I. RÖVIDÍTÉSEK

ADP	- adenzin-difoszfát
AMP	- adenzin-monofoszfát
ATP	- adenzin-trifoszfát
dATP	- dezoxi-adenzin-trifoszfát
CM	- karboxi-metil
CMC	- 1-ciklohexil-3/2-morfolino-etil/-karbodiimid- -p-toluol-szulfonát
CTP	- citidin-trifoszfát
DEAE	- dietil-amino-etil
DTNB	- 5,5'-ditio-bis/2-nitro-benzoészav/
EDC	- N/3-dimetilaminopropil/-N'-etil-karbodiimid-hid- roklorid
EDTA	- etilén-diamin-tetraacetát
GTP	- guanozin-trifoszfát
G6PDH	- D-glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
HK	- hexokináz
ITP	- inozin-trifoszfát
MET	- β -merkaptó-etanol
NADP ⁺	- nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
-P-	- foszfát
PMSF	- fenilmetilszulfonil-fluorid
SDS	- sodium-dodecil-sulfat
TEA	- trietanol-amin
TRIS	- tris-hidroximetil-amino-metán
UTP	- uridin-trifoszfát

II. BEVEZETÉS

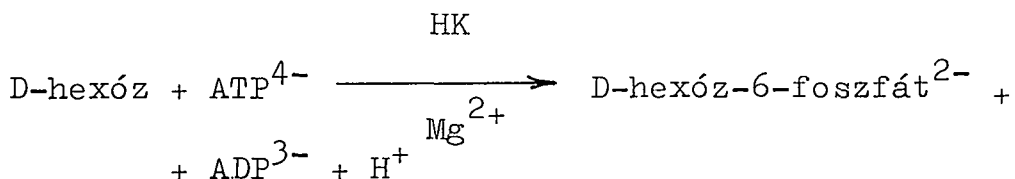
A biotechnológia egyre gyakrabban alkalmaz szilárd fázisu biokatalizátorként rögzített enzimeket, illetve rögzített sejteket. A szilárd fázisu biokatalizátorok többször felhasználhatók, mivel egyszerű fizikai módszerekkel elkülöníthetők a reakcióelegyből, így ezek a folyamatok és analitikai vizsgálati módszerek gazdaságosabbá tehetők.

A hexokinázt /EC.2.7.1.1./, mely minden élő sejtben előfordul, elsőként Meyerhof izolálta 1927-ben /33/. Mivel a hexokináz széles szubsztrátspecifitásu enzim - általában hexózokat foszforilál - ezért a napjainkban kibontakozó biokémiai iparon belül a finomvegyszer-gyártás fontos katalizátora lehet.

Munkánk célja a hexokináz enzim rögzítése, a rögzített és az oldott enzim sajátosságainak összehasonlítása, illetve a rögzített enzim gyakorlati alkalmazhatóságának vizsgálata volt.

III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A hexokináz /ATP-D-hexóz-6-foszfotranszferáz,
EC.2.7.1.1./ a következő reakciót katalizálja:



A hexokináz széles szubsztrátspecifitású enzim /3/ -
-D-glükóz, D-fruktóz, D-galaktóz, D-mannóz, D-glükózamin,
2-dezoxiglükóz átalakítására egyaránt képes. A foszfát do-
nor az ATP helyett dATP, ITP, UTP, CTP és GTP is lehet. A
biokatalizátor működéséhez Mg^{2+} vagy Mn^{2+} -ion szükséges.

1. A hexokináz előfordulása

Minden élőlényben fellelhető ez az enzim. Kimutatták
emlős agyban, lépben, szivben, bélben. A legrészletesebben
vizsgált az élesztőtőből és az emlősökből izolált hexokináz
/5/. Az élesztő-hexokinázhoz meglepően hasonló tulajdonsá-
gokkal rendelkező transzferázt találtak *Aspergillus oryzae*-
ban /41/ és buzacsirában /32/. A bakteriális hexokinázok
széles szubsztrátspecifitásúak és nagy az affinitásuk kü-
lönleges szénhidrátokhoz /50/. Érdekes, hogy az *Entamoeba*
histolytica glükokinázának gélelektroforézissel elkülö-
nitett izoenzimek hasonló viselkedésűek, mint az élesztő-
hexokináz izoenzimek /40/.

2. A hexokináz izoenzime

DEAE-cellulóz oszlopkromatográfiával mind az emlős, mind pedig az élesztő-hexokináz izoenzime elkülöníthetők /48/.

A natív enzim pH-gradiens elucióval két, egymást kissé átfedő csucsban eluálható. Ezeket P-I és P-II formának nevezzük /P - a pH gradiensre utal/.

Ha a készítmény proteázokkal, pl. tripszinnel kezelt, úgy az oszlopkromatográfia során a P-I és a P-II csucs nem jelenik meg. A pH-gradiens elució végén azonban új csucs mutatkozik - P-III forma, és só/o - 50 mM NaCl/ gradiens elucióval az ún. S-forma eluálható.

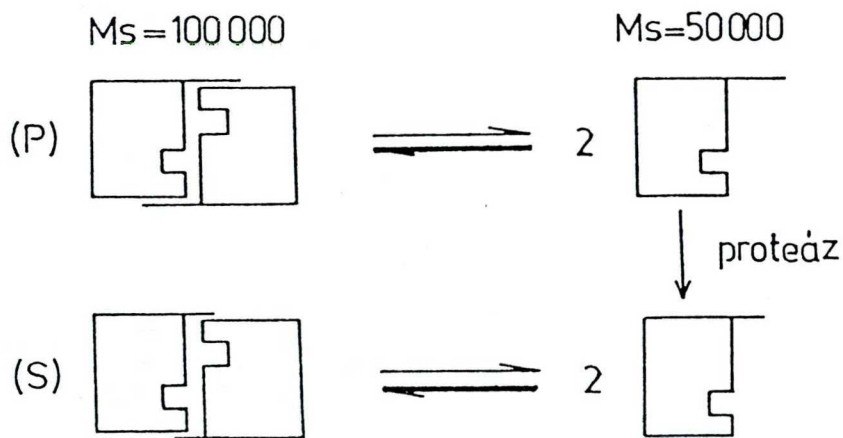
Barnard /28, 42/ élesztőből izolált hexokináz izoenzimeket. A P-formák aminosav-összetételükben, elektroforetikus mobilitásukban, izoelektromos pontjukban különböznek. A P és S-formák kromatográfiás sajátásaikban, összetételükben, elektroforetikus mobilitásukban térnek el, csupán katalitikus aktivitásukban egyeznek.

A glükóz vagy a magas sókoncentráció minimális mennyiségű tripszin jelenlétében elősegíti új kromatográfiás formák - S-I és az S-II kialakulását.

Gazith és munkatársai /19/ megállapították, hogy a P-forma S-formává alakulása - tripszines kezelésre - egy kis molekulatömegű bázikus peptid kihasadásával jár, ami alátámasztja azt a tényt, hogy az S-I és S-II formák savasabb karakterűek /46, 45/.

A hexokináz módosításához a tripszin mellett a nagy ionerősség vagy glükóz szükséges. Ezen ágensek disszociációt előidéző hatása ad magyarázatot szerepükre.

Valószínű, hogy csak a disszociált molekulában férnek a proteázok azokhoz a peptidkötésekhez, melyeket hasítanak; ezután azonban reasszociáció nem következhet be semleges közegben /csak pH = 5,5-nél tud asszociálódni/. A peptidláncok ezen része a natív, dimer szerkezet fenntartásához kell, de nem szükséges az aktivitáshoz, amint azt az 1. ábra szemlélteti.



1. ábra

A hexokináz P formájának átalakulása S formává - proteázok hatására /47/

Az emlős hexokinázok izozimjei elektroforetikus mobilitá-

sukban, glükózra vonatkoztatott K_M /Michaelis-állandó/ értékükben térnek el /1. táblázat/.

Mindegyik emlős-izoenzim /I., II., III./ maximális aktivitásához ATP-t igényel. Széles pH-optimumuak, molekulatömegük azonos.

1. táblázat: Patkány szövetből izolált hexokináz-izozimek glükózszubsztrát esetében mért Michaelis-állandói /47/.

Hexokináz típus:	Szövet:	$K_M/M/$
I.	Máj	$2,5 \times 10^{-5}$
II.	Izom	$2,0 \times 10^{-4}$
III.	Máj	$5,0 \times 10^{-6}$
IV. /glükokináz/	Máj	$1,6 \times 10^{-2}$

3. A hexokináz szerkezete

3.1. A hexokináz aminosav-összetétele

A P-I és P-II izoenzimek C-terminálisa alanin, míg N-terminálisa valin /5/. Az arginin, metionin, tirozin, triptofán és cisztein mennyisége azonos a két formában.

Az alegységenként kimutatott 4 szulfhidril-csoport az enzimaktivitásban játszik szerepet. A marhaagyból izolált hexokinázban 12 szulfhidril-csoport van.

Ha az S-I és S-II formák aminosavösszetételét a P-I és

P-II formákhoz hasonlítjuk, az eltérések hasonlóak, pl.: nagyobb hisztidin tartalom és nagyobb leucin: izoleucin arány mutatható ki az S-I és P-I alaknál, mint az S-II és P-II-ben.

Feltűnő a különbség a P-I /S-I/ és P-II /S-II/ közti prolin, valin, fenilalanin tartalomban /19/. A dimer hexokináz teljes aminosav-szekvenciáját még nem határozták meg.

Anderson és munkatársai /2/ 1978-ban; Shoham és Steitz /51/ 1980-ban az elektrondenzitás-térképek alapján próbálták a szubsztrátkötőhelyek aminosavait meghatározni.

Shoham és Steitz /51/ elektronsűrűség-térképek segítségével megállapították a hexokináz aktív helyeit - a hidrogénkötések révén.

Gray és munkatársai /22/ 1983-ban elvégezték a hexokináz aminosav analízisét - kémiaiilag és röntgendiffrakció segítségével.

A 2. táblázatban a szubsztrátkötőhelyek előre meghatározott, feltételezett aminosavait /2, 51/ és a kémiaiilag azonosítottakat /22/ tüntettük fel.

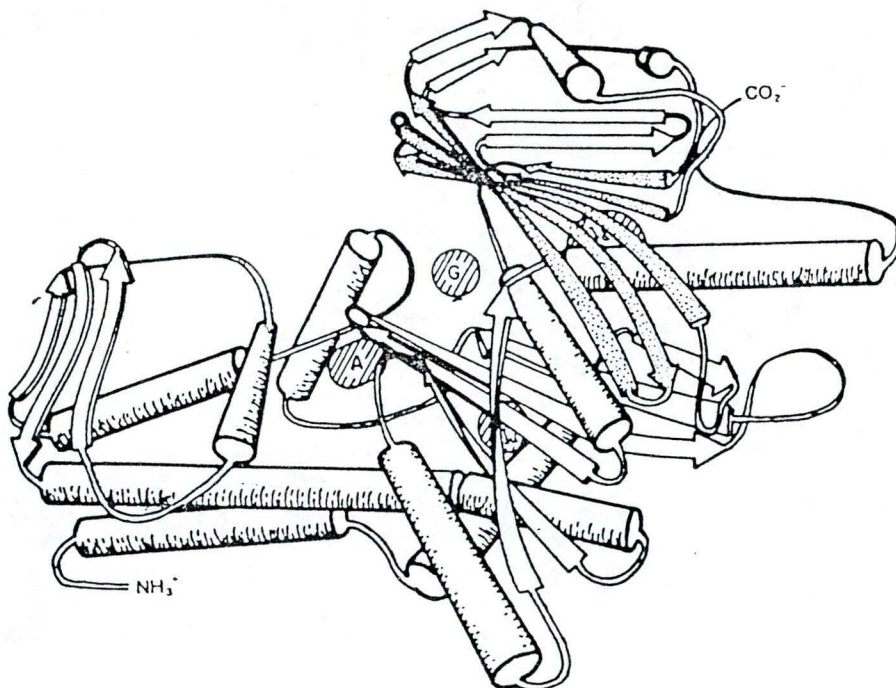
2. táblázat: A szubsztrátkötőhelyek meghatározása /az elektronsűrűség-térkép alapján/ és kémiai azonosításuk

A szubsztrátnak a kölcsönhatásban részvevő csoportja:	A kapcsolódási helye:	Elektrondenzitás alapján feltételezett csoport:	Azonosított csoport:
glükóz 3OH és			
4-OH	188	Asn	Asp-188
3-OH	245	Asn	Glu-245
4-OH	215	Asn	Asn-215
4-OH és			
6-OH	189	Asp	Asp-189
Az ATP β és γ			
foszfátjai	212 ^x	Ser	Thr-212
	393	Ser	nem azonosított

^xa kötés a váznitrogénnel /nem az oldallánccal/ van

3.2. A hexokináz térszerkezete

Fletterick és munkatársai /16/ 27 nm felbontású elektronsűrűség-térképet készítettek az élesztő hexokinázmonomer kristályos formájáról. A monomert nyújtott alaknak irták le, melyet egy központi mély hasadék két lebenyre oszt /2. ábra/.



2. ábra

Az élesztő hexokináz monomer polipeptidláncának sematikus modellje

A helikális régiókat a csövek, míg a β -redőzött struktúrát a nyilak jelzik. A pontozott nyilak a " β -redők" alkotta hengert mutatják. /Kötéshelyek jelölését lásd a szövegben./

Az egyik lebenyben tulnyomó a helikális struktúra, míg a másik a helikális régiók mellett β -struktúrát tartalmaz és a β -redőzött szerkezetek egyike egy hengerszerű formát hoz létre.

A polipeptid 40 %-át α -hélix, míg 30 %-át β -redőzött konformációjának találták.

3.3. A hexokináz negyedleges szerkezete

Nem denaturáló oldószerek /pl.: hig savak/ jelenlétében végzett molekulatömeg-meghatározások szerint az izozimek 100 000 daltonos molekulatömegűek. A proteázos módosítás olyan peptidrészek elvesztését jelenti, melyek a dimer szerkezet fenntartásában esszenciálisak. A pH növelése, magas ionerősség, glükóz vagy foszfát-ionok elősegítik a dimer enzim disszociációját - 50 000 dalton molekulatömegű alegységekre /5/.

A pufferek összetétele jelentősen befolyásolja a disszociációt, pl.: TRIS-pufferben - függetlenül a pH-tól - nincs disszociáció, foszfát puffer pH = 9.0 körül elősegíti a disszociációt.

Denaturáló oldószerek /pl.: urea, guanidin-hidroklorid/ felhasználásával 50 000 dalton molekulatömeget határoztak meg valamennyi formára /SDSgégelektroforézis, egyensúlyi centrifugálás 6 M guanidin-hidrokloridban, vagy 9 M ureában/. Ez támasztja alá a két alegységből álló szerkezetet /14/.

Korábban a hexokinázt tetramer szerkezetűnek tételezték fel, amelynek egy-egy alegysége 25 000 dalton molekulatömegű. A kisebb molekulatömegű alegységekhez a proteáze - mésztés miatt jutottak.

Szivből, patkány agyából vagy májából izolált hexokináz - SDS gélelektroforézis, az ülepedési sebesség vizsgálati

eredménye, a denaturáló ágensek jelenlétében végzett egyéb molekulatömeg-meghatározási módszerek alapján - egy alegységből álló - 100 000 dalton molekulatömegű /5/.

Lehet, hogy az emlős vázizomból izolált hexokináz is két alegységből áll, csak ezeket a szokásos módszerekkel nem lehet elkülöníteni egymástól.

4. A hexokináz aktiv centrumának feltételezett szerkezete

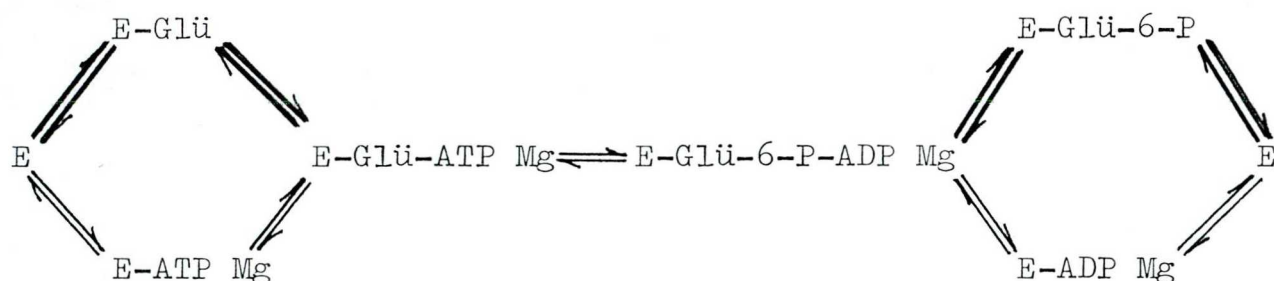
Fletterick kísérleti eredményei alapján /16/ a glükóz a hexokináz két lebenye közti mély hasadékba köt /2. ábra-G/. A szubsztrát bekötése egy kiterjedt szerkezetbeli változást indukál. Az aminosav-szekvencia ismeretének hiányában azonban nehéz a szerkezeti változásokat részletesen bemutatni. Nukleotidok megkötésére a monomerben potenciálisan két régió várható /lásd 2. ábra - I_u és I_d -nek nevezett régió/. Még nem sikerült egyértelműen kötést létesíteni a kristályos állapotú hexokináz e két helyén. Lehet, hogy ez a rész egy alegységasszociációt "igényel" és/vagy olyan terciér szerkezeti változásokat, melyek hatásosak a nukleotid kötésben, vagy a kristály úgy tömörül, hogy ezek a területek hozzáférhetetlenek a nukleotidok számára. A tapasztalat szerint AMP vagy ADP más helyhez kötődik /2. ábra - A-val jelölt rész/ egy kis "zseb"-ben. Feltételezhetjük, hogy az ATP AMP-ként kötődik - így az ATP-molekula γ - foszfátja mintegy 100 nm-nyire lehet a glükóz 6. hidroxil-csoportjától.

Ez az AMP kötési hely nem azonos a dimerben megfigyelt nukleotid kötőhelyekkel. Feltételezhető, hogy ezen utóbbi helyek egyike az aktiv, míg a másik nukleotidkötőhely valószínűleg az enzim allosztérikus szabályozásában játszik szerepet.

5. A hexokináz által katalizált reakció mechanizmusa

Az ATP-D-hexóz-6-foszfotranszferáz foszfáttranszfere egy enzim-terner komplex kialakulásával indul, mivel az enzimnek két szubsztrátja van.

A reakció menetét a következő séma mutatja /5/:



ahol E az enzimet, Glü a glükózt jelenti.

Britton és Clark kísérletei /6/ a vastagabb nyíllal jelezte a reakcióutat támasztják alá, de nincs egységes álláspont az irodalomban. A kérdés eldöntését nehezíti, hogy nem lehet a reakciót két lépésre bontani.

Az élesztő hexokináznak van hidrolitikus aktivitása is, bár ez elhanyagolható a foszforiláló aktivitáshoz képest. A két folyamat aránya:

ATP hidrolízis	0.02 $\mu\text{M}/\text{perc}/\text{mg}$	$K_M/\text{glükózra}/ 4 \text{ mM}$
Glükóz-foszforilálás	800 $\mu\text{M}/\text{perc}/\text{mg}$	$K_M/\text{glükózra}/ 0.1 \text{ mM}$

De la Fuente és Sols /17/ kísérletei azt mutatják, hogy bizonyos pentózok fokozzák az enzim hidrolitikus aktivitását, ugyanakkor ezek a szénhidrátok nem kompetitív inhibitorai a glükóz foszforilálásának. Kötődésük a hexokinázhoz a feltevések szerint magába foglal egy "induced fit" kölcsönhatást. Az enzim konformációja a folyamat során módosul, ez okozza az ATP-kötő képességnek és a hidrolitikus aktivitásnak a megváltozását is.

5.1. Szulfhidril-csoportok szerepe

Az élesztő hexokinázban alegységenként négy szulfhidril-csoportot mutattak ki a P-I formában, míg a P-II-ben hármat /4/.

Kaji /23/, illetve Lazarus /27/ bizonyították, hogyha az enzim szulfhidril-csoportjainak felét /4, illetve 3 szulfhidril-csoportot/ metil-merkurival vagy p-klór-merkuribenzoáttal titráljuk, nincs aktivitásvesztés. Továbbtitrálva az aktivitás teljesen megszűnik.

Anderson és munkatársai /2/ úgy vélték, hogy a 243-as pozícióban cisztein-nek kell lennie, melynek oldallánca hidrogén-kötéseket alkot három aktív centrumbeli aminosavval /188., 215., 245./. Valójában - a kémiai analízis eredménye alapján /22/ - ez a csoport az aszparagin oldallánca, amely jobban alkalmas a hidrogén-kötések létesítésére. A 244. helyen viszont ciszteint mutattak ki. Valószínű, hogy a szulfhidril-reagensek ezen aktív centrum környékén lévő

cisztein oldalláncokkal reagálnak.

A β -merkaptoetanolt korábban /19, 24/ az aktivitás visszaállításában használták, pl.: luggal inaktivált enzim esetében - pH = 7.0-en, mert valószínűleg megakadályozza a fehérje szulfhidril-csoportjainak oxidációját.

Ha a β -merkaptoetanolt pH = 9.0-nél adtak hexokináz P-I formájához, akkor az ülepedési állandó csökkenését észlelték, mely disszociációra utal, illetve a merkaptoetanol az enzim teljes inaktiválódását okozhatja.

A merkaptoetanol hatását nehéz értelmezni, hiszen pH 8-9-en, mint denaturáló ágens játszik szerepet, míg pH = 7.0-nél épp az enzimaktivitás visszanyerésére használatos. Ha a merkaptoetanol által inaktivált hexokináz-formákat a tiol-felesleg eltávolítása után DTNB-vel /5,5'-ditiobis/2-nitro-benzoesav/ titrálták - pH = 8.6-on, akkor azt tapasztalták, hogy a P-I forma mintegy "eltemetett" egy szulfhidril-csoportot.

A fentiek alapján a tiolok inaktiváló hatását azzal próbálják értelmezni, hogy képesek kiszorítani a peptidlánc szulfhidril-csoportját a közeli lánchoz való kötéséből - amint azt az alábbi séma szemlélteti /19/:



A marhaagyból izolált hexokináz 12 szulfhidril-csoportot

tartalmaz /39/, melyek DTNB-vel titrálhatók. A reagens gyors inaktiválódást okoz egy-két viszonylag reaktív csoporttal való reakció révén. Ezt az inaktivációt glükóz-6-foszfát teljesen, glükóz részlegesen szünteti meg. A glükóz-6-foszfát hatása meglepő, valószínűleg konformációváltozáson alapszik. Élesztő hexokinázban a glükóz hasonlóan véd az inaktiválódás ellen.

6. A hexokináz élettani szerepe, lokalizációja

A glikolizis enzimeinek hiánya vagy csökkent aktivitása ritka. Öröklésmenetük autoszomális, recesszív. A vörösvértestekben a hexokináz hiánya vagy nem kielégítő működése zavarokat okozhat /15/, mivel a glikolizis az oxigén - transzportot befolyásolja. A glikolizis és az oxigéntranszport között a 2,3-difoszfo-glicerát teremt kapcsolatot, mely a hemoglobin oxigénaffinitását szabályozza /a 2,3-difoszfo-glicerát növekvő mennyisége csökkenti a hemoglobin oxigénaffinitását/.

A patkányagyból előállított hexokináz összetett fehérje - lipoproteid, amely lehet, hogy a membrán foszfolipidjeivel kapcsolódik. Kimutatták /12, 55/, hogy a mitokondrium külső membránjához kötődik és a kapcsolat D-glükóz-6-foszfáttal szüntethető meg. Az ellentett folyamat, vagyis tisztított hexokináznak a mitokondriumokhoz történő kapcsolása még nem sikerült. Oka, hogy kapcsoló faktorát elveszti a tisztítás során, mely kapcsoló valószínűleg a

lipid rész.

7. A hexokináz tisztítása

A hexokinázt leggyakrabban sajtolt sütőélesztőből izolálják. Darrow és Colowick /13/ a szárított élesztőt Na_2HPO_4 -oldatban tárják fel. /333 g élesztő/1 dm³ 0,2 M Na_2HPO_4 -oldat/. A 37 °C-os, 3 órán át tartó autolizis után a keveréket centrifugálják /1 óra 0 °C, 4000 g/, majd a felüluszt pH-frakcionálással kezelik és két lépésben ammóniumszulfáttal kisózzák. A centrifugálással összegyűjtött csapadékot jéghideg desztillált vízben oldják, dializálják. Bentonit adszorpcióval történik a további tisztítás.

Schulze és munkatársai /48/ módosításokat közölnek az előző eljáráshoz. Az autolizist követően a felülusztóhoz 2×10^{-3} M végkoncentrációban PMSF-t adnak - az élesztő proteázok gátlására.

A dializisig megegyezik a két eljárás, a bentonitos lépést nehézkessége miatt, DEAE-cellulóz ioncserélő kromatográfiával váltják fel. Együttal a hexokináz izoenzimeit is elkülönítik.

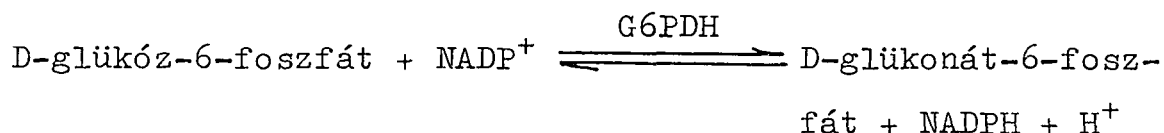
Scopes /49/ a glikolitikus enzimek élesztőből történő preparálására ammóniás feltárást javasol, mint általános módszert. 450 g szárított élesztőt 1 dm³ lg EDTA-t tartalmazó ammónia oldattal tár fel. 800 cm³ 0,5 M tejsavval állítja le 24 óra után a feltárást. Ekkor a keverék pH-ját $7,0 \pm 0,5$ -

re állítja és centrifugálja azt 0°C , 1 óra 4000 g/.

McDonald /31/ a friss élesztőt toluollal tárja fel /12,5 kg élesztő/6 dm³ toluol/. A szuszpenziót 45°C -os vízfürdőbe helyezi. Ha az élesztő megolvadt, szobahőmérsékleten 2-3 órai állás után, 10°C -ra hűtve 12 dm³ hideg desztillált vízzel higitja és 18 órai $0-5^{\circ}\text{C}$ -os állás után - a szuszpenzió minden dm³-éhez 100 g Myflo Super Cel-t adva - szűri. A feltárást ammónium-szulfátos frakcionálás követi, végül etanolos frakcionálással tisztítja az enzimet.

8. A hexokináz gyakorlati alkalmazása

In vitro a klinikai kémia alkalmazza. A glükóz meghatározás /vérből, vizeletből/ egyik elterjedt módszere az a - lábbi reakciókon alapszik /35/.



A magasabbrendű szervezetek energiagazdálkodásában szerepet játszó kreatin kináz aktivitásának meghatározására is hexokinázt használnak.

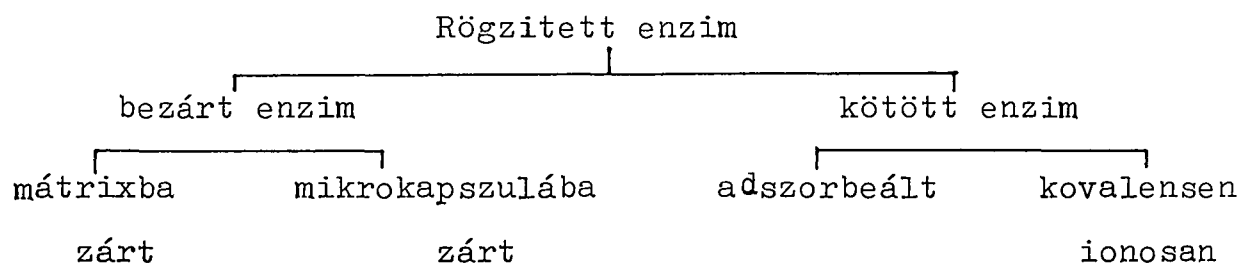
A tisztított hexokináz alkalmas lehet D-hexóz-6-foszfátok enzimatisz előállítására.

Rögzített hexokinázzal a fenti alkalmazások gazdaságosabbá tehetők, illetve a felhasználási terület szélesíthető.

Rögzített glikolitikus enzimek sorba kapcsolásával a glikolizis közti termékeinek előállítása is megvalósítható.

9. Enzimek rögzítése

A rögzítéssel szilárd fázisba vitt enzimek katalitikus aktivitásukat megőrzik és folyamatosan működtethetők. A rögzített biokatalizátorokat az alábbiak szerint osztályozzák /10/.



A rögzítési módszerek a következők:

1. hordozóhoz kötés/carrier-binding/ módszere: vizoldhatatlan hordozóhoz kötjük az enzimet fizikai adszorpcióval, ionos vagy kovalens kötéssel,
2. kereszt-kötés /cross-linking/ módszere: intermolekuláris keresztkötéseket alakítunk ki az enzim molekulák között bi- vagy multifunkciós reagensekkel.

3. bezárás módszere: az enzimeket szemipermeábilis polimer membránnal vesszük körül vagy szemipermeábilis gélrácsba zárjuk.

9.1. Enzimek rögzítése adszorpcióval

Az enzimek adszorpcióval történő rögzítése a legkorábban alkalmazott módszer, ui. az enzim rögzítése a vízben nem oldódó szilárd hordozóhoz viszonylag egyszerű. Az adszorpció függ a pH-tól, a hőmérséklettől, a közeg ionerősségétől, az enzim és az adszorbens koncentrációjától. Adszorbensként különböző fémek, kalcium-karbonát, aktiv szén, cellulóz, kollagén és üveg alkalmazhatók, melyek nagy affinitással kötik az enzimet /56/.

A módszer hátránya, hogy az ionerősség, a pH és a hőmérséklet változása a kötött enzim deszorpcióját eredményezheti. Egyes rögzített enzimeknél, pl.: a kaolinithez adszorbeált ureáznál vagy a nitrocellulózhoz adszorbeált laktát dehidrogenáznál irreverzibilis az adszorpció /53, 54/, mely a folyamatos működtetésnek kedvez.

9.2. Enzimek rögzítése kémiai kötésekkel

A kémiai módon rögzített enzimek ionosan és kovalensen kötődhetnek a szilárd hordozóhoz. Ekkor ionos komplexek, illetve intramolekuláris kovalens kötések, valamint a polimer hordozóhoz való kovalens kötés kialakítása a cél.

A kovalens kötéshez viszonylag bonyolult reakciófeltételek kellenek és némely esetben megváltozik a biokatalizátor

térbeli szerkezete, esetleg károsodik az aktiv centruma, ami aktivitás veszteséget, illetve szubsztrátspecifitás változást okozhat. Nagy előnye a módszernek, hogy magas ionerősségű sóoldat és/vagy szubsztrát jelenlétében sem következik be enzimvesztesség; az erős kötés miatt.

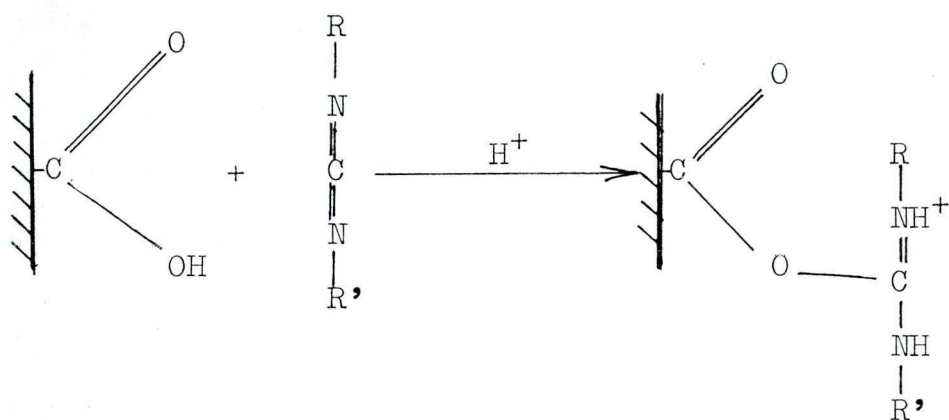
Intramolekuláris kovalens keresztkötéseket bi- vagy multifunkciós reagensekkel az enzim molekulák azon oldal-láncai között alakítunk ki, melyek nem játszanak szerepet a katalitikus aktivitásban. Ilyen reagensek pl.: az N,N'-etilén-bisz-maleimid, az izocianát származékok, melyek peptidkötések; a glutáraldehid, mely Schiff-bázis; a bisz-diazo-benzidin, mely diazo-kötés kialakítására alkalmas. Ezen reagensekkel intermolekuláris keresztkötéseket is létrehozhatunk, mellyel nemcsak a kovalensen kötött, hanem az adszorbeált vagy a bezárt enzimet is irreverzibilisen rögzíthetjük. Valószínű, hogy az enzimen kedvezőtlen térszerkezeti és kémiai változásokat eredményez a keresztkötés, amiért nem túl gyakran alkalmazott ez a módszer.

Legtöbbször polimer hordozóhoz kovalens kötéssel rögzítik a biokatalizátorokat. Olyan vízben nem oldódó szilárd hordozót kell választanunk a rögzítéshez, mely nem reagál az enzim aktiv centrumbeli aminosavainak oldalláncaival.

Számos kovalens kötési eljárás ismert. Ezekből csak az általunk alkalmazottakat részletezzük.

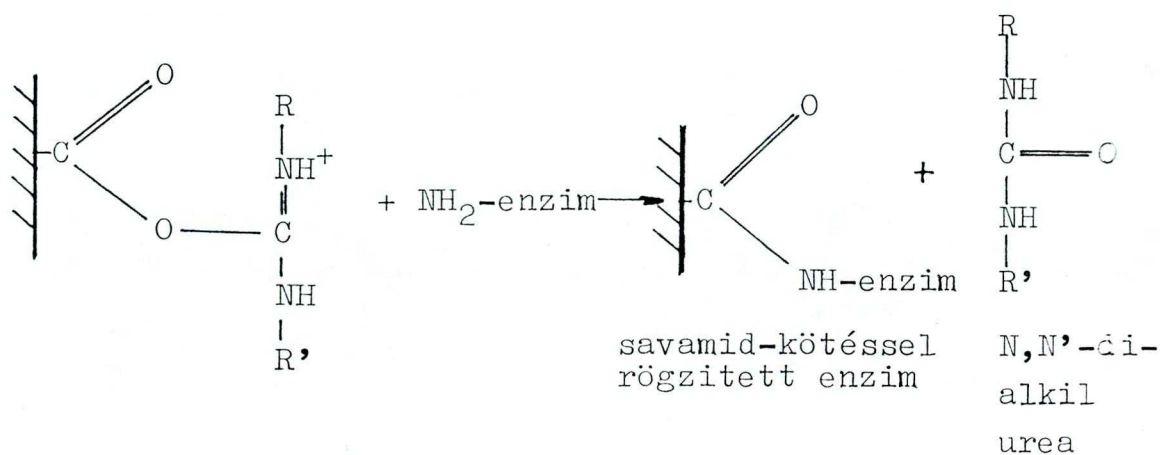
9.2.1. Enzimek rögzítése aktivált karboxil-csoportot tartalmazó gélre

A szabad karboxil-csoportokat tartalmazó gél karbo-
diimiddel aktiváljuk, melynek során O-acil-izourea szárma-
zékhoz jutunk. Az aktivált gél az enzimet N-terminális
L-amino- és a lizin E-amino-csoportjai révén rögzíti,
sav-amid kötéssel, N,N'-dialkil urea képződése közben /26/.
Az aktiválás és a kapcsolás egyenletei a következők:



poli-akrilamid-	vizoldékony kar-	O-acil-izourea szár-
N,N'-metilén-	bodiimid	mazék
bisz-akrilamid-		
akrilsav		

A kapcsolásban az enzim amino-csoportjai vesznek részt:

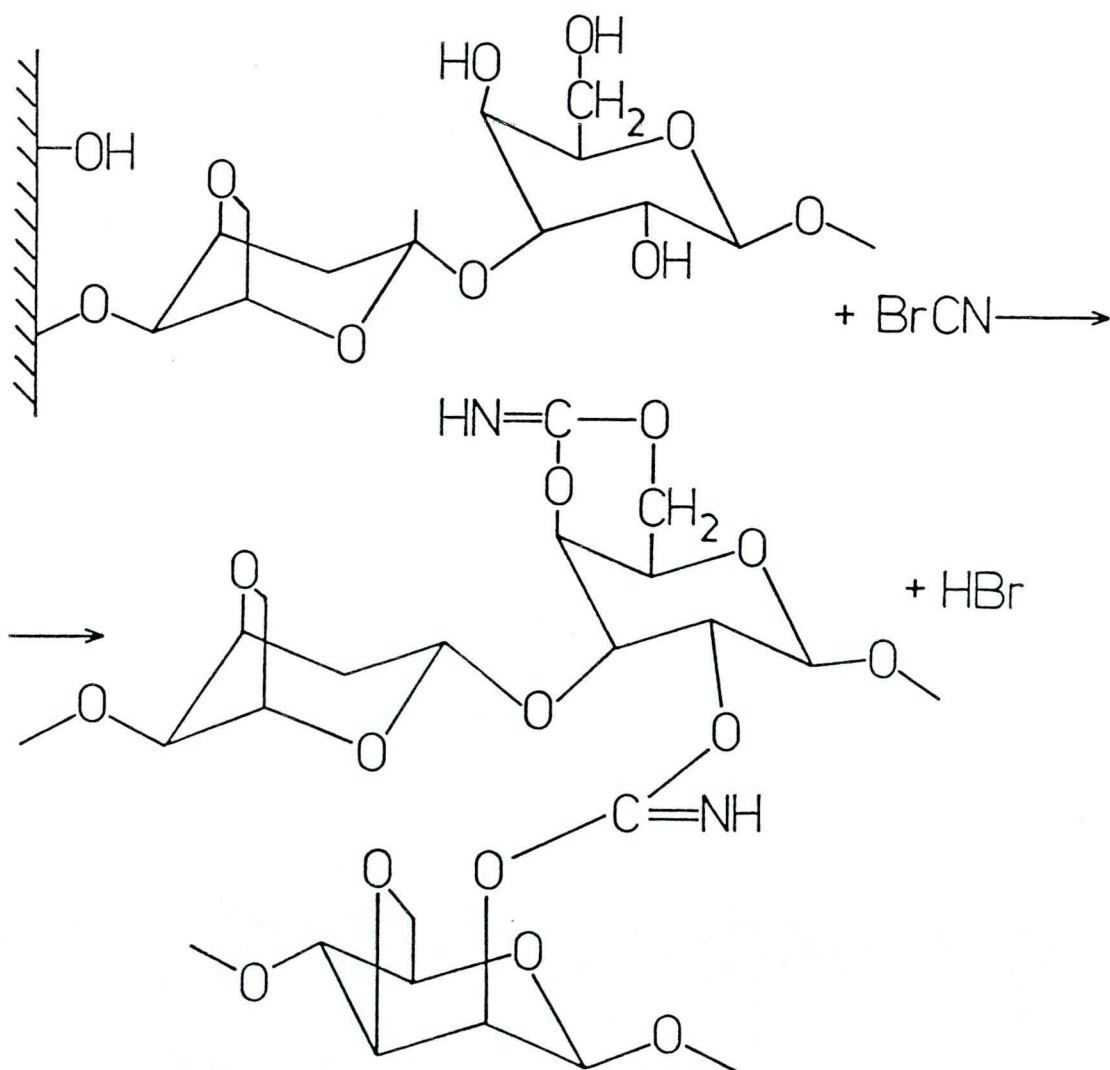


9.2.2. Enzimek rögzítése aktivált hidroxil-csoportot tartalmazó gélre

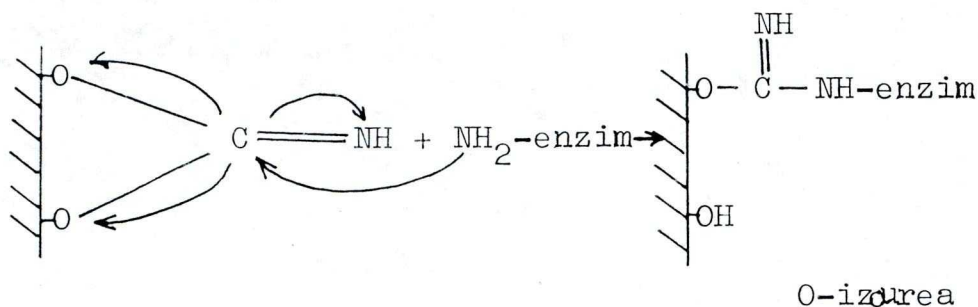
A poliszacharid alapu, pl.: agaróz alapu gélek láncai háromdimenziósak és így a szabad hidroxil-csoportokat a brómcíánnal történő aktiválás aciklusos, illetve ciklusos imidokarbonáttá alakítja /25/. Az aktivált csoportok nukleofil-csoportokkal, pl.: amino-csoporttal reagáltathatók. Az aktiválás és a kapcsolás egyenletei:

3,6-anhidro-L-galaktóz

D-galaktóz



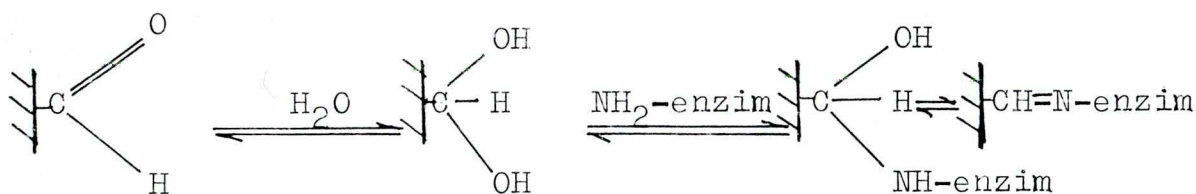
aktivált gél



9.2.3. Enzimek rögzítése aktivált aldehid-csoportot tartalmazó gélre

A szabad aldehid-csoportokat tartalmazó gélhez Schiff-bázis képződésével kapcsolódik az enzim /21/.

A rögzítés egyenletei:



szabad aldehid csoportot tartalmazó gél	geminális diol származék	Schiff-bázis
---	--------------------------	--------------

9.3. Enzimek gélbe zárása

A gélekbe való bezárás módszere azért előnyös, mert kis mennyiségű enzimet igényel és a rögzítés viszonylag egyszerű /10/. A gélképződés során az enzim termikus vagy kémiai hatásra inaktiválódhat. A módszer lényeges hátránya, hogy a rögzített enzimek kis aktivitást mutatnak nagy molekulájú szubsztrátokra, diffúziós gátak miatt.

10. Rögzített hexokinázok előállítása és tulajdonságaik

A hexokinázt különböző módon, többféle hordozóhoz rögzítették, illetve más enzimekkel koimmobilizálták.

Bohnensack és munkatársai /4/ kovalensen rögzítették az élesztő hexokinázt brómciánnal aktivált Sephadex G-200 gélhez. Tanulmányozva a rögzített enzim sajátosságait, nem tapasztaltak lényeges különbséget az aktivitás pH-függésében. A Michaelis állandók értékét glükózra 0,2 mM-nak, ATP-re 0,17 mM-nak találták.

Broun és munkatársai /7/ glutáraldehiddel szérumalbumin jelenlétében keresztkötéseket hoztak létre a hexokináz-molekulák között, és így egy fehérjemembránba rögzítették, majd poliakrilamidba zárták az enzimet. A rögzített és az oldott hexokináz specifikus aktivitásának hányadosaként adták meg a bekötés mértékét, mely 30 %-os volt.

Schmith és Lenhoff /52/ cianur-kloriddal aktivált celofán-membránhoz kapcsoltak - kovalensen - hexokinázt. A rögzített enzim stabilabbnak mutatkozott, mint az oldott.

Pollack és munkatársai /38/ keresztkötött poliakrilamid gélbe kondenzációs kopolimerizációval rögzítették enzimeket, köztük hexokinázt is, amelyre 105 EU/g szárazgél aktivitást értek el. A hexokinázt gyakran alkalmazzák koimmobilizálásra.

Mattiason és Mosbach /37/ brómciánnal aktivált Sepha-

dex G-50 gélhez hexokinázt, glükóz-6-foszfát dehidrogenázt és β -galaktozidázt rögzítettek, így laktózból 6-foszfo-glükonolaktont tudtak előállítani. Az enzimek "random" kötődtek a gélre.

Gestrelus és munkatársai /20/ poliakrilamidba polimerizálták a hexokinázt, glükóz-oxidázzal és tripszinnel együtt. A mikrokörnyezeti hatásokat vizsgálva megállapították, hogy a hexokináz pH optimuma a rögzített enzimnél pH 8,1-ről 8,5-re tolódott /5 mM pufferben/. Ha növelték a glükóz koncentrációját, akkor az optimum értéke pH 9,3-re tolódott, mely valószínűleg a glükóz-oxidáz reakcióban képződő protonoknak tulajdonítható.

Campbell és Chang /9/ szemipermeabilis kolloidum mikrokapszulákba zárta a hexokinázt és a piruvátkinázt, így az ATP és ADP ciklikus regenerálásának a feltételeit tanulmányozhatták.

Coulet és munkatársai /11/ kollagén felhasználásával rögzítették a hexokinázt és a tejsav dehidrogenázt. A kollagén karboxil csoportjait metilálták, majd savaziddá alakítva aktiválták. A rögzítéssel 74 EU/cm² aktivitású hexokinázt állítottak elő.

Morris és munkatársai /34/ nylonhoz kötötték a hexokinázt és a glükóz-6-foszfát dehidrogenázt. A két enzim rögzített formáját glükóz analízisre kívánták felhasználni, azonban a rögzített enzimrendszer fokozatos aktivitásvesz-

tés miatt alkalmatlannak bizonyult erre.

Mosbach /36/ ugyanezeket az enzimeket poliakrilamid-poliakrilsav gyöngypolimerhez kötötte. A karboxilcsoportokat karbodiimiddel aktiválta. A képződő redukált NADP^+ mennyiségének meghatározása alapján megállapította, hogy a koimmobilizált rendszer aktívabb, mint az oldott enzimrendszer.

Brown és munkatársai /8/ a glikolizis első négy enzimét /hexokináz, foszfoglükóz-izomeráz, foszfofruktokináz, aldoláz/ rögzítették poliakrilamid gélbe. A rögzített enzimekből oszlopot készítettek úgy, hogy az egyes biokatalizátorok a konszekutív reakcióknak megfelelően egymás után helyezkedtek el. A rendszerrel glicerin-aldehid-3-foszfátot állítottak elő.

Luca és Kricka /30/ brómcíánnal aktivált Sepharose 4B gélen multienzim rendszereket rögzítettek. Az öt rögzített enzimből álló rendszer segítségével glükóz-1-foszfátból 1,3-difoszfo-glicerátot állítottak elő.

A glikolizis valamennyi enzimét tartalmazó koimmobilizált multienzimrendszerükkel a glükózt etanollá alakították.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Felhasznált anyagok:

Kísérleteinkben felhasznált vegyszerek közül a Folin-reagens és az EDC Merck, Darmstadt, NSZK, a CMC Sigma, St. Louis, USA, az EDC Aldrich, Steinheim, NSZK, a PMSF Serva, Heidelberg, NSZK gyártmány volt. A tisztításhoz használt Sephadex G-200 gél, a rögzítésnél alkalmazott CNBr aktivált Sepharose 4B és a CH Sepharose 4B Pharmacia, Uppsala, Svédország, míg a szilokrom aldehid az NPO Biokimreaktív, Riga, Szovjetunió terméke. A többi anyag a Reanal Finomvegyszergyár /Budapest, Magyarország/ terméke és további tisztítás nélkül került felhasználásra.

2. A fehérjetartalom meghatározása

Az enzimoldatok fehérjetartalmának meghatározását Lowry és munkatársainak módosított módszerével végeztük.
/29, 44/

Az alkalmazott Folin-reagens lugos pH-n kék színreakciót ad fehérjékkel, melyet 750, illetve 650 nm-en fotometráltunk. A fehérjekoncentrációt marha szérumból készített kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg.

A Lowry és munkatársai által leírt /29/ módszerhez szükséges oldatok:

4 %-os Na_2CO_3 - oldat

0,2 M NaOH-oldat

1 %-os CuSO_4 -oldat

2,7 %-os K-Na tartarát-oldat

kétszeresére hígított Folin reagens.

Az un. "C"-reagens az alábbi módon készül:

0,5 cm³ CuSO_4 -oldatot 0,5 cm³ K-Na-tartarát-oldattal elegyítünk, majd a 24,5 cm³ Na_2CO_3 -oldatból és a 24,5 cm³ NaOH-oldatból álló elegyhez adjuk.

A "C" reagens 2 cm³-éhez 0,2 cm³ fehérjeoldatot pipettázunk és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk. Ekkor 0,2 cm³ - közvetlenül mérés előtt hígított - Folin reagenst adunk hozzá és 30 perc múlva 750 nm-en fotometráljuk. A Schacterle-Pollack módszer szerint /44/ alkalikus rézreagenst készítünk, melynek 1 dm³-e 120gNaOH-ot, 100 g Na_2CO_3 -ot /vizmentes/ 1 g K-Na-tartarátot /vizmentes/ és 0,5 g CuSO_4 -ot /vizmentes/ tartalmaz.

1 cm³ mintához 1 cm³ alkalikus rézreagenst adunk, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk az elegyet. Ekkor gyorsan 4 cm³ 18-szorosára hígított Folin-reagenst adunk hozzá és 5 percig 55 °C-os vízfürdőbe helyezzük. Jeges vizes hűtés után 650 nm-en fotometráljuk mintáinkat.

3. A hexokináz katalitikus aktivitásának meghatározása

A hexokináz katalitikus aktivitásának meghatározását

kapcsolt enzimreakció alapján vagy pH indikátorok segítségével végezhetjük spektrofotometriásan vagy titrimetriásan.

3.1. A hexokináz katalitikus aktivitásának enzimreakción alapuló meghatározása

A mérés alapját a II/8. pontban leírt egyenletek képezik /3/. Egy egység /EU/, az az enzimmennyiség, amely percenként 1 μmol hexóz foszforilálását katalizálja standard körülmények között.

SI-rendszerben 1 EU = 16,7 nkatál, mivel 1 katál = 1 $\frac{\text{mol}}{\text{s}}$

A segédenzim - a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz - reakciójában képződő redukált NADP^+ -t 340 nm-es abszorpciója alapján folyamatosan regisztráljuk; a térfogataktivitást az alábbi egyenlettel számítjuk:

$$\text{térfogataktivitás} \left(\frac{\text{EU}}{\text{cm}^3} \right) = \frac{\frac{\Delta E}{\Delta t} \times V_r}{\epsilon \times l \times V_m}$$

ahol V_r - a reakcióelegy térfogata - cm^3 -ben,

V_m - a minta térfogata - cm^3 -ben,

l - a fényut hossza - cm-ben,

ϵ - moláris extinkciós koeficiens, melynek értéke

$$340 \text{ nm-en } 6,22 \frac{\text{cm}^2}{\mu\text{mol}}$$

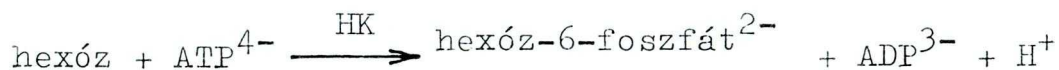
$$\frac{\Delta E}{\Delta t} - 1 \text{ perc alatti extinkcióváltozás}$$

A méréshez használt reakcióelegy összetétele a következő volt /3/:

Komponensei	Térfogata /cm ³ /	Koncentráció a reakció- elegyben /mM/
TEA-puffer /0,1 M pH = 7,6/	1,3	43,3
glükóz /100 mg/cm ³ /	1,2	222,0
MgCl ₂ /0,1 M/	0,2	6,7
ATP /10 mg/cm ³ /	0,1	0,54
NADP ⁺ /10 mg/cm ³ /	0,1	0,38
glükóz-6-foszfát de- hidrogenáz	0,01	3,3 µg/cm ³
/1,4 EU/cm ³ /		
enzimoldat	0,05	

3.2. A hexokináz katalitikus aktivitásának indikátorokkal történő meghatározása

Az indikátorokkal végzett aktivitásméréseknél a



folyamatban képződő protonok az indikátor színének változását eredményezik, illetve a protonok titrálhatók. Az indikátor színváltozása fotometriásan detektálható pH-

indikátorként krezolvöröst /13/ és fenolvöröst /31/ használtunk. Mindkét indikátor esetében spektrofotometrikus módszerrel dolgoztunk.

3.2.1. Krezolvörös indikátorral végzett hexokináz aktivitásmérés

Egy egység, az az enzim mennyiség, amely percenként 1 μ ekvivalens proton keletkezését katalizálja 30 °C-on.

Krezolvörös indikátor használatakor 574 nm-en folyamatosan regisztráltuk az optikai elnyelés csökkenését. Mivel 1 μ mol D-glükóz foszforilációja ugyanakkora extinkcióváltozást okoz, mint 1 μ mol sósav hozzáadása a reakcióelegyhez, ezért standard sósavval kalibráltunk.

A térfogataktivitást az alábbi egyenlettel számítottuk:

$$\text{térfogataktivitás} \left(\frac{\text{EU}}{\text{cm}^3} \right) = \frac{\frac{\Delta E}{\Delta t}}{\Delta E_{\text{st}}} \times \frac{1 \mu\text{mol glükóz}}{V_m}$$

ahol V_m - a minta térfogata - cm^3 -ben

ΔE_{st} - 1 μ mol sósav okozta extinkcióváltozás

$$\Delta E_{\text{st}} = 0,07$$

$\frac{\Delta E}{\Delta t}$ - 1 perc alatti extinkcióváltozás

A konstansok behelyettesítésével, $\Delta E_{\text{st}} = 0,07$ és $V_m = 0,1 \text{ cm}^3$, a fenti egyenlet így egyszerűsödik:

$$\text{térfogataktivitás} \left(\frac{\text{EU}}{\text{cm}^3} \right) = \frac{\Delta E}{\Delta t \times 0,007} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \times 142,86$$

A méréshez használt reakcióelegy /13/ az alábbiak szerint készült: 7 cm³ 1,6 %-os MgCl₂ x 6 H₂O tartalmu 0,006 %-os krezolvörös oldathoz 1,5 cm³ 0,1 M ATP-oldatot pipettáztunk, majd ezt a keveréket 0,1 M NaOH-oldattal semlegesítettük. A biborvörös, semlegesített oldathoz 3 cm³ 0,1 M/pH = 9,0/ glicil-glicin puffert adtunk, majd desztillált vízzel 30 cm³-re egészítettük ki az elegyet. Ezen reakcióelegy 2,5 cm³-éhez 0,4 cm³ 0,2 M glükóz-oldatot mérünk és 0,1 cm³ mintával indítottuk a reakciót. A felhasznált reakcióelegy összetétele a következő volt:

	Térfogata /cm ³ /	Koncentráció a reakció- elegyben /mM/
krezolvörös indiká- tor /0,006 %/		3,05x10 ⁻²
MgCl ₂ x 6 H ₂ O /1,6 %/	0,583	15,32
ATP /0,1 M/	0,125	4,17
glicil-glicin puffer /0,1 M pH = 9,0/	0,25	8,33
glükóz /0,2 M/	0,4	26,7
enzimoldat	0,1	

3.2.2. Fenolvörös indikátorral történő hexokináz aktivitás- mérés

Fenolvörös indikátor alkalmazásakor 550 nm-en fotometráltunk /31/. Egy egység az az enzimnennyiség, amely a

standard reakcióelegyben 10^{-8} ekvivalens proton keletkezését katalizálja percenként 5°C -on $\text{pH} = 7,5$ -en.

A reakcióelegy az alábbiak szerint készült:

5 cm^3 $0,039\text{ M}$ ATP és $0,0065\text{ M}$ $\text{MgCl}_2 \times 6\text{ H}_2\text{O}$ oldathoz

5 cm^3 $0,0025\%$ -os fenolvörös-oldatot mérünk, majd $0,1\text{ M}$ NaOH -oldattal az átmeneti színig titráljuk a keveréket.

Ekkor 5 cm^3 $0,088\text{ M}$ glükóz-oldatot adunk az elegyhez /a glükózt $0,5\text{ M}$ $\text{pH} = 7,5$ Sørensen-foszfát pufferben oldottuk és desztilláltvízzel hígítottuk/. Az így kapott oldatot desztilláltvízzel 20 cm^3 -re egészítjük ki. A követ-tába $2,5\text{ cm}^3$ fenti elegyhez $0,5\text{ cm}^3$ enzimoldatot pipettá-zunk.

A kalibrálást szintén sósavval végeztük. A térfogataktivi-tást a krezolvörös indikátornál leírtak szerint számolhat-juk.

A konstansok: $\Delta E_{\text{st}} = 1,86 \times 10^{-4}$ és $V_m = 0,5\text{ cm}^3$

Tehát a térfogataktivitás $\left(\frac{\text{EU}}{\text{cm}^3} \right) =$

$$= \frac{\Delta E}{\Delta t \times 9,3 \times 10^{-5}} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \times 1,075 \times 10^4$$

/A jelölések azonosak a 3.2.1. pontban használtakkal./

A felhasznált reakcióelegy összetétele:

Reakcióelegy komponensei	Térfogata /cm ³ /	Koncentráció a re- akcióelegyben /mM/
ATP /0,039 M/ +	0,625	8,13
MgCl ₂ x 6 H ₂ O /0,0065 M/		1,35
fenolvörös /0,0025 v%/	0,625	1,46 x 10 ⁻²
glükóz /0,088 M/ +		18,52
Sörensen-foszfát puffer		
/0,06 M pH = 7,5/	0,625	12,5
enzimoldat	0,5	

3.3. A különböző aktivitásmérések összehasonlítása

Az irodalmi adatok összehasonlíthatósága végett szükségünk volt a különböző mérési módszerek egybevetésére. Ismert aktivitásu hexokináz készítmény aktivitását megmérve a fent leírtak alapján a következő faktorokhoz jutottunk /3. táblázat/.

A dolgozatban szereplő aktivitásadatok a 3.1. pont szerinti módszerre átszámítottak.

3. táblázat: A különböző hexokináz aktivitásmérési módszerek összehasonlítása

Glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz segéd- enzimmel /EU/cm ³ /	Krezolvörös in- dikátorral /EU/cm ³ /	Fenolvörös in- dikátorral /EU/cm ³ /
1	3,55	56,55
0,282	1	15,93
0,017	0,062	1

4. Rögzített hexokináz előállítása

4.1. Akrilex C-100 gélre történő rögzítés /26/

1 g száraz Akrilex C-100 gél szuszpendáltunk 50 cm³ 0,1 M 4 °C-os TRIS /HCl vagy foszfát pufferben /pH = 7,0/. 2 g CMC-t vagy EDC-t oldottunk 25 cm³ hideg fenti pufferben. Ezt a gélhez adva 15-20 percig kevertettük jeges vízfürdőn. Az így aktivált gélhez 20-50 mg 0,1 M pH = 7,0 TRIS/ HCl vagy foszfát pufferrel szemben dializálással sómentesített enzimet /300-1200 EU/ adtunk, majd 4 °C-on, 48 órán át kevertettük.

Vákuumszűrés után a rögzített enzimet 3 x 100 cm³ a rögzítéshez használt pufferrel, 3 x 100 cm³ 0,5 M NaCl tartalmu ugyanilyen pufferrel, majd ismét 3 x 100 cm³ fenti pufferrel mostuk. Ezt követően 4 °C-on a rögzítéshez használt pufferben /pH = 7,0; 0,1 M/ tároltuk.

4.2. Rögzítés CH-Sepharose 4 B gélre /1/

200 cm³ 0,5 M NaCl-oldatban 1 g száraz CH-Sepharose 4 B gél duzzasztottunk, majd desztillált vizes mosással távolítottuk el a NaCl-ot /1 g gél 4 cm³-re duzzad/.

Cseppenként annyi CMC-oldatot /170 mg/cm³/ adtunk a gélhez, hogy a karbodiimid végkoncentrációja 0,1 M legyen.

/A kötésnél a folyadék:gél arány 2:1/

A pH-t 1 órán keresztül 4,5-6 között kell tartani 0,1 M NaOH-oldattal, a későbbiekben már kis mértékű a pH válto-

zás. Kevertetés után 6 cm³ 40-80 mg - desztillált vízzel szemben dializált hexokinázt /100-300 EU/ adtunk az aktivált gélhez és a pH állandó ellenőrzése mellett 24 órára át kevertettük a rendszert 4 °C-on.

Vákuumszűrés után 0,5 M NaCl tartalmu pH = 4,0; 0,1 M acetát pufferrel /3 x 10 cm³/ és 0,5 M NaCl tartalmu pH = 8,0 0,1 M borát pufferrel /3 x 10 cm³/ mostuk az elegyet. A gél borát pufferben 4 °C-on tároltuk.

4.3. Brómcíánnal aktivált Sepharose 4 B gélre történő rögzítés /25/

40,0 cm³ Sepharose 4 B gél 1 dm³ desztillált vízzel mostunk üvegszűrőn. A gélhez 40,0 cm³ desztillált vizet adunk és a géluszuszpenzió pH-ját 11,0-ra állítottuk 1 M NaOH-oldattal. A géluszuszpenzióhoz elszívófülke alatt 12 g BrCN-t adtunk kis részletekben, miközben a pH-t 10,5 és 11,0 között tartottuk. /A reakcióedényt 15-25 °C-on termosztáltuk./

Miután a pH már nem változik a gél 100 cm³ 0,1 M NaHCO₃-oldattal 25 °C-on.

3,5 cm³ aktivált gélhez /ami 1 g szárazgélnek felel meg/ 20-60 mg /150-300 EU/ hexokinázt adtunk, melyet 0,1 M pH = 8 borát pufferrel szemben dializáltunk. 0 °C-on 16 óras kevertetés után a felüluszt leszivattuk, majd mostuk a gél 2 x 15 cm³ 1 M NaCl tartalmu 0,1 M acetát puffer-

rel pH = 4,0, 2 x 15 cm³ 1 M NaCl tartalmu 0,1 M borát pufferrel pH = 8,0. A gélt 0,1 M pH = 8,0 borát pufferben tároltuk 4 °C-on.

4.4. Rögzítés szilokróm-aldehidre /43/

1 g gélt olyan desztillált vízzel mostunk, melynek pH-ját előzetesen 8,0-ra állítottuk, majd 100mg desztillált vízzel pH = 8,0 szemben sómentesített - hexokinázt /50-100 EU/ adtunk a gélhez. 0 °C-on 24 órát kevertettük a szuszpenziót pH ellenőrzés mellett /pH = 7-9/. A mosást desztillált vízzel végeztük /3 x 100 cm³/, majd a gélt desztillált vízben tároltuk.

4.5. Poliakrilamid gélbe zárás /8/

1,75 cm³ /20-30 mg/ enzimhez /10-20 EU/ 2,46 cm³ 0,1 M TRIS/HCl puffert /pH = 7,6/ adtunk, amelyben 1 g akrilamidot és 0,05 g N,N'-metilén-bisz-akrilamidot oldottunk. Az elegyhez 0,02 g /NH₄/₂S₂O₈-ot és 10,5 µl 3-dimetil-amino-propionitrilt adtunk. Oxigénmentesítés és polimerizáció alatt sós jéggel hűtöttük a reaktánsokat /-2 - 0 °C/. A polimerizáció fél órán belül bekövetkezett. A gélt szitán átnyomtuk, majd 5 x 5 cm³ 0,1 M pH = 7,5 TRIS/HCl pufferrel és 5 x 5 cm³ desztillált vízzel mostuk.

Valamennyi rögzítési eljárás után a mosó oldatok és a felüluszó fehérjetartalmának, valamint ezen oldatok és a gél aktivitásának mérése alapján következtettünk a megkö-

tés mértékére.

5. A rögzített hexokináz aktivitásának meghatározása

100 mg hexokinázt szuszpendáltunk 1,3 cm³ 0,1 M pH = 7,6 TEA pufferben. A rögzített enzimhez 1,2 cm³ 0,1 M MgCl₂-oldatot és 0,1 cm³ 10 mg/cm³ ATP-oldatot adtunk. 25 °C-on 10 perces állandó kevertetés után a reakciót gyors szűréssel állítottuk le, majd a szűrlet 2 cm³-éhez 0,1 cm³ 10 mg/cm³ NADP⁺-oldatot és 0,05 cm³ glükóz-6-foszfát dehidrogenáz segédenzimet adva 30 perc után 340 nm-en fotometráltuk mintáinkat.

A NADPH + H⁺ koncentráció ismeretében következtethettünk a rögzített hexokináz aktivitására, melyet a következő egyenlettel számítottunk:

$$\frac{\epsilon_{\text{szárazgél}}}{\text{EU}} = \frac{C_2 \cdot \frac{V_2}{V_{M2}} \cdot \frac{V_1}{t_1}}{m_1}$$

C_2 - NADPH + H⁺ koncentráció μmol/cm³-ben,

V_2 - reakcióelegy térfogata cm³-ben,

V_{M2} - minta térfogata cm³-ben,

V_1 - reakcióelegy térfogata cm³-ben,

t_1 - reakcióidő

m_1 - a gél tömege /szárazgélre számítva/ g-ban,

l - a rögzített hexokináz által katalizált reakcióra utal

2 - a $\text{NADPH} + \text{H}^+$ képződés reakciójára utal.

6. D-glükóz, illetve D-glükóz-6-foszfát meghatározása
video-denzitometrián

A rögzített hexokináz által katalizált reakcióban az átalakulás mértékére a szubsztrát vagy a termék mennyiségi meghatározásából következtethetünk.

A feleslegben maradt D-glükóz, illetve a képződő D-glükóz-6-foszfát meghatározására egyaránt lehetőség nyílik a vékonyrétegkromatogram videodenzitometriás értékeléséből. A 2-3 μl mintát Szilikagél 60 F-254 /136 239/ Merck, Darmstadt, NSZK, lemezre cseppentettünk, majd acetonitril; desztilláltvíz 87:15 arányu elegyével futtattunk /18/, friss futtatószerrel. A lemezeket szárítjuk, ezt követően előhívjuk.

Az előhívó oldat az alábbiak szerint készül:

2 g difenil-amint 2 cm^3 anilinben oldva 50 cm^3 -re töltjük acetonnal, és ezt az oldatot hirtelen összeöntjük a 10 cm^3 cc. foszforsav 50 cm^3 -re hígított acetonos oldatával. Az összeöntéskor fellépő zavarosság keverés hatására megszűnik.

Az előhívott lemezeket 5-10 percig 100 °C-on szárítjuk és videodenzitométerrel értékeljük.

V. KISÉRLETI EREDMÉNYEK

1. A hexokináz tisztítása

Az irodalmi leírásokat követő /13, 49, 31/ tisztítások során a hexokináz rossz kitermeléssel / 1 - 15 %/, csekély tisztulással /2-4/ nyertük ki és az enzim specifikus aktivitása is alacsony volt /0,14 - 5 EU/mg/. Ezért szükség volt az ismert módszerek megfelelő módosítására.

1.1. A hexokináz feltárása

Különböző - mechanikai, kémiai - módszerekkel próbáltuk megnövelni a feltárás hatásfokát. E feltárások eredményeit a 4. táblázatban foglaltuk össze.

Savas feltárással /0,1 M acetát puffer, pH =5,6/ is próbálkoztunk, de ez gyakorlatilag inaktiválta az enzimet. A Na_2HPO_4 -tal, ammóniával, és a toluollal végzett feltárások az irodalmat /13, 49, 31/ követik.

Kombinált - toluol + Na_2HPO_4 , vagy citrát puffer - feltárásaink során 100 g szárított élesztőhöz 16 cm³ toluolt adtunk, majd 312,5 cm³ 0,2 M Na_2HPO_4 -oldatot vagy 0,1 M citrát puffert /pH = 6,3/. Az így nyert szuszpenziót 3 órán keresztül 37 °C-os vízfürdőben inkubáltuk, majd egy éjszakai 4 °C-os állás után centrifugáltuk.

Az 5. táblázat adatai alapján a foszfátos - 24 órai - vagy a toluol + citrát pufferes feltárást célszerű alkalmazni. A feltárással nyert autolizátumból a sejttörmeléket

centrifugálással vagy szüréssel távolítottuk el, majd az így nyert felüluszt, illetve szürletet tisztítottuk tovább.

1.2. pH-frakcionálás

A nyers extraktumot /13/ 25 °C-ra melegítjük, majd pH-ját 3 M ecetsavval 4,4-re állítjuk. Ezt követően jégfürdőbe helyezzük az anyagot. A savazás során képződött csapadékot 10 perces, 4000 g, 0 °C-os centrifugálással távolítottuk el.

A pH-frakcionálás helyett negatív kicsapással próbálkoztunk, mert a tisztulás minimális volt. A nyers kivonat pH-ját 3 M ecetsavval 4,8 - 4,9-re csökkentettük. Ekkor az enzimveszteség ugyan kisebb lett, de a tisztulás jelelősen nem változott - így a továbbiakban ezt sem alkalmaztuk.

1.3. Ammónium-szulfátos frakcionálás

Mivel a kisózást követő centrifugáláskor a felülusztó hexokináz aktivitása jelentős volt - 60-70 % - ezért a kicsapást is vizsgálat tárgyává tettük.

20-80 %-os ammónium-szulfátos telítési sorozatot készítettünk - 5 %-os lépésenként. A kisózást jegesvíz fürdőn végeztük, s a centrifugálás után /15 perc, 3000 g, 4 °C/ a csapadékot 1 cm³ hideg pufferben /0,1 M TEA puffer pH = 7,6/ oldottuk.

A felüluszók és csapadékok aktivitás mérése és a fehérje tartalom meghatározása alapján az alsó telítési hárt 25 %-ban, míg a felsőt 75 %-ban állapítottuk meg.

A szilárd ammónium-szulfáttal történő frakcionálás ezen eredményeit a 3. ábra szemlélteti.

A tisztulás és a kitermelés fokozása végett különböző pH-n, valamint glükóz és β -merkaptotanol jelenlétében is megvizsgáltuk az ammónium-szulfátos telítést.

A toluol és Na_2HPO_4 -tal feltárt élesztő nyers extraktumának pH-ját 3 M ecetsavval, illetve ammónium-hidroxiddal állítottuk pH = 4,4, 6,0, 8,5, 9,0-re. Ha ekkor csapadék képződött, azt centrifugálással távolítottuk el, majd a felüluszót 10 %-os lépésenként telítettük. A centrifugálással 10°C , 20 perc, 9000 g/ nyert csapadékokat 1 cm³ hideg desztillált vízben oldottuk, majd mértük a csapadékok és felüluszók aktivitását, fehérjetartalmát.

A kísérleti eredményeket a 4. és 5. ábra foglalja össze.

A 4. ábrán a csapadékok térfogataktivitását ábrázoltuk a telítés függvényében egy-egy adott pH-n, míg az 5. ábra a térfogataktivitást a pH függvényében tünteti fel egy-egy telítési értéknél.

A kísérleti eredmények alapján pH = 6-7 a legalkalmasabb az ammónium-szulfátos telítésre.

A tisztulás és kitermelés adatait is figyelembe véve - ezeken a pH-kon - ha több lépésben telítünk, akkor először a nyers extraktumot 40 %-osra, majd a centrifugálás során nyert felülusztót 50, illetve pH = 7,0-en inkább 60 %-osra célszerű ammónium-szulfáttal telíteni /lásd az 5. táblázatot/.

Szubsztrát jelenlétében is telítettünk. A kezeletlen extraktumhoz 100 mM végkoncentrációban D-glükózt adtunk, majd ezt követően telítettük ammónium-szulfáttal. A specifikus aktivitás és kitermelés változását a telítés függvényében ábrázoltuk és glükóz nélküli kontrollhoz hasonlítottuk /6. táblázat/. A két adat változása hasonló a kontrollhoz, csupán a kitermelési értékek némileg nagyobbak szubsztrát jelenlétében.

Tehát a több lépésben végzett kicsapásnál vagy a nyers extraktumhoz vagy az utolsó kisózás felülusztójához érdemes szubsztrátot adni.

Az irodalom alapján /lásd II/4./ ismert, hogy pH = 7,0-en a β -merkaptóetanol aktiválja a hexokinázt. Ennek hatását is megvizsgáltuk.

A nyers extraktumhoz 20 mM végkoncentrációban β -merkaptóetanolt adtunk és ezt követően ammónium-szulfátos telítési sorozatot készítettünk. Mint a 6. táblázatból kitűnik, a reagens a tisztulást jelentősen befolyásolta /kb. 4-szeres az 50 %-os csapadékban/, ugyanakkor a kitermelés

a kontrollal közel azonos. A két reagens együttes alkalmazásával is próbálkoztunk. Ekkor a tisztulás az 50 %-os telítettségű csapadékban emelkedett /4,3-szeres lett/, a ki-termelés viszont lényeges növekedést nem mutatott /6. táblázat/.

A telítésre vonatkozó kísérleteink alapján megállapíthatjuk, hogy a telítést állandó pH-ellenőrzés mellett kell kivitelezni és célszerű a pH-t 6-7 között tartani, illetve érdemes az ammónium-szulfátos frakcionálást több lépésben végezni /40, 50, 60 %/.

1.4. Kromatográfiás tisztítások

1.4.1. Hexokináz tisztítása DEAE-cellulóz oszlopon

A 10^{-4} M EDTA tartalmu 5 mM szukcinát pufferrel /pH = 6/ szemben dializált enzimet DEAE-cellulóz oszlop-kromatográfiával tisztítottuk tovább /48/. Az 1,68 x 6 cm-es oszlopot 5 mM - 10^{-4} M EDTA tartalmu - szukcinát pufferrel /pH = 6/ ekvilibráltuk. A nem kötődő fehérjéket a pufferrel mostuk le az oszlopról. A mosást 90 cm³/óra átfolyási sebességgel végeztük - 8-9 oszlop ágytérfogattal, majd pH = 5,4 szukcinát pufferrel folytattuk az eluciót. Az átfolyási sebesség ugyancsak 90 cm³/órás volt. Két ágytérfogatnyi eluens átfolytatása után az átáramlási sebességet 33 cm³/órára csökkentettük, ekkor azonban már pH = 4,5 szukcinát puffert használtunk. Az elució során a puffer összetétele és koncentrációja változatlan volt.

Aktiv frakciónk csak a pH = 4,5 eluálással jelent meg és mint azt a 6. ábra mutatja, két közeli csucsban.

Az oszlopra felvitt 0,89 EU/mg specifikus aktivitású minta 14, illetve 11-szeresére tisztult - a P-I csucs /lásd II/2./ maximális specifikus aktivitása 12,7 EU/mg, míg a P-II csucské 9,9 EU/mg.

A DEAE-cellulóz oszlopra felvitt hexokinázt sógradiens elucióval is tisztíthatjuk. Ekkor állandó pH mellett 8-9 oszlop ágytérfogatnyi 5 mM - 10^{-4} M EDTA tartalmu - szukcinát pufferrel /pH = 5,6/ mossuk az oszlopot, majd 0,5 M NaCl tartalmu fenti pufferrel sógradienst alakítunk ki. Ekkor az 1,4 x 6,3 cm-es oszlopra felvitt 17,5 EU összekativitású, 16,4 mg fehérje tartalmu - 10^{-4} M EDTA tartalmu - 5 mM szukcinát pufferrel /pH = 5,6/ szemben dializált - enzimoldat eluálódik. A 2,5 cm³-es frakciók mérése alapján egy aktiv csucsban jött le a hexokináz, melynek maximális specifikus aktivitása 28,7 EU/mg, azaz 27-szeres tisztulása /7. ábra/.

1.4.2. Hexokináz tisztítása CM-cellulóz oszlopkromatográfiával

A DEAE-cellulóz oszlopkromatográfia során alkalmazott lépcsőzetes pH-elucióval próbáltuk a hexokinázt tisztítani a kationcserélő CM-cellulóz oszlop segítségével. Az 1,6 x 5,3 cm oszlopra felvitt - 10^{-4} M EDTA tartalmu, 5 mM szukcinát pufferrel /pH = 6,3/ szemben dializált -

enzimoldat összaktivitása 17 EU, össz-fehérjetartalma 16,4 mg volt. Az eluciót 5 mM szukcinát pH = 6,3 / 10^{-4} M EDTA tartalmu/ pufferrel kezdtük, s ezen a pH-n egy aktiv csucst is kaptunk, mely egybeesik a fehérje csucs-csal. A csucs specifikus aktivitása 1,4 EU/mg, azaz a tisztulás minimális /1,4-szeres/ /8. ábra/. Tehát a CM-cellulóz nem alkalmas a hexokináz kromatográfiás tisztítására.

2. A hexokináz rögzítési-kísérletek eredménye

A hexokinázt kovalens kötéssel rögzítettük vizoldható karbodiimiddel aktivált Akrilex C-100 és CH-Sepharose 4B gélhez; brómciánnal aktivált Sepharose 4B gélhez, valamint szilikróm-aldehidhez, illetve poliakrilamid térhálóba zártuk.

A különböző gélekhez való rögzítés eredményeit összehasonlítva, az Akrilex C-100 gélhez történő rögzítés bizonyult a legjobbnak. A rögzítési kísérletek adatait a 8. táblázatban foglaltuk össze.

Az Akrilex C-100 gélen történő rögzítést részletesebben megvizsgáltuk. A rögzítési kísérleteket különböző pufferek jelenlétében is elvégeztük.

A puffer-változtatás hatásait a 9. táblázatban mutatjuk be.

A 9. táblázat alapján az Akrilex C-100 típusu hordozóhoz való rögzítésben a TRIS/HCl puffer bizonyult a legjobbnak, illetve a 20 mM cisztein tartalmu TRIS/HCl

puffer, mert ekkor jelentősen megnövekedett a megkötés mértéke és csökkent az aktivitásveszteség.

3. Az oldott és az Akrilex C-100 gélhez rögzített hexokináz katalitikus tulajdonságainak és stabilitásának összehasonlítása

3.1. Az oldott és a rögzített enzim pH-optimuma

A hidrogén-ion koncentrációnak a hexokináz által katalizált reakcióra gyakorolt hatását pH 4-12 között, 0,1 M koncentrációju pufferek jelenlétében végeztük.

A pH = 4-5,5-ig 0,1 M acetát, pH = 5,5-7,5-ig 0,1 M foszfát és pH = 7,5-8,0-ig 0,1 M TEA, míg pH = 8,0-12-ig 0,1 M glicin puffert használtunk.

Az oldott hexokináz pH-optimuma 8,25 míg a rögzítés az optimum eltolódását eredményezte a lugos tartomány felé. A rögzített hexokináz pH-optimuma 9,75 /9. ábra/.

A különböző ionerősségű pufferek alkalmazása mellett is meghatároztuk a rögzített hexokináz pH-optimumát. 0,02 M, 0,1 M, 0,2 M TRIS/HCl pH = 8-8,7, illetve glicil-glicin pH = 8,5-11 pufferek jelenlétében a pH-optimum nem változott /10. ábra/.

3.2. Hőmérséklet hatása az oldott és a rögzített hexokináz aktivitására

A hőmérséklet hatását a hexokináz katalizálta reakció-

ra 30 - 70 °C tartományban határoztuk meg. Adott hőmérsékleten megmértük az enzim aktivitását 0,1 M TEA pufferben /pH = 7,6/. Így kaptuk meg az enzim látszólagos hőmérséklet optimum értékeit, mely oldott hexokináznál 36 °C, míg a rögzítetténél 42 °C /11. ábra/.

3.3. A nativ és a rögzített hexokináz Michaelis-állandójának meghatározása

Az oldott és a rögzített hexokináz Michaelis-állandóját két szubsztrátjára /D-glükóz, ATP/ vizsgáltuk. A D-glükóz koncentrációját 1-20 mM tartományban változtattuk 0,54 mM ATP koncentráció mellett, míg az ATP koncentrációját 0,2 - 1,0 mM tartományban változtattuk 222 mM D-glükóz koncentráció alkalmazásával. A Michaelis állandók meghatározását a Lineweaver-Burk-féle ábrázolással végeztük.

Az oldott hexokináz K_M értéke ATP-re több, mint háromszorosa a rögzített hexokináz megfelelő értékének. D-glükózra az ellenkező eset áll fenn, vagyis a rögzített enzim K_M értéke háromszorosa az oldott enzimének.

A K_M és v_{max} értékeket a 12. és 13. ábrák, valamint a 10. táblázat mutatja be.

3.4. Az oldott és a rögzített hexokináz ureával szembeni viselkedése

Az oldott és a rögzített enzim konformációs stabilitását különböző koncentrációju urea oldatok jelenlétében

vizsgáltuk. Meghatározott időpontokban mintát vettünk a 0,75 - 2,0 M végkoncentrációju urea-oldatokban, szobahőmérsékleten inkubált oldott és rögzített hexokinázokból és meghatároztuk a maradék aktivitást.

Az inaktiválódás sebességét a $t_{1/2}$ értékkel jellemezhetjük. Az oldott enzim esetében a $t_{1/2}$ 1,5 M ureában kb. 100 percnak és 2,0 M ureában 63 percnak tehető, a rögzített hexokináz esetén már 1 M ureában 90 perc. Az urea koncentráció növekedtével - 1,5 M, illetve 2,0 M - a $t_{1/2}$ értéke tovább csökken - 28,5, illetve 24 percre. A leírtakat a 14/a és b. ábra szemlélteti.

3.5. Az oldott és a rögzített hexokináz pH-stabilitása

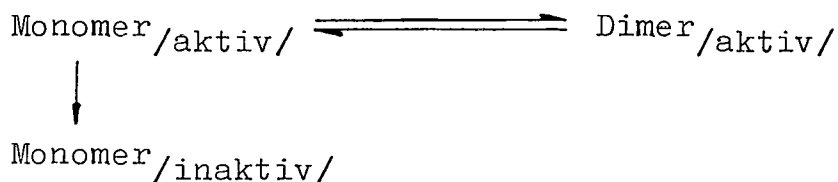
Különböző pH-ju /pH = 7,0, 8,0, 9,0/ 0,1 M TRIS/HCl pufferben szobahőmérsékleten inkubáltuk az oldott és a rögzített enzimet. Meghatározott időpontokban mintát véve mértük a hexokináz aktivitását. Semleges közegben mindkét forma egyaránt stabil, míg lugosabb közegben a rögzített hexokináz tűnik stabilabbnak. A rögzített enzim $t_{1/2}$ értéke pH = 9,0-en kb. kétszer nagyobb /58 perc/, mint az oldott enzimé /28 perc/. Magasabb pH-n az oldott hexokináz inaktiválódása két részre bontható - egy gyorsabb és egy lassabb szakaszra /15/a és b. ábra/.

3.6. Az oldott és a rögzített hexokináz hőstabilitása

Az oldott és a rögzített hexokináz hőstabilitását

40-60 °C tartományban hasonlítottuk össze - 5 °C-onként. A méréseket 0,1 M TEA pufferben /pH = 7,6/ végeztük, miután meghatározott időpontokban mintát vettünk az inkubált enzimből. 40 és 45 °C-on az oldott hexokináz esetében aktiválódást figyeltünk meg, melyet a rögzített enzim nem mutatott /16/a. és b. ábra/.

Az oldott hexokináz hőinaktiválódási kinetikájának részletes elemzésére szolgált a következő kísérlet: 40 °C-on az aktiválódási maximum idejéig /40 perc/ inkubáltuk az enzimet, miközben meghatározott időpontokban mintát vettünk és mértük a maradék aktivitást /0,1 M TEA pufferben pH = 7,6/, majd 4 °C-on állni hagytuk egy éjszakán, s másnap 40 °C-on ugyanannyi ideig inkubáltuk az oldott hexokinázt, mint az első napon, hasonlóan mérve az aktivitást. Mindkét alkalommal maximumon átmenő görbét kaptunk. A második napi aktiválódás kisebb mértékű, mint az első napi. Feltételezhető a következő átalakulás:



A hőmérséklet kis mértékű növekedése jelentős inaktiválódást eredményezett. Az oldott enzim $t_{1/2}$ értéke 45 °C-on 116 perc, míg 50 °C-on kb. 5 perc. Ugyanezek a hőmérsékleteken a rögzített hexokináz $t_{1/2}$ értékei 35 perc, illet-

ve 9 perc. Tehát a rögzített enzim magasabb hőmérsékleten lassabban inaktiválódik.

50 °C felett a hőinaktiválódás rendkívül gyors, az oldott hexokináz néhány percen belül kicsapódik.

A rögzített hexokináz inaktiválódása összetett folyamat, mely egy gyorsabb és egy lassabb szakaszra bontható. Az első gyors szakaszban az enzim kb. fele inaktiválódik.

3.7. A rögzített hexokináz tárolási stabilitása

A rögzített hexokinázt 0,1 M TEA pufferben /pH = 7,6/ 4 °C-on tároltuk. Eltarthatóságát szubsztrátja /ATP/ és terméke /glükóz-6-foszfát/ jelenlétében is vizsgáltuk. A kontroll jelentős és gyors aktivitásvesztést mutatott - kb. 2 nap alatt elveszti kezdeti aktivitásának felét. 2 mM ATP némileg megnöveli az eltarthatóságot. A hexokinázt terméke - 2 mM glükóz-6-foszfát - jelenlétében célszerű tárolni, mivel jelentősen megnöveli az enzim tárolási stabilitását - 7 nap alatt a kezdeti aktivitásának a felét veszti el, amint ezt a 11. táblázat mutatja.

4. A rögzített hexokináz gyakorlati alkalmazásának modellezése

Az Akrilex C-100 gélhez kapcsolt hexokinázt 1,2 x 7 cm oszlopba töltöttük, majd a 25 °C-os pH = 7,6 reakcióelegy átfolyatása után a képződő termék, D-glükóz-6-foszfát mennyiségét glükóz-6-foszfát dehidrogenázzal történő méréssel

határoztuk meg. Ezen mérés alapján következtethettünk az oszlop működésére.

Először a reakcióelegy összetételét vizsgáltuk meg. Különböző ATP koncentrációju, majd D-glükóz, illetve MgCl_2 koncentrációju oldatokat készítettünk. Természetesen mindig csak az egyik anyag koncentrációját változtattuk.

Kísérleteink alapján az alábbi összetételű reakcióelegy mellett maximális a konverzió: 2 mM D-glükóz,

2 mM ATP

7 mM MgCl_2

Mint az a konverzió-átfolyási sebesség görbéből /17.ábra/ kitűnik, a legnagyobb átalakulást akkor értük el, ha 1 cm³ reakcióelegy 10-15 perc alatt halad át az oszlopon.

Meghatároztuk az oszlop napi, illetve több napi hatékonyságát is.

Az Akrilex C-100 gélhez rögzített hexokinázt 0,8 x 3 cm-es oszlopba töltöttük. Az előzőekben meghatározott összetételű reakcióelegy pH-ját 0,1 M NaOH-oldattal pH = 9,0-re állítottuk. A reakcióelegy átfolyási sebessége 15 perc/cm³ volt.

Az oszlop hatékonyságát 24 °C-on vizsgáltuk, a gyűjtött 2 cm³-es frakciók glükóz tartalmának meghatározása alapján. A glükóz mennyiségét videodenzitometriásan határoztuk meg, s így következtettünk a konverzió mértékére. A konverzió mértékét - a gyűjtött 15-18 frakcióban - a 18. ábra mutat-

ja. Az oszlop a 8-9. frakciónál mutatott kismértékű csökkenést.

Ugyanilyen méretű oszlopot hasonló körülmények között több napon át működtettünk.

Naponta 3-4 2 cm³-es frakciót szedtünk az oszlopról, majd 4 °C-on tároltuk a rögzített hexokináz oszlopot. A frakciók glükóz tartalmának meghatározása alapján következtettünk az oszlop több napos működésére.

A konverzió már a második napon 85 % körüli volt, ami főleg a tárolás alatti inaktiválódásnak tulajdonítható, az enzim oszlopról való leoldódása nem volt mérhető.

Az Akrilex C-100 gélhez rögzített hexokináz több napos működésének konverzióját a 19. ábra szemlélteti.

VI. MEGVITATÁS

A hexokináz szárított élesztőből történő izolálásakor a tisztulás és a kitermelés fokozása végett az egyes lépéseket külön-külön is megvizsgáltuk.

A feltárás hatásfokát az ellenálló élesztő sejttal megbontásával, több sejttartalom kinyerésével próbáltuk növelni. Az ozmotikus viszonyok megváltoztatása mellett toluollal is próbálkoztunk. A két hatás együttes alkalmazása és a feltárás idejének növelése eredményezheti a feltárással nyert aktivitás növekedését.

A pH frakcionálás és a negatív kicsapás során a minimális tisztulást a hexokináz és a szennyezésként jelenlévő proteolitikus enzimek izoelektromos pontjának átfedése okozhatja.

Az ammónium-szulfátos frakcionálás pH optimuma miatt az autolizátum felülszójának pH-ját 6-7 közötti értékre kell állítani.

A lúgos körülmények között, illetve a glükóz jelenlétében végzett ammónium-szulfátos frakcionálás eredményei alátámasztják azt az irodalomból /5/ ismert tényt, hogy a pH növelése, a magas ionerősség, glükóz elősegítik a dimer enzim disszociációját - monomerekre.

A kontrollhoz viszonyított kismértékű kitermelés-növekedés a D-glükózzal végzett ammónium-szulfátos frakcionálás esetén a szubsztrát szerkezet-stabilizáló hatásával függhet

össze. A D-glükóz beköt az aktiv centrum szubsztrát kötőhelyére, így meggátolhatja az ionok térszerkezet módosító hatását akár a dimerben, akár a monomerben.

Bár az aktiv centrumban cisztein nincs, de szulfhidril csoportjai révén az aktiv centrumban lévő aminosavakkal hidrogén-kötéseket létesíthet és ha ez a kapcsolat módosul, akkor az enzim inaktiválódhat. Semleges közegben β -merkapto-etanol védi ezeket a csoportokat. Ezen aktiv konformációt biztosító, stabilizáló hatása adhat magyarázatot az ammónium-szulfátos frakcionálásban aktivitásfokozó, tisztulásnövelő szerepére.

Általában 70-80 %-os telítettségénél aktivitásvesztés lép fel. Ez a magas ionerősség már említett hatásának tulajdonítható.

A hexokináz izoenzimjeit DEAE-cellulóz oszlopkromatográfiával, pH lépcsőzetes csökkentésével különítettük el. A kromatogram két csúcsa megfelel a P-I és P-II formáknak. A NaCl-gradiens elucióval kapott csúcs az S formának felelhet meg.

A fehérje töltésviszonyai alapján anioncserélőkhöz kötődik, kationcserélőkkel /CM-cellulóz/ negatív kromatográfia valósítható meg. Ekkor az izoenzimek elkülönülése nélkül egy aktiv csúcsot kaptunk.

Az általunk alkalmazott rögzítési eljárásoknál a kovalens kötések kialakításában a hexokináz primer amino-cso-

portjai vesznek részt. A bekötés mértéke nagyságrendileg különbözik, melynek oka a Sepharose 4B gélek esetében elsősorban sztérikus tényezőkkel magyarázható, míg a szilokrom-aldehidnél az ok a kevés aktiv csoport lehet.

A hexokináz aktivitását, szerkezetét nagy mértékben befolyásolja a puffer anyagi minősége, pl.: foszfát puffer elősegíti a dimer enzim disszociációját, aktivitásgátló is, mert a foszfát az ATP kötőhelyhez kapcsolódhat /5/. A cisztein hatása megegyezik a β -merkaptó-etanoléval. Ezekkel a tényekkel értelmezhetők az Akrilex C-100 gélhez történő rögzítés eltérő eredményei különböző pufferek jelenlétében. A poliakrilamid gélbe záráskor fellépő nagyfokú aktivitásvesztést feltehetőleg a polimerizáció során keletkező szabad gyökök okozhatták.

A rögzítés megváltoztathatja a fehérje felületi töltésviszonyait és ezen keresztül térszerkezetét. Ezek megváltoztatják a katalitikus tulajdonságokat és a konformációs stabilitást.

Az Akrilex C-100 gél savas mikrokörnyezetet jelent a hexokináz számára. A pH-optimum lugos irányba való eltolódása erre vezethető vissza. Az ilyen irányu eltolódás polianionos gélek esetében általános.

Ha ez a pH-optimum eltolódás a pufferek ionerősségének növelésével megszüntethető, akkor az eltolódás a polianionos mikrokörnyezetből adódik. A hexokináz esetében ezt nem

tapasztaltuk, tehát a felületi áttöltődés miatti konformáció-változás eredményezte a pH-optimum eltolódását, ami megváltoztatja a K_M értékeket és a stabilitási jellemzőket is.

Általában a rögzített oligomer enzimek inaktiválódása /pH, hőmérséklet, urea/ bonyolultabb, mint a monomer enzimké, ugyanis az oligomer esetében az alegységek kötődése különböző lehet. A rögzített hexokináz hő- és pH-stabilitása nagyobb foku, mint az oldott enzimé.

Az oldott hexokináz hőinaktiválódásának kezdeti szakaszán nő az enzim aktivitása, ami a dimer disszociációjakor a megnövekedett hőmozgás következtében fellazult szerkezetű dimer létrejöttével értelmezhető. Ehhez az enzimhez a szubsztrátmolekulák könnyebben hozzáférhetnek. A hőmérséklet növelésével az aktiválódás kisebb mértékű és rövidebb idejű lesz, ami arra utal, hogy a dimer gyorsabban disszociálódik, illetve a monomer inaktiválódik. Ez a hatás eredményezi a $t_{1/2}$ értékek csökkenését is /45 °C-on 116 perc, 50 °C-on 5 perc/. Ez mindkét formánál fennáll és teljes összhangban van azzal a ténnyel, hogy a hexokináz hőkezeléssel nem tisztítható /45 °C feletti autolízis teljes inaktiválódást eredményez/.

Az irodalmi adatok alapján a pH változtatás hatásának mérését TRIS/HCl pufferben valósíthatjuk meg, mivel ebben a pufferben a pH-től függetlenül nincs disszociáció /5/.

Az enzim térbeli szerkezete savas, illetve lúgos közegben /24/ "kicsavarodik" és a hexokináz inaktiválódik. Ez a folyamat reverzibilis. Ezzel magyarázható, hogy a semleges közeg a legoptimálisabb az enzim számára. Magasabb pH-n az oldott hexokináz inaktiválódása két részre - egy gyorsabb és egy lassabb szakaszra - bontható. Ez a dimer két lépéses disszociációjával, valamint a dimer és a monomer eltérő stabilitásával értelmezhető.

Denaturáló szerek /pl.: urea/ koncentrációjának növelése az oldott enzim nagyfoku aktivitásvesztését okozza. Ez szintén konformáció-változásnak, a monomerre disszociálódásnak és inaktiválódásnak tulajdonítható. Kis urea koncentrációnál /0,75 M/ az aktiválódás a szerkezet fellazulásával értelmezhető.

A rögzített hexokináz hőinaktiválódásának van egy gyorsabb és egy lassabb szakasza, és magasabb hőmérsékleteken nagyobb $t_{1/2}$ értékeket mérünk /50 °C-on 9 perc/, mint az oldott enzimnél.

A rögzített hexokináz pH-stabilitása lúgosabb közegben nagyobb, mint az oldott enzimé. Ezek a stabilitásbeli különbségek a mikrokörnyezetnek és a rögzítés konformáció stabilizáló hatásának tulajdoníthatók. A rögzített enzimben feltehetőleg hexokináz izoenzimek vannak, melyeknek az ureával szembeni stabilitása eltérő. Kis koncentrációju /0,75 M, 1,0 M/ urea hatására a rögzített enzim aktiváló-

dik, ami valószínűleg a nem-kovalens kötések felszakadásával, átrendeződésével aktívabb konformáció kialakulását eredményezheti. Magasabb urea koncentrációk /1,5 M, 2,0 M/ esetén gyors és nagyfokú az aktivitásvesztés, mely a különböző formák disszociációjával és inaktiválódásával értelmezhető.

A rögzítéskor létrejövő térszerkezet és felületi töltésállapot változások okozhatják az enzimformák affinitásbeli különbségeit szubsztrátjaikhoz. A rögzített hexokináz affinitása D-glükózhoz kisebb, mint az oldott enzimé. Ismert, hogy a D-glükóz a monomer aktív centrumába kötődve egy szerkezetváltozást hoz létre /10/. Valószínű, hogy ez a változás a rögzített enzimnél nem valósulhat meg, vagy a szubsztrátkötőhely térszerkezete módosult. Utóbbival indokolható, hogy a rögzített enzim affinitása ATP-re nagyobb.

A glükóz-6-foszfát általi védőhatás a tárolásban az aktív térszerkezet rögzülésével értelmezhető.

A tárolás alatti fehérjekiolódás nélküli folyamatos inaktiválódással magyarázható az Akrilex C-100 gélhez rögzített hexokinázból készült oszlop konverziójának időbeli csökkenése. Az inaktiválódás a savas mikrokörnyezet okozta disszociációnak tulajdonítható.

Az oszlop konverzióját a reakció-elegy átfolyási sebessége is befolyásolja. A heterogén rendszerek diffúziós hatásainak megfelelően a konverzió annál nagyobb, minél kisebb a percenként átáramló reakcióelegy mennyisége.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleti eredményeinket a következőkben foglaljuk össze. A hexokináz izolálásához a szárított élesztőt toluollal célszerű feltárni. Az ammónium-szulfátos frakcionálást pH = 6-7 között, 20 mM β -merkaptó-etanol jelenlétében több lépésben /40, 50, 65 %/ kell kivitelezni. A teli-tést követő dialízis után DEAE-cellulóz oszlopkromatográfia során pH elucióval vagy só-gradiens elucióval 27-35, illetve 69-szeres tisztulás érhető el a kiindulási autolizátum specifikus aktivitására vonatkoztatva.

A hexokinázt kovalensen rögzítettük BrCN aktivált Sepharose 4B, CH-Sepharose 4B, szilokrom-aldehid és Akrilex C-100 gélekhez, illetve poliakrilamid gélbe zártuk. Mivel leghatékonyabbnak az Akrilex C-100 gélre való rögzítés bizonyult, ezért e rögzítést részletesebben vizsgáltuk. TRIS/HCl pufferben a cisztein jelenléte 5-szörösére növeli a bekötés mértékét.

Az oldott és az Akrilex C-100 gélre rögzített hexokináz katalitikus tulajdonságait és stabilitását összehasonlítva megállapítható:

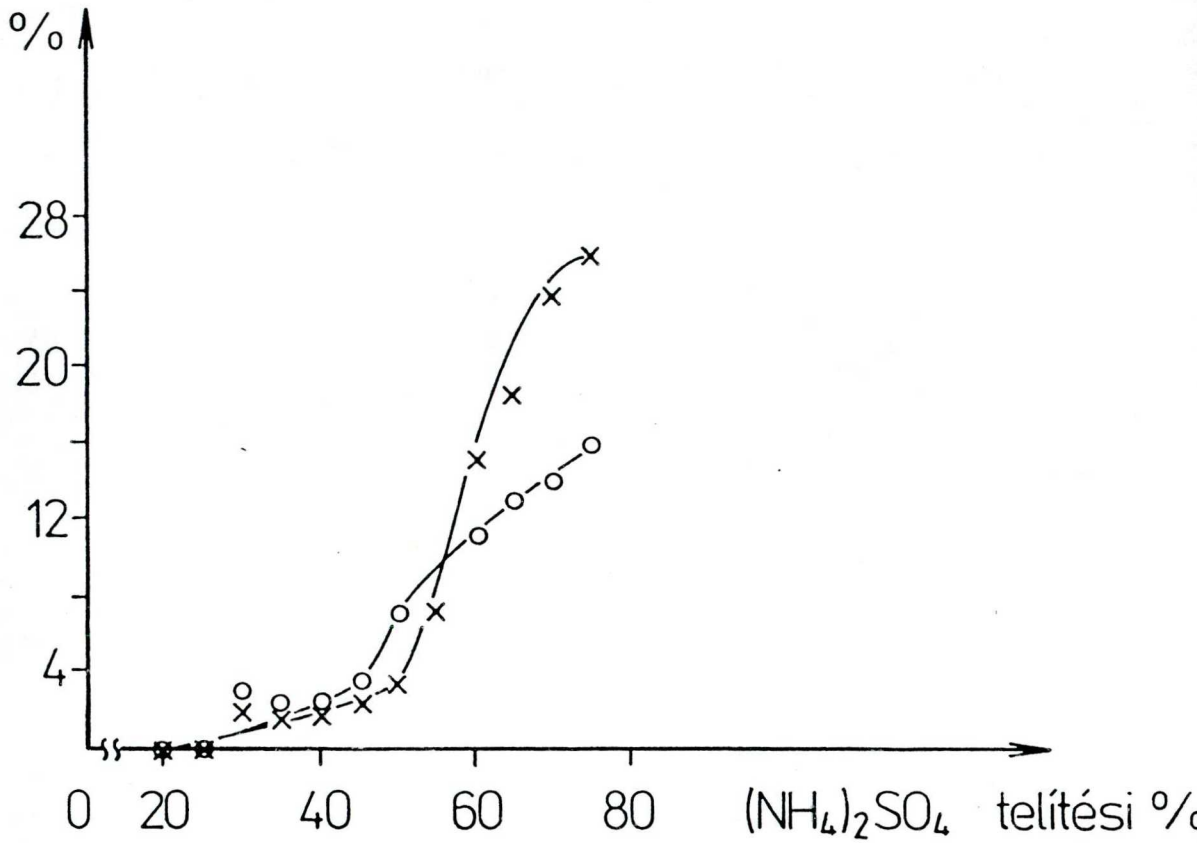
- a rögzített enzim pH optimuma a lúgos tartomány felé tolódik el,
- a látszólagos hőmérséklet optimum a rögzített enzimnél magasabb, 40 °C körüli,

- a rögzített hexokináz Michaelis-állandója D-glükózára nagyobb /6 mM/, míg ATP-re kisebb /0,21 mM/, mint az oldott enzimre vonatkozó értékek,
- a rögzített enzim termostabilitása és pH változtatással szembeni ellenállása nagyobb fokú, mint az oldott enzimé.

Megállapítottuk, hogy a rögzített hexokinázt terméke /glükóz-6-foszfát/ jelenlétében célszerű tárolni - 4 °C-on, mivel stabilizálja az enzimet.

Meghatároztuk az Akrilex C-100 gélre rögzített hexokináz-oszlop működésének optimális paramétereit, a reakció - legy összetételét, átfolyási sebességét, valamint konverziójának időfüggését.

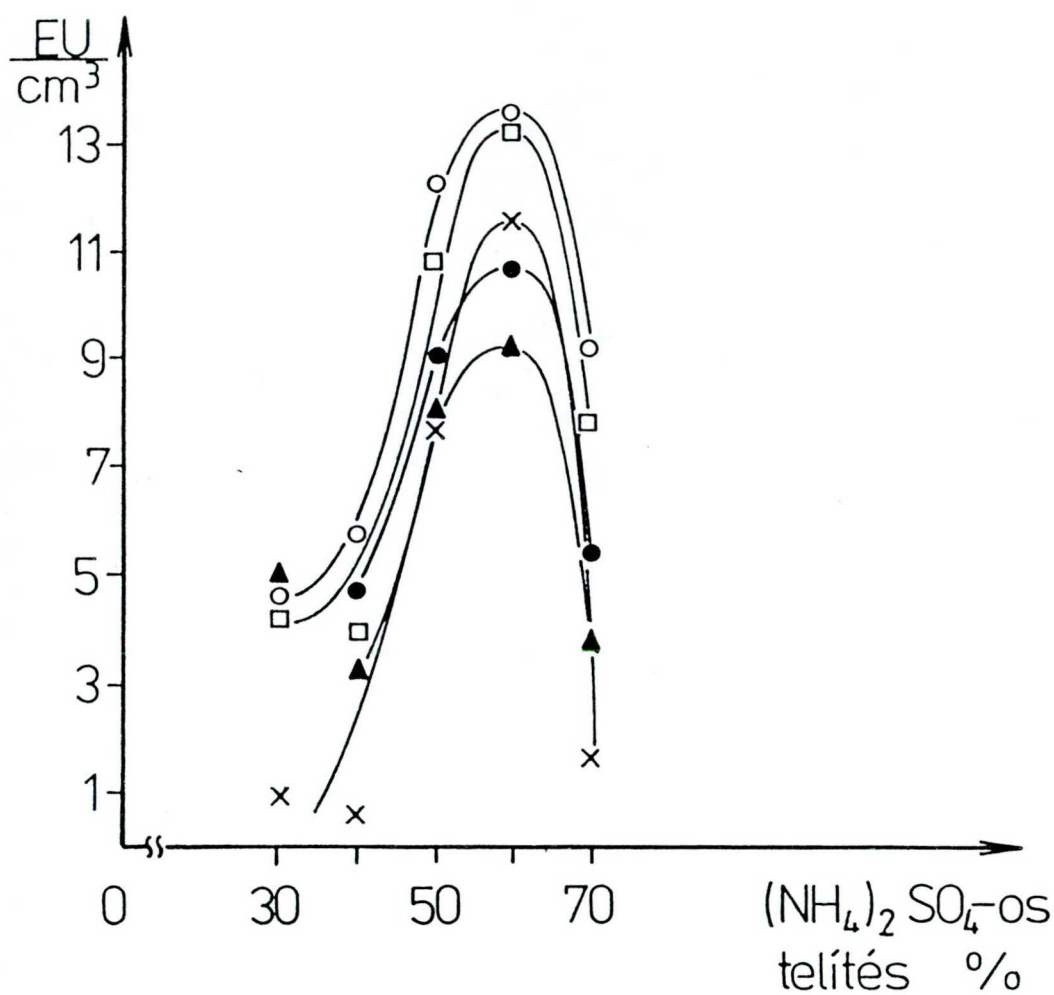
VIII. ÁBRÁK, TÁBLÁZATOK



3. ábra

Az enzimaktivitás és a fehérjetartalom megoszlása az ammónium-szulfát telítés függvényében /8-10 °C/

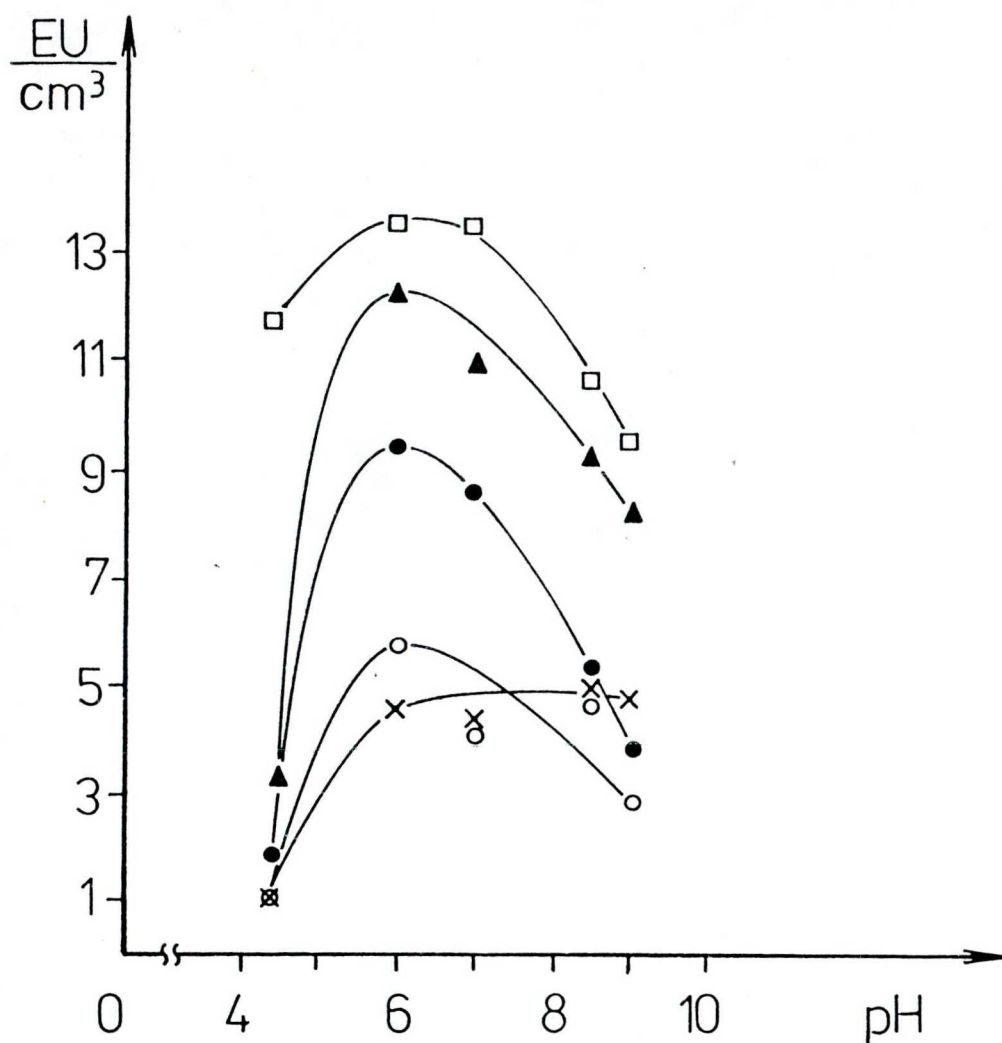
- x — x enzimaktivitás a csapadékban
o — o fehérjetartalom a csapadékban



4. ábra

A hexokináz aktivitásának változása a különböző pH-kon végzett ammónium-szulfátos telítés során - csapadékban /8-10°C-on/

pH	x — x	4,4
	o — o	6,0
	□ — □	7,0
	• — •	8,5
	▲ — ▲	9,0

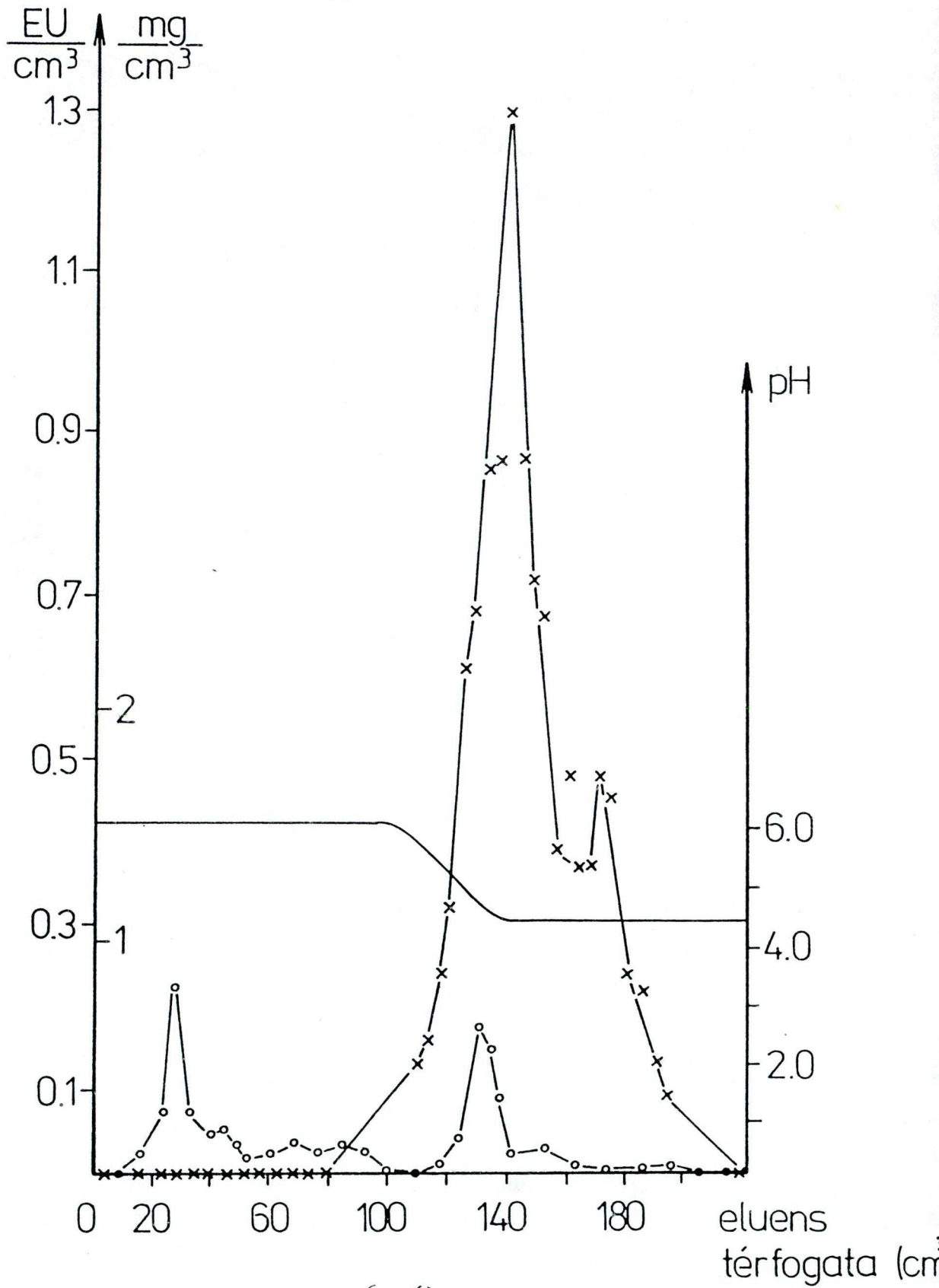


5. ábra

A hexokináz aktivitásának változása a pH függvényében
 állandó ammónium-szulfát telítési értéknél /a csapa -
 dékban, 8-10 °C-on/

Ammónium-szulfátos telítés

- x — x 0-30 %
- o — o 30-40 %
- ▲ — ▲ 40-50 %
- — □ 50-60 %
- — ● 60-70 %



6. ábra

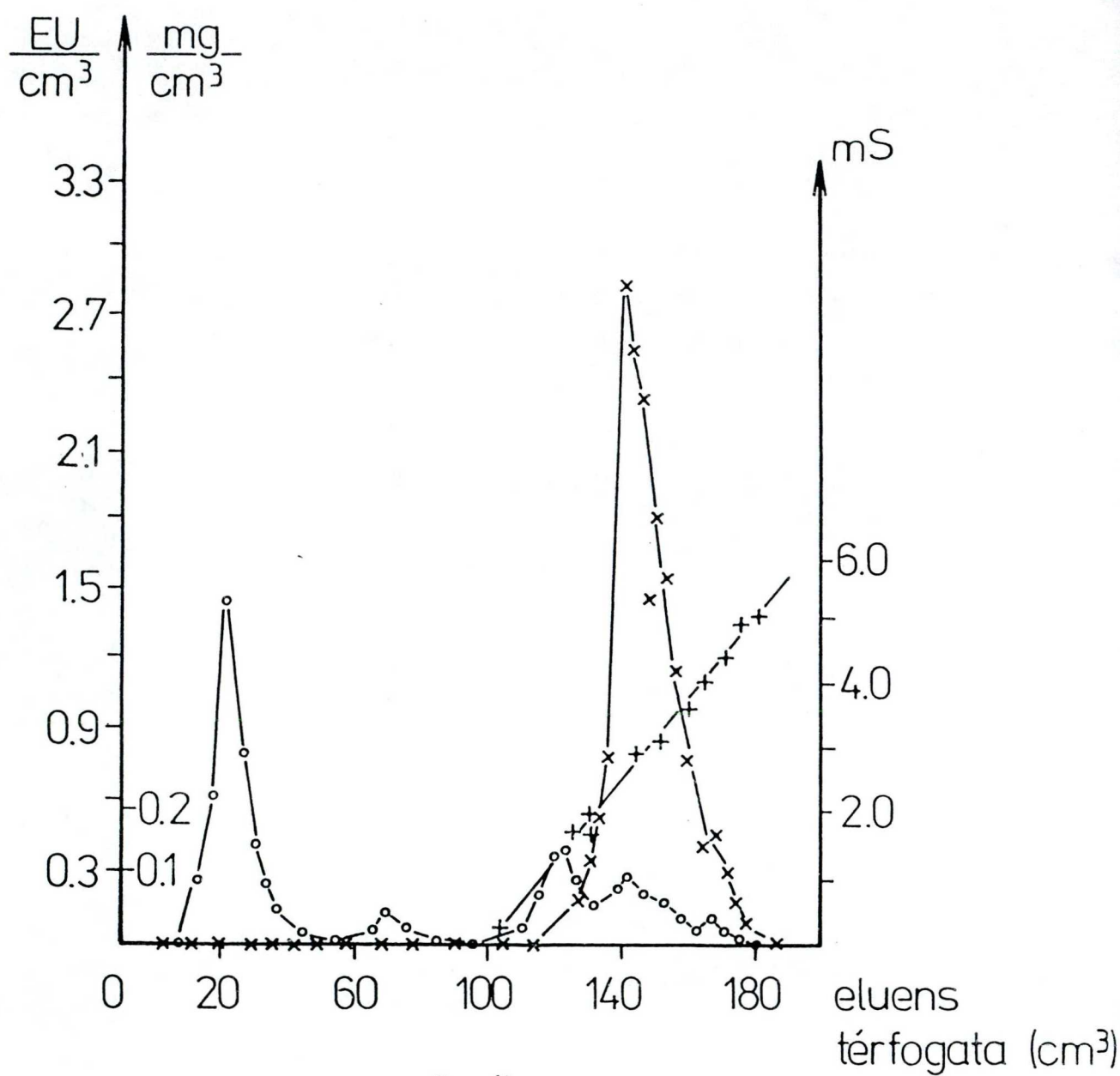
Hexokináz tisztítása DEAE-cellulóz oszlopon

Oszlopméret: 1,68 x 6 cm

Felvitt minta aktivitása: 24,57 EU / 27,6 mg fehérje /

x — x aktivitás /EU/cm³/

o — o fehérje /mg/cm³/



7. ábra

Hexokináz tisztítása DEAE-cellulóz oszlopon

Oszlopméret: 1,4 x 6,3 cm

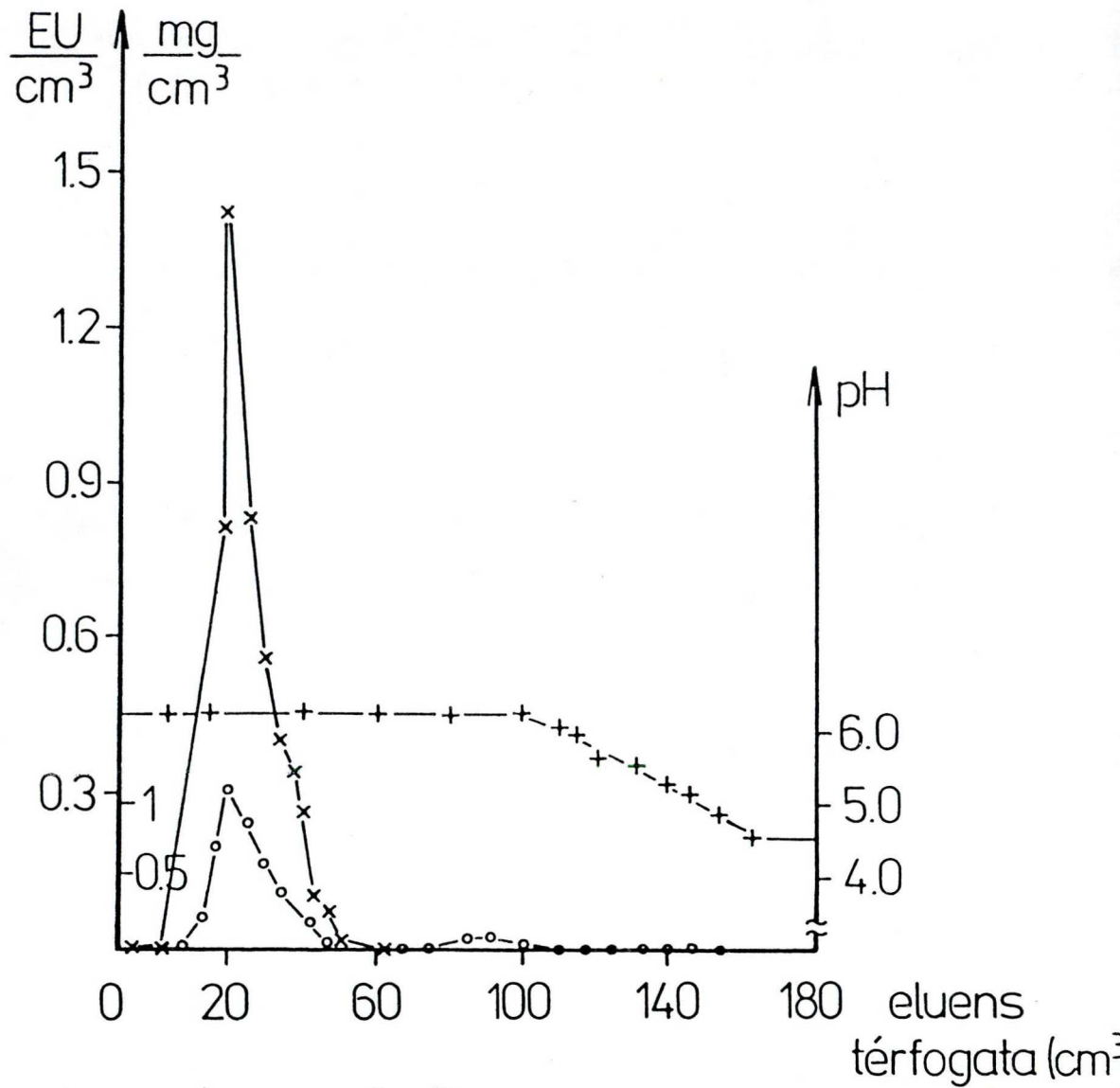
Felvitt minta aktivitása: 17,5 EU /16,4 mg fehérje/

x — x aktivitás EU/cm^3

o — o fehérje mg/cm^3

+ — + vezetőképesség mS/





8. ábra

Hexokináz tisztítása CM-cellulóz oszlopon

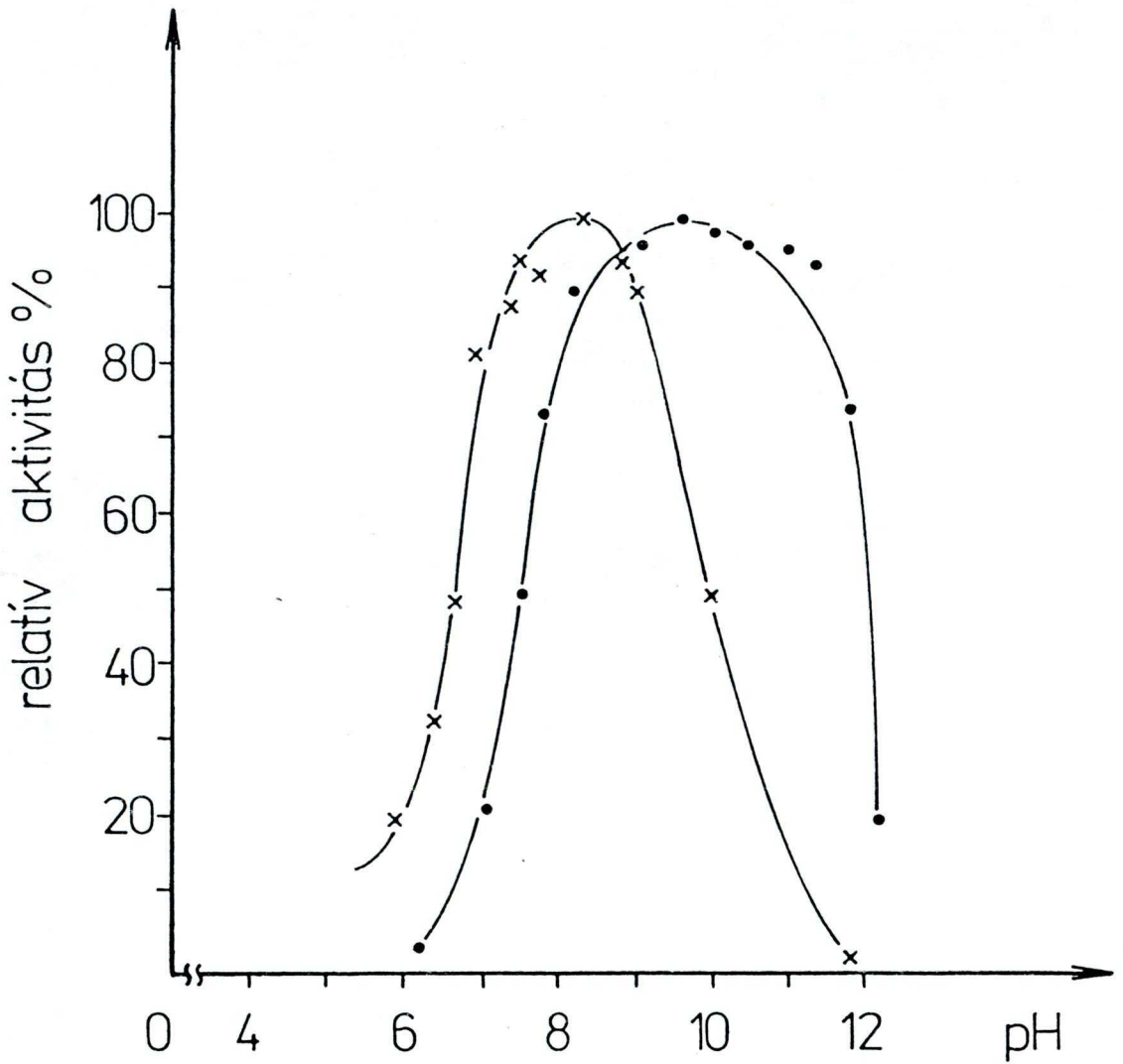
Oszlopméret: 1,6 x 5,3 cm

Felvitt minta összaktivitása: 17,02 EU /16,4 mg fehérje/

x — x térfogataktivitás /EU/ cm^3 /

o — o fehérje /mg/ cm^3 /

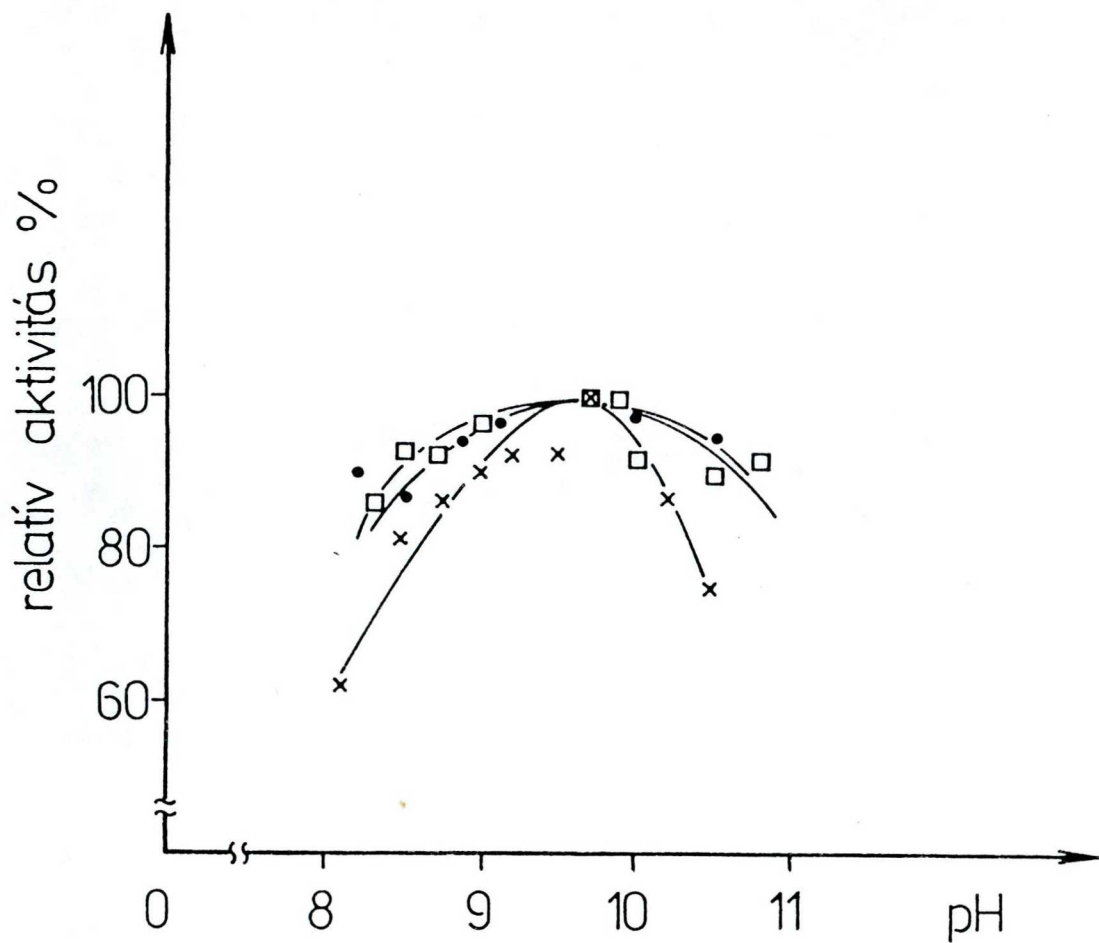
+ — + pH



9. ábra

A hexokináz aktivitásának pH függése/0,1 M koncentrációju átfedő pufferekben, szobahőmérsékleten/

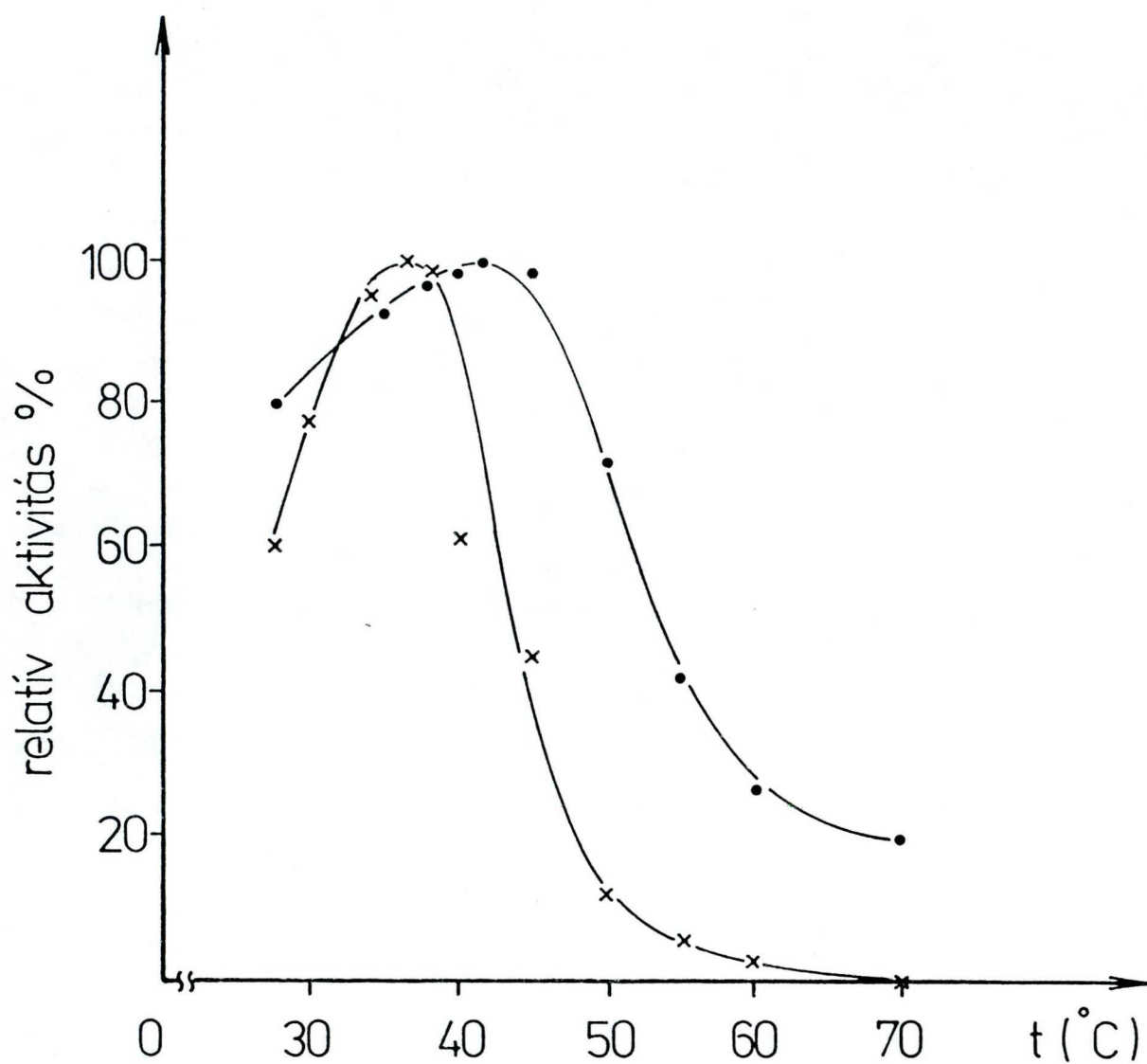
- x—x oldott hexokináz
•—• rögzített hexokináz



10. ábra

A rögzített hexokináz aktivitásának változása a pH függvényében - különböző ionerősségű pufferekben

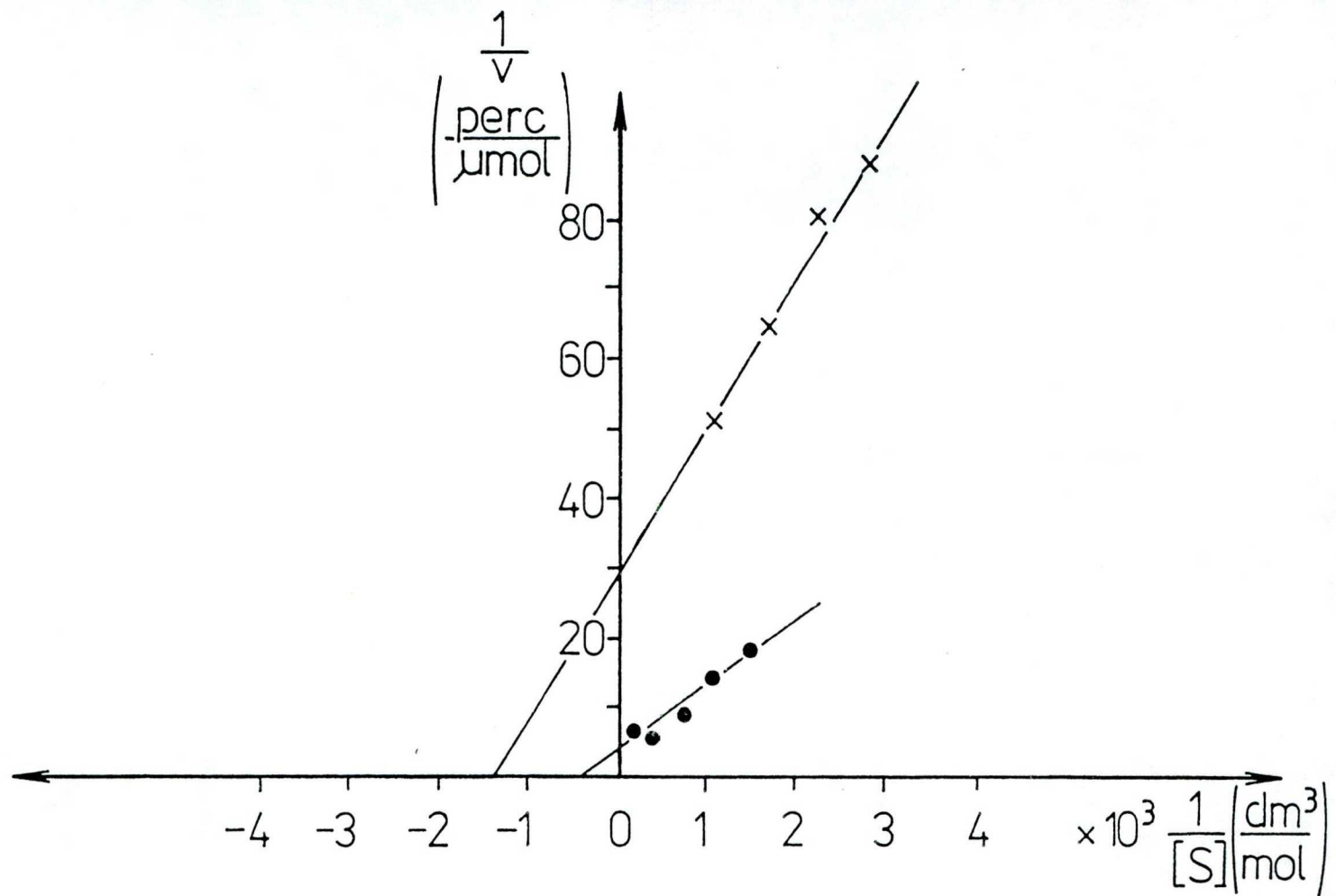
- x—x** 0,02 M TRIS/HCl, illetve glicil-glicin puffer
- 0,1 M TRIS/HCl, illetve glicil-glicin puffer
- 0,2 M TRIS/HCl, illetve glicil-glicin puffer



11. ábra

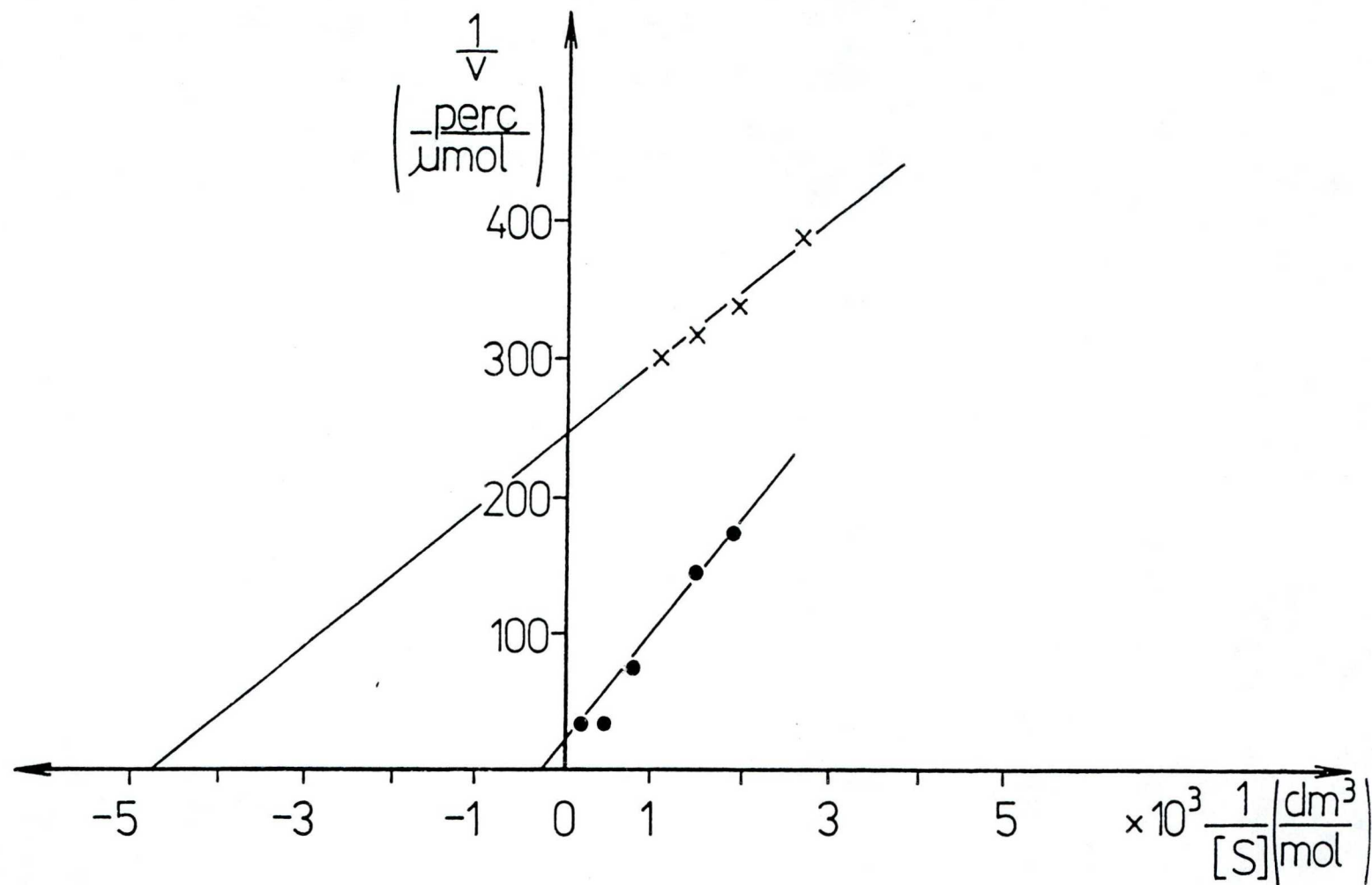
Hőmérséklet hatása az oldott és a rögzített hexokináz aktivitására

x—x oldott hexokináz
●—● rögzített hexokináz



12. ábra

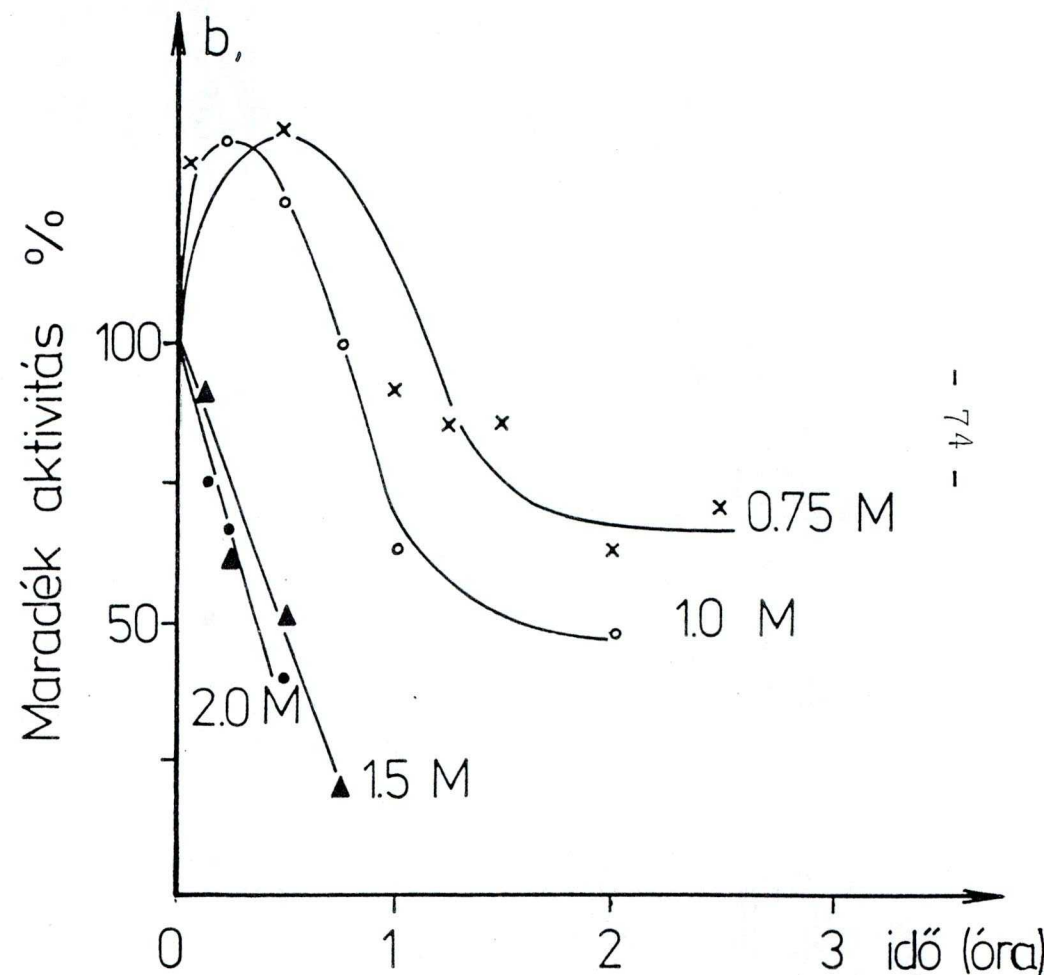
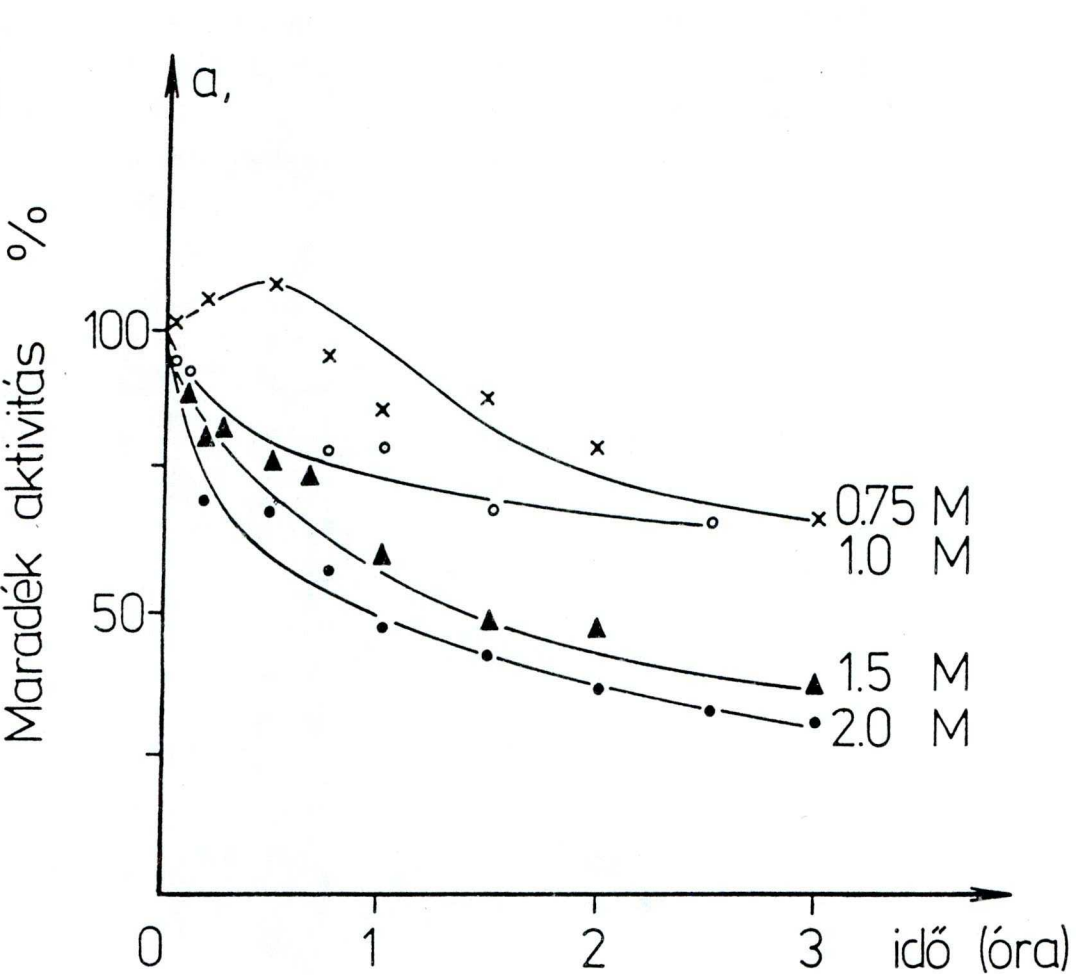
K_m és $v_{\max}$ meghatározása oldott hexokináz esetén x — x ATP, • — • D-glükóz



13. ábra

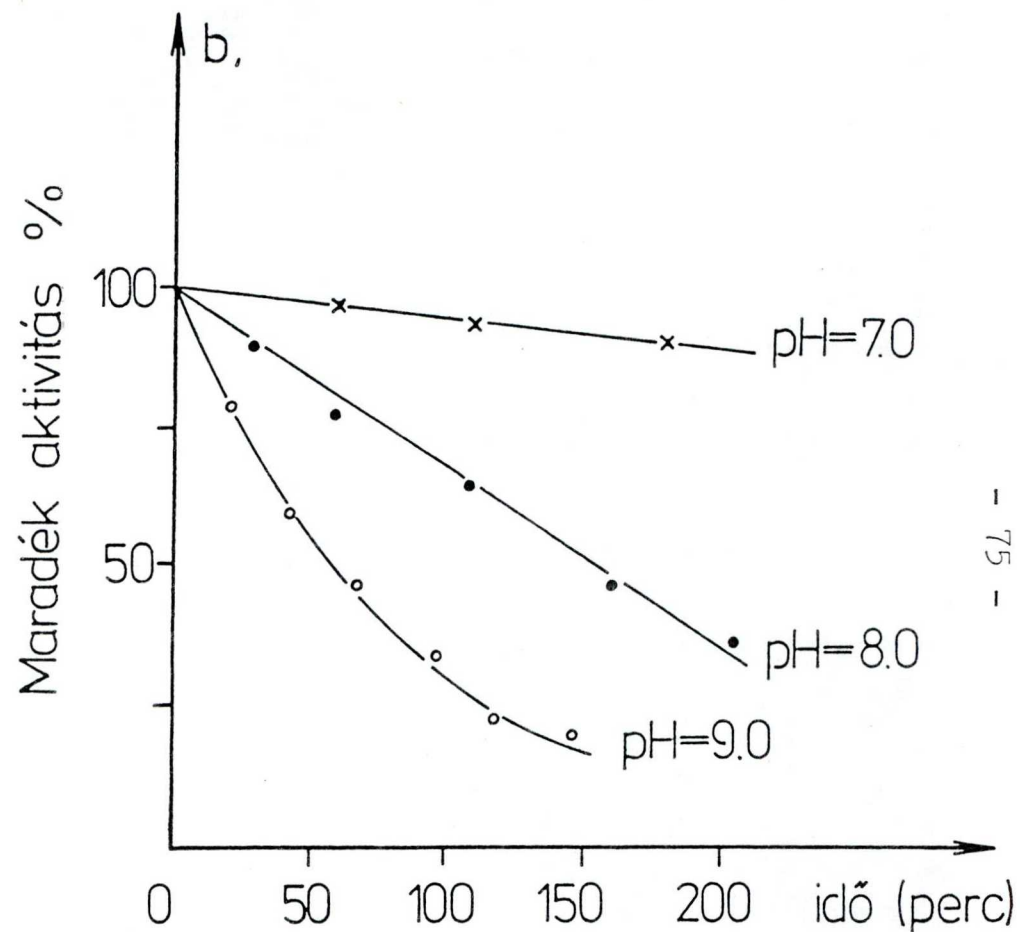
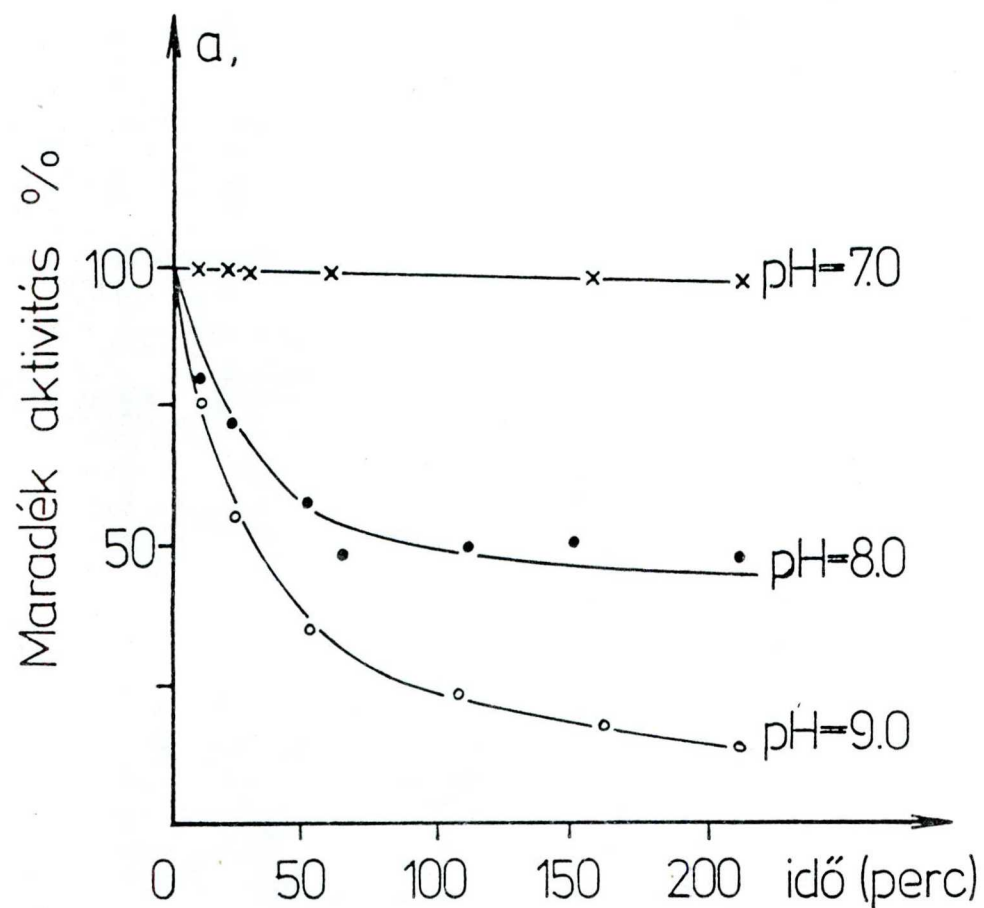
K_M és $v_{\max}$ meghatározása rögzített hexokináz esetén

x—x ATP, ●—● D-glükóz



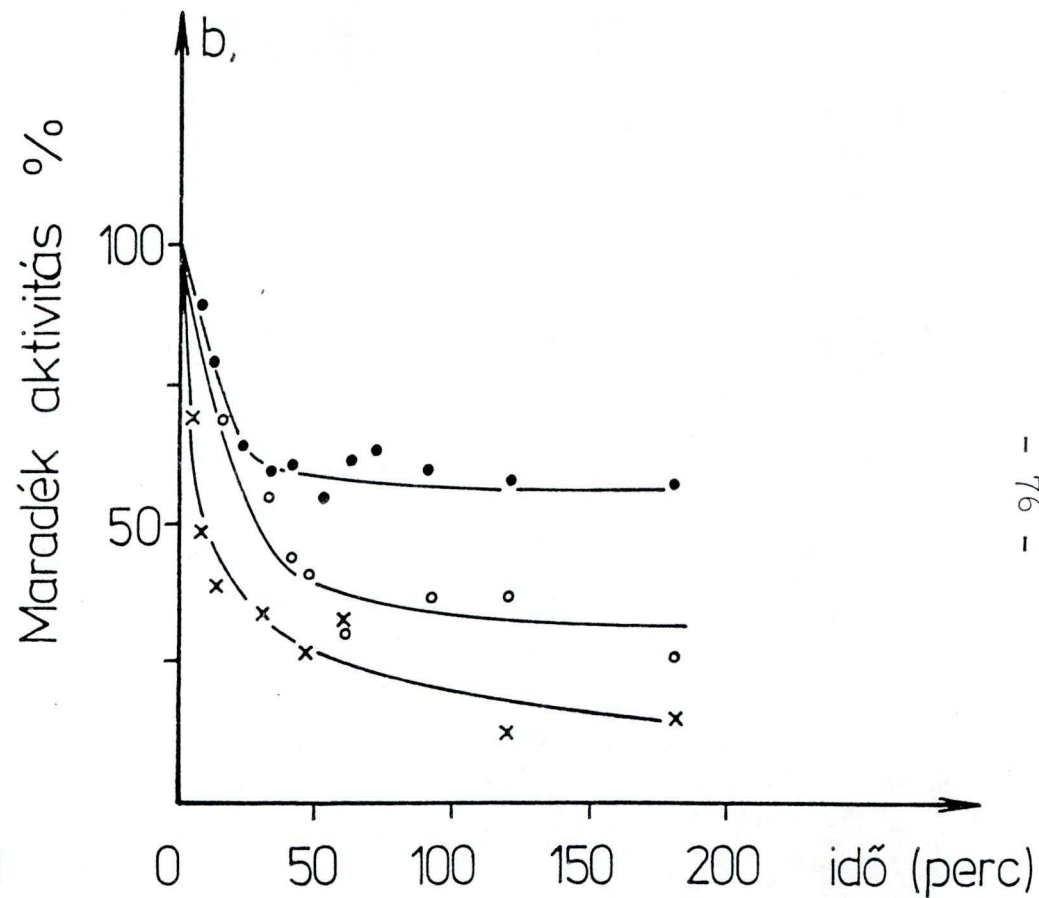
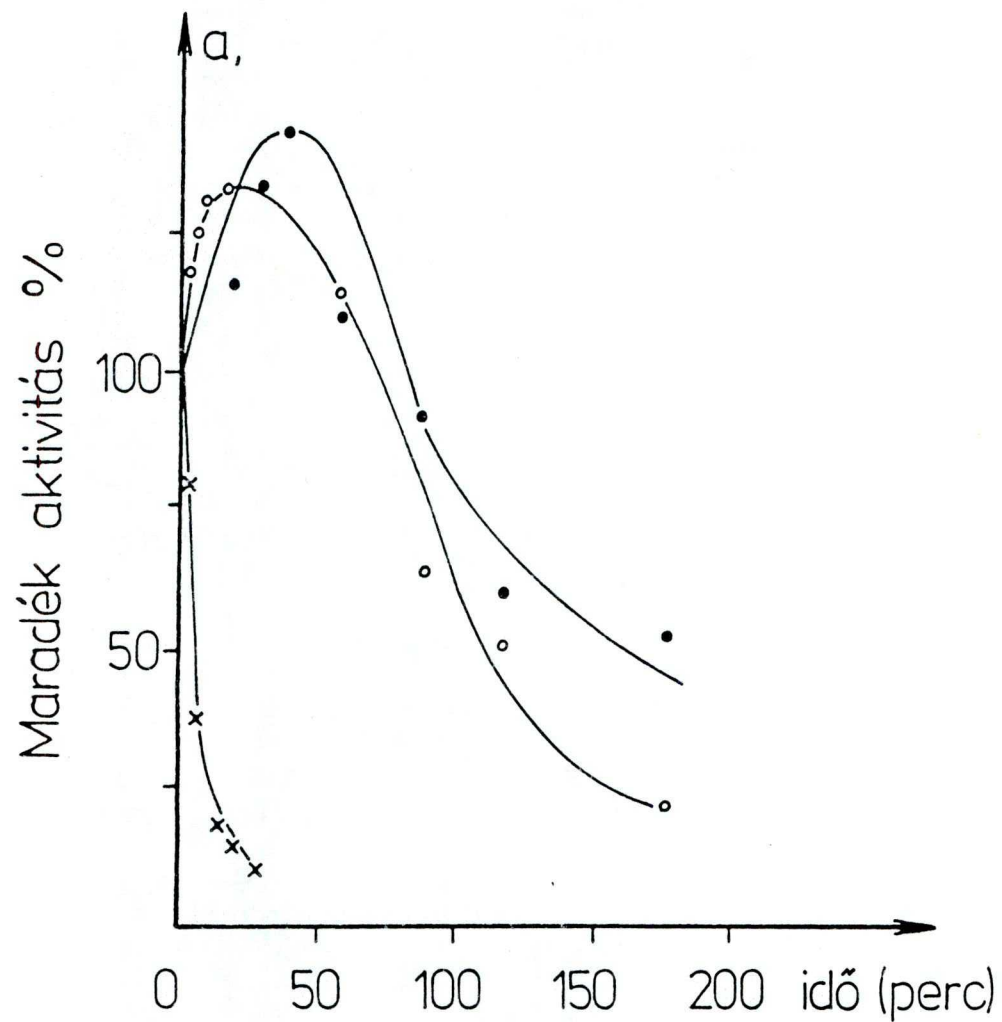
14. ábra

Urea hatása a hexokináz aktivitására /szobahőmérsékleten/ 0,1 M TEA pufferben /pH = 7,6/
a./ oldott, b./ rögzített enzim



15. ábra

A hexokináz pH stabilitásának változása - különböző pH-n 0,1 M TRIS/HCl pufferben /szoba-hőmérsékleten/ a./ oldott, b./ rögzített enzim esetén



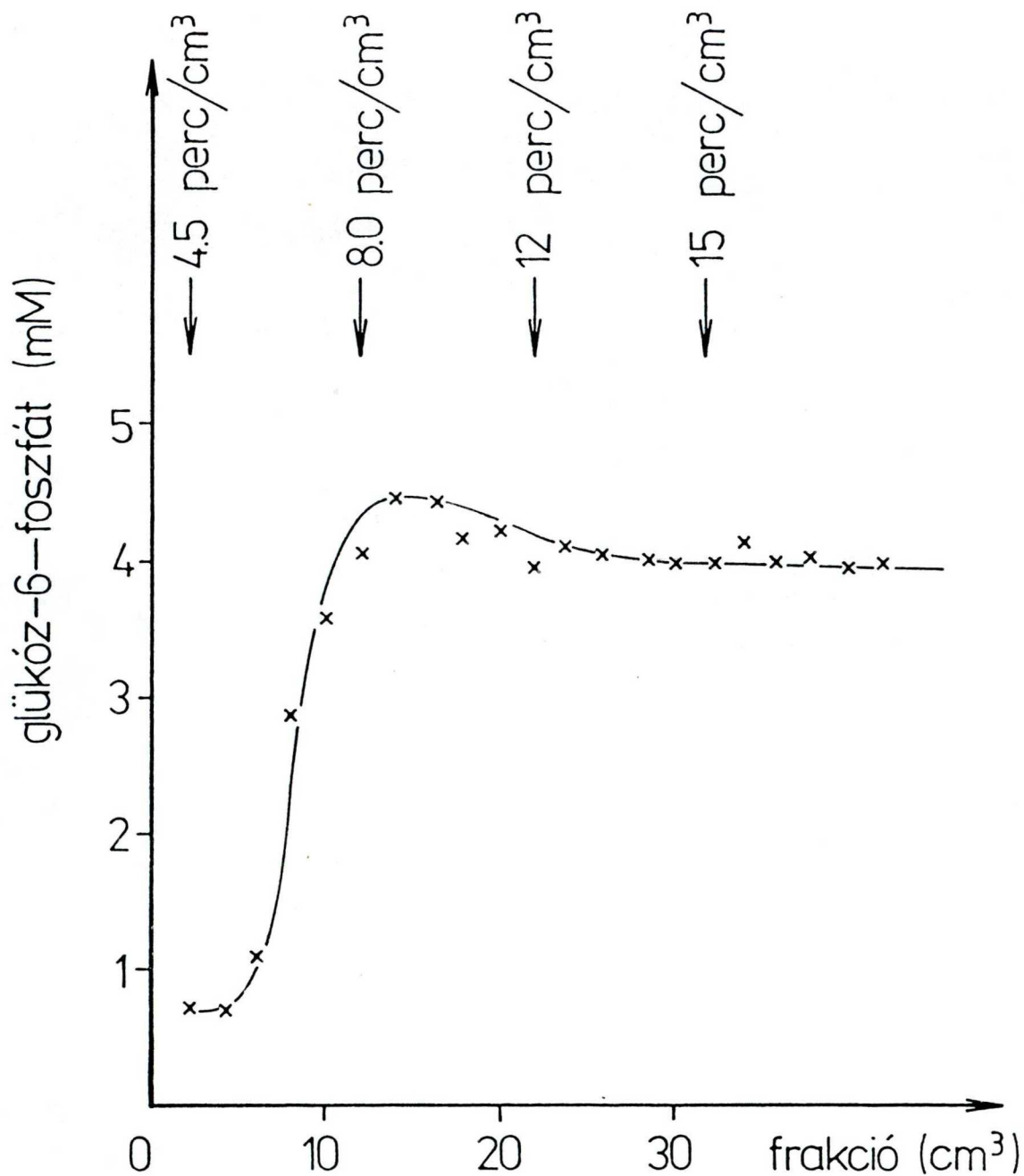
16. ábra

A hexokináz hőinaktiválódása 0,1 M TEA pufferben pH= 7,6 a./ oldott, b./ rögzített enzim

40 °C ● — ●

45 °C ○ — ○

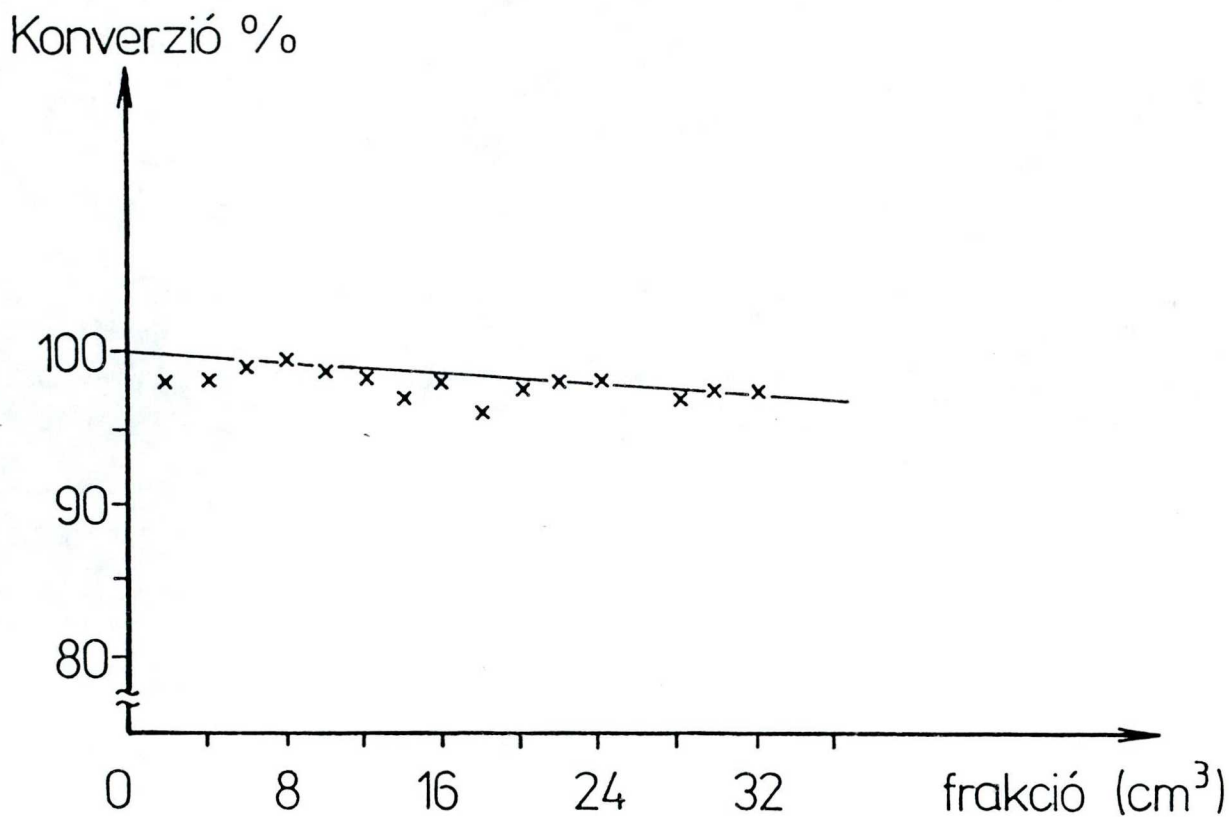
50 °C × — ×



17. ábra

Az átfolyási sebesség vizsgálata Akrilex C-100 gélhez
rögzített hexokináz-oszlopn /25 °C-on/

Oszlopméret: 1,2 x 7 cm

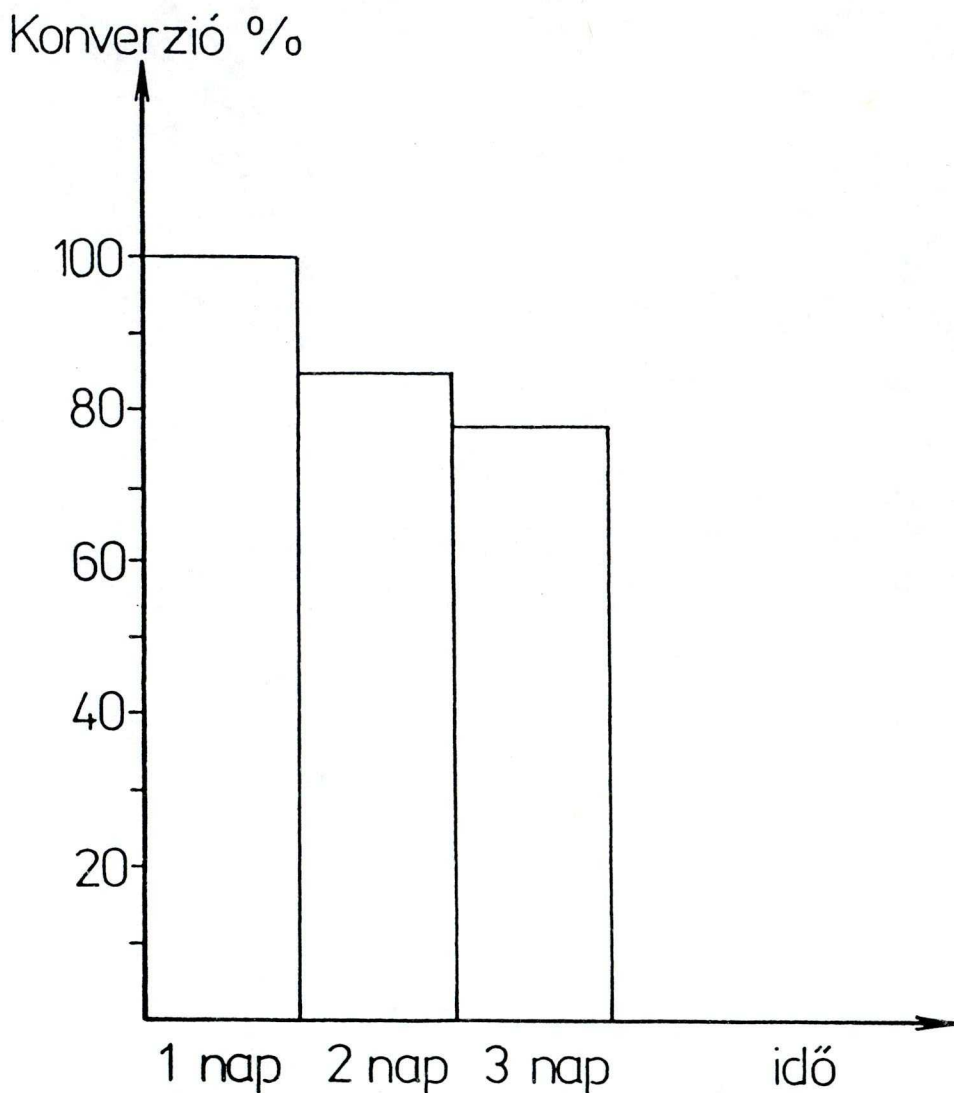


18. ábra

Az Akrilex C-100 gélhez rögzített hexokináz-oszlop működési stabilitásának vizsgálata 24 °C-on

Oszlopméret: 0,8 x 3 cm

átfolyási sebesség: 15 perc/cm³ reakcióelegy /pH = 9,0/



19. ábra

Az Akrilex C-100 gélhez rögzített hexokináz-oszlop működési stabilitásának meghatározása 24 °C-on

oszlopméret: 0,8 x 3 cm

átfolyási sebesség: 15 perc/cm³ reakcióelegy /pH = 9,0/



4. táblázat

Különböző feltárások összevetése

Feltárás módja szá- ritott élesztőből	EU/mg	EU/g szári- tott élesztő:	mg fehérje/g száritott élesztő
0,2 M Na_2HPO_4 /13/			
37 °C 3 ^h	0,37	15,5	42
0,2 M Na_2HPO_4			
37 °C 12 ^h	0,3	10,7	36
0,2 M Na_2HPO_4			
37 °C 24 ^h	1.35	15,0	11
0,5 M NH_3 /49/			
37 °C 24 ^h	0,91	6,5	7
Toluollal	0,28	97,7	344
Toluollal /31/ /friss élesztőből/	0,63	3,6	5,8
Üveggyönggyel	0,14	7,6	54
Homokkal	0,09	6,2	72,1
Toluol + 0,2 M Na_2HPO_4 37 °C 3 ^h	0,3	14,2	48,5
Toluol + 0,1 M citrát puffer /pH = 6,3/ 37 °C 3 ^h	0,46	15,5	34,1

5. táblázat

A specifikus aktivitás és a kitermelés változása az ammónium-szulfátos telítés függvényében

/NH ₄ / ₂ SO ₄ -s telítés %	Specifikus aktivitás EU/mg		Kitermelés %	
	pH = 6,0	pH = 7,0	pH = 6,0	pH = 7,0
<u>a.:</u> csapadékban				
-	0,14	0,14	100	100
40 - 50	0,485	0,33	26	23
50 - 60	0,32	0,335	25	25
60 - 70	0,30	0,38	17,5	18
<u>b.:</u> felüluszóban				
0 - 40	0,073	0,055	47	37
40 - 50	0,18	0,145	44	38
50 - 60	0,21	0,105	16	20
60 - 70	0,075	0,06	6	4

A specifikus aktivitás és a kitermelés változása MET és D-glükóz jelenlétében az ammónium-szulfátos telítés csapadékaiban

/NH ₄ /2SO ₄ -es telítés %	<u>Specifikus aktivitás /EU/mg/</u>			<u>Kitermelés /%/</u>		
	100 mM D-glükóz	20 mM MET	100 mM D-glükóz + 20 mM MET	100 mM D-glükóz	20 mM MET	100 mM D- glükóz + 20 mM MET
-	0,2	0,14	0,14	100	100	100
0 - 30	0,41	0,32	0,31	5	2,5	5
30 - 40	0,34	0,37	0,27	17	12	5,5
40 - 50	0,53	0,54	0,6	36,5	27	22
50 - 60	0,46	0,41	0,53	38	28	25
60 - 70	0,2	0,28	0,46	14	19	13,5

Hexokináz tisztítása pékélesztőből

/33 g szárított élesztőre vonatkozik az anyagmérleg/

Tisztítási lépés	Frakció térfogata /cm ³ /	összakti-vitás / Σ EU/	Kitermelés /%/	Össz-fe-hérje / Σ mg/	Spec. aktivitás /EU/mg/	Tisztulás
Feltárás /toluol+0,1 M citrát puffer pH = 6,1/	40	540	100	1113	0,485	1
65 %-os /NH ₄ /2SO ₄ -os telítés csapadék	6	179	33	242	0,74	1,53
Dializált enzim	11	324	60	179,5	1,8	3,72
DEAE-cellulóz kromatográfia	2,3	6,65	4,4	0,21	31,66	65,3

7. táblázat

Hexokináz rögzítése különböző típusu hordozókon

A táblázatban megadott értékek 1 g száraz gélre vonatkoznak

Hordozók	Rögzítéshez használt				Rögzített				A felülszóban és a mósókban maradt aktivitás		Aktivitás-veszteség		Rögzített enzim specifikus aktivitása EU/mg rögzített fehérje	
	fehérje		enzimaktivitás		fehérje		aktivitás							
	mg	%	EU	%	mg	%	EU	%	EU	%	EU	%		
Akrilex C-100	26,2	100	300	100	10,2	38,9	31,5	10,5	178,2	59,4	90,3	30,1	3,1	27
CNBr aktívált Sepharose 4B	53,4	100	202	100	4,2	7,9	2,0	1,0	131,2	65,0	68,8	34,0	0,48	12,6
CH Sepharose 4B	80,0	100	220	100	-	-	3,4	1,5	66,0	30,0	150,6	68,5	-	-
Szilokrom-aldehid	100	100	60	100	31,5	31,5	0,1	0,2	52,0	86,6	7,9	13,2	0,003	0,53
Poliakrilamid gélbe történt bezárás	23,6	100	15	100	15,0	63,7	1,73	11,5	0,1	0,66	13,2	88,0	0,12	18,8

Hexokináz rögzítése Akrilex C-100 típusu hordozóhoz
különböző pufferek jelenlétében

Rögzítési körülmények	Rögzített		A felülu- szókban és a mosókban maradt ak- tivitás %	Aktivitás vesztesség %	Rögzített enzim aktivitása <u>EU</u> mg rögzített fe- hérje
	fehérje %	aktivitás %			
Imidazol/HCl 0,1 M pH = 7,0	6,8	7,5	68	24,5	2,65
TRIS/HCl puf- fer, 0,1 M pH = 7,0	39	10,5	59	30,5	2,1
20 mM ciszte- in tartalmu TRIS/HCl puf- fer, 0,1 M pH = 7,0	3,4	55	42	3	10,56
Foszfát puf- fer, 0,1 M pH = 7,0	80,4	12,3	68,1	19,6	0,22

9. táblázat

10. táblázat

Az oldott és a rögzített hexokináz
kinetikai jellemzői

Szubsztrát	Michaelis-állandó K_M /mM/		V_{max} / $\mu\text{mol}/\text{perc}/$	
	Oldott enzim	Rögzített enzim	Oldott enzim	Rögzített enzim
ATP	0,74	0,21	$3,45 \times 10^{-2}$	$4,1 \times 10^{-3}$
D-glükóz	1,92	6,06	$2,5 \times 10^{-1}$	$7,14 \times 10^{-2}$

Rögzített hexokináz tárolási stabilitása 4 °C-on

Idő /nap/	Maradék aktivitás %		
	0,1 M TEA puffer pH = 7,6	0,1 M TEA puffer pH = 7,6 + 2 mM glükóz-6-foszfát	0,1 M TEA puffer pH = 7,6 + 2 mM ATP
0	100	100	100
1	96	111	170
2	48	80	91
3	33	71	61
4	32	-	39
5	-	59	38
6	24	-	16
7	15	54	10
8	7	-	6

IX. IRODALOM

- 1./ Affinity Chromatography - principles - methods /1979 - 1/
Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden
- 2./ Anderson, C. M., Stenkamp, R. E., McDonald, R. C.,
Steitz, T. A.:
J. Mol. Biol. 123, 207-219 /1978/
- 3./ Bergmeyer, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse
1, 624
Verlag Chemie GMBH, Weinheim/Bergstr. /1970/
- 4./ Bohnensack, R., Augustin, W., Hofmann, E.:
Experientia 25, 348-349 /1969/
- 5./ Boyer, D. P.: The Enzymes 9, 1-48
Acad. Press, New York-London /1973/
- 6./ Britton, H. G., Clark, L. B.:
Biochem. J. 128, 104 p /1972/
- 7./ Broun, G., Thomas, D., Gellf, G., Domurado, D.,
Berjonneaut, Guillon, C.:
Biotechnol. Bioeng. 15, 359-375 /1973/
- 8./ Brown, H. D., Patel, A. B., Chattopadhyay, S. K.:
J. Chromatogr. 35, 103-105 /1968/
- 9./ Campbell, J., Chang, T. M. S.:
Biochim. Biophys. Acta 397, 101-109 /1975/
- 10./ Chibata, I.: Immobilized Enzymes
Halsted Press, Kodansha, Tokyo /1978/

- 11./ Coulet, P. R., Julliard, J. H., Gautheron, D. C.:
Biotechnol. Bioeng. 16, 1055-1068 /1974/
- 12./ Craven, P. A., Basford, R. E.:
Biochim. Biophys. Acta 255, 620-630 /1972/
- 13./ Darrow, R. A., Colowick, S. P.: in Methods in
Enzymology 5, 226
Acad Press, New York /1962/
- 14./ Easterby, J. S., Rosemeyer, M. A.:
Eur. J. Biochem. 28, 241-252 /1972/
- 15./ Elődi P.: Biokémia 444
Akadémiai Kiadó, Budapest /1980/
- 16./ Fletterick, R. J., Dates, D. J., Steitz, T. A.:
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 38-42 /1975/
- 17./ Fuente, G. D., Sols, A.:
Biochem. J. 89, 36 /1963/
- 18./ Gauch, R., Leuenberger, U., Baumgartner, E.:
J. chromatogr. 174, 195-200 /1974/
- 19./ Gazith, J., Schulze, I. T., Gooding, R. H., Womack,
F. C., Colowick, S. P.:
Ann. New York Acad. Sci. 151, 307-331 /1968/
- 20./ Gestrelus, S., Mattiason, B., Mosbach, K.:
Eur. J. Biochem. 36, 89-96 /1973/
- 21./ Goldstein, L., Manecke, G. in Immobilized Enzyme
Principles I 23-80
Acad. Press, New York /1976/

- 22./ Gray, A. J. W., Barron, N. M., Barnard, E. A.:
Bioscience Reports 3, 963-971 /1983/
- 23./ Kaji, A.:
Biochim. Biophys. Acta 122, 43-56 /1966/
- 24./ Kenkare, U. W., Colowick, S. P.:
J. Biol. Chem. 240, 4570-4583 /1965/
- 25./ Kohn, J., Wilchek, M.:
Enzyme Microbiol. Technol. 4, 161-163 /1982/
- 26./ Kovács K., Szajáni B., Boross L.:
J. Appl. Biochem. 4, 11-18 /1982/
- 27./ Lazarus, N. R., Derechin, M., Barnard, E. A.:
Biochemistry 7, 2390 /1968/
- 28./ Lazarus, N. R., Ramel, A. H., Rustum, Y. M.,
Barnard, E. A.:
Biochemistry 5, 4003 /1966/
- 29./ Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L.,
Randall, R. J.:
J. Biol. Chem. 193, 265 /1951/
- 30./ Luca, M., Kricka, L. J.:
Arch. Biochem. Biophys. 226, 285-291 /1983/
- 31./ McDonald, M. R. in Methods in Enzymology 1 269-276
Acad Press, New York /1955/
- 32./ Meunier, J. C., Buc, J., Ricard, J.:
FEBS Lett. 14, 25-28 /1971/

33./ Meyerhof, O.:

Biochem. Z. 183, 176 /1927/

34./ Morris, D. L., Campbell, J., Hornby, W. E.:

Biochem. J. 147, 593-603 /1975/

35./ Morvay J., Szabó A.: Bevezetés a klinikai kémiába

Szeged, /1981/

36./ Mosbach, K., Mattiason, B.:

Acta Chem. Scand. 24, 2093-2100 /1970/

37./ Mosbach, K., Mattiason, B.:

Biochim. Biophys. Acta 235, 253-257 /1971/

38./ Pollack, A., Blumenfeld, H., Wax, M., Baughn, R. L.,

Whitesides, G. M.:

J. Am. Chem. Soc. 102, 6324-6335 /1980/

39./ Redkar, V. D., Kenkare, U. W.:

J. Biol. Chem. 247, 7576-7584 /1972/

40./ Reeves, R. E., Montalvo, F., Sillero, A.:

Biochemistry 6, 1752 /1967/

41./ Ruiz-Amil, M., Sols, A.:

Biochem. Z. 334, 168 /1961/

42./ Rustum, Y. M., Ramel, A. H., Barnard, E. A.:

Prep. Biochem. 1 309 /1971/

43./ Ryan, E., Fottvell, P. F.:

FEBS Lett. 23, 73-76 /1972/

- 44./ Schacterle, G. R., Pollack, R. L.:
Anal. Biochem. 51, 654-655 /1973/
- 45./ Schmidt, J. J., Colowick, S. P.:
Arch. Biochem. Biophys. 158, 471-477 /1973/
- 46./ Schmidt, J. J. Ph. D. Thesis, Vanderbilt University
/1971/
- 47./ Schulze, I. T., Colowick, S. P.:
J. Biol. Chem. 244, 2306 /1969/
- 48./ Schulze, I. T., Gazith, J., Gooding, R. H. in
Methods in Enzymology 9 376
Acad Press, New York /1966/
- 49./ Scopes, R. K.:
Biochem. J. 122, 89-92 /1971/
- 50./ Sebastian, J., Asensio, C.:
Arch. Biochem. Biophys. 151, 227-233 /1972/
- 51./ Shoham, M., Steitz, T. A.:
J. Mol. Biol. 140, 1-14 /1980/
- 52./ Smith, N. L., Lenhoff, H. M.:
Fed. Proc. 30, Abstr. 1072 /1971/
- 53./ Sundaram, P. V., Crook, E. M.:
Can. J. Biochem. 49, 1388 /1971/
- 54./ Thang, M. N., Graffe, M., Grunberg-Manago, M.:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 31, 1-8 /1968/
- 55./ Wilson, J.E.:
Arch. Biochem. Biophys. 154, 332-340 /1973/
- 56./ Zaborsky, O. R.: Immobilized Enzymes
CRC, Press, Cleveland, USA /1973/

Köszönetet mondok Dr. Boross László egyetemi tanárnak, a Biokémia Tanszék professzorának, hogy érdeklődésemet a biokémia felé irányította és dolgozatom elkészítését lehetővé tette.

Köszönöm dr. Lehoczki Endréné dr. Simon Mária egyetemi adjunktusnak, hogy munkámat figyelemmel kísérte, irányította és tanácsaival segített.

Köszönöm dr. Szajáni Béla c. egyetemi docensnek az elméleti és gyakorlati problémák megoldásában nyújtott sok segítségét, tanácsait.

Köszönöm Brulichné Balázs Ágnes laboránsnak a kísérleti munkában nyújtott segítségét.

Köszönöm Bellér Éva laboránsnak az ábrák gondos elkészítését.

Köszönet illeti mindazokat, akik tanácsaikkal segítettek, tapasztalataikkal gazdagítottak, illetve munkám objektív feltételeit igyekeztek biztosítani.