

OLDOTT ÉS RÖGZITETT ALDOLÁZ ELŐÁLLÍTÁSA ÉS JELLEMZÉSE

Egyetemi doktori értekezés

Készítette: Horváth Lóránt

JATE Biokémiai Tanszék

1986



1. BEVEZETÉS

A gyakorlati életben, például a laboratóriumi diagnosztikában illetve az iparban gyakran válik szükségessé anyagcsere termékek koncentrációjának folyamatos mérése, előállításuk vagy átalakításuk. Ezek a feladatok rögzített enzimek alkalmazásával viszonylag egyszerűen, gyorsan és gazdaságosan valósíthatók meg. A rögzített enzimek legfontosabb tulajdonsága, hogy vízben nem oldódnak és ezáltal egyszerű fizikai módszerekkel elkülöníthetők az egymásra ható anyagokat és végterméket tartalmazó oldattól, ezért lehetővé válik az enzim ismételt felhasználása, ami a költségeket nagyban csökkenti. Az enzimek különféle típusu és funkciós csoportokkal rendelkező hordozókhoz sokféleképpen rögzíthetők a felhasználási célhoz igazodva. A rögzített enzimek egyszerűen és biztosan kezelhetők, ami lehetővé teszi a folyamatok automatizálását is. Számos módszert dolgoztak ki a különféle enzimek rögzítésére. Általános követelmény a kötés jó hatásfoka és a nagy stabilitás.

Munkánk során a fruktóz-1,6-difoszfát aldoláz /fruktóz-1,6-difoszfát-D-gliceraldehid-3foszfát liáz; EC.4.1.2.13./ - régi és ma már kevésbé használatos nevén a zimohexázt - kötöttük kovalens kötésekön keresztül különböző típusu szerves

és szervetlen alapanyagu hordozókhoz. A rögzítésre kerülő enzim előállításához sikerült egy - a nyul-vázizomból történő izolálásra leírt /1/ - módszert úgy módosítanunk, hogy az aldolázt a jóval olcsóbb és nagyobb mennyiségben beszerezhető sertés-vázizomból állíthassuk elő. A nyulizomból izolált enzimmel összehasonlítva a sertés-izom aldoláz stabilabbnak mutatkozott, így a rögzítés során jelentkező kémiai hatásának is jobban ellenállt. A rögzített aldoláz fruktóz-1,6-di-foszfát folyamatos mérésére, valamint triozfoszfátok /glicer-aldehid-3-foszfát és dihidroxiaceton-foszfát/ előállítására használható fel.

TARTALOM

- I. BEVEZETÉS
- II. RÖVIDÍTÉSEK
- III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS
- IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK
- V. EREDMÉNYEK
- VI. MEGVITATÁS
- VII. ÖSSZEFOGLALÁS
- VIII. ÁBRÁK
- IX. IRODALOM

II. RÖVIDÍTÉSEK

CMC	= 1-cyclohexyl-3-/2morpholinoethyl/ carbodiimid metho-p-touolsulfonat
DHAP	= dihidroxiaceton-foszfát
DNPH	= dinitrofenil-hirazin
FDP	= fruktoz-1,6-difoszfát
FLP	= fruktóz-1-foszfát
GA3P	= gliceraldehyd-3-foszfát
GAPD	= gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
GDH	= glicerol-3-foszfát dehidrogenáz
SDS	= nátrium-dodecil-szulfát
TIM	= triózfoszfát izomeráz
TEMED	= N,N,N',N'-tetrametiléndiamin

III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. Enzim-rögzítési módszerek

Az enzimek sokfélesége ellenére csak kevés enzimet használnak ipari folyamatok katalizátoraként. Az enzimek felhasználhatóságát ugyanis csökkenti, hogy izolálásuk költséges, a reakció végén szennyezőanyagként szerepelnek és nem, vagy csak nehezen /pl. ultraszűréssel/ nyerhetők vissza a reakcióelegyből. Az egyensúly beállta után a reakció gyakorlatilag befejezettnek tekinthető, így a folyamatos és ezáltal kellően gazdaságos üzem nem valósítható meg. Ezen problémák kiküszöbölésére célszerű szilárd fázisba átvinni az enzimet. Az előállított oldhatatlan illetve rögzített enzimek katalitikus aktivitásukat megőrzik és folyamatosan felhasználhatók /2/. A rögzített enzimek előnyei a következők:

- ismételt felhasználhatóság, amelynek révén a fajlagos költség csökkenthető;
- megnövekedett stabilitás;
- az esetleges szubsztrát vagy termékátlás megszűnik;
- az enzim nem szennyezi a reakcióelegyet a reakció végén;
- jól ellenőrizhető a katalitikus reakció;
- katalitikus sorozatreakciók is megvalósíthatók;
- folyamatos üzem valósítható meg.

A rögzített enzimek azonban nemcsak az ipart gazdagíthatják új technológiákkal, hanem új típusú modellrendszerként szolgálhatnak a sejtek különböző felületein megkötött enzimek működésének vizsgálatához is.

A kötőerők természete alapján a rögzítéshez használt módszereket két fő csoportba sorolhatjuk: a fizikai és a kémiai kötések csoportjába. Általános követelmény, hogy a kötési reakció során az enzim rögzített állapotban is megőrizze aktivitását, aminek az a feltétele, hogy az enzim natív térszerkezete ne változzon meg jelentősen.

Tisztán fizikai módszerek alkalmazása során az enzimet egy szemipermeábilis gélből készült rácsba zárjuk, vagy egy ilyen tulajdonságokkal rendelkező polimer membránnal vesszük körül. A fehérjemolekula nem vesz részt a vizoldhatatlan struktúra kialakításában, a gél szerkezet azonban megakadályozza a környezetbe való diffúzióját és a szubsztrát molekula akadálytalanul juthat az enzimhez. A módszer elsősorban kis molekulatömegű szubsztrátokkal működő enzimek immobilizálására alkalmas a diffúziós gát miatt. A legelterjedtebb technika a poliakrilamid gél térhálójába zárás /3-4/. A gél alkalmas arra, hogy meghatározott méretű szemcsékké aprítsák és szuszpenzió, vagy liofilezett formában tárolják /5/. A Snam Progetti olasz cég laboratóriumában kifejlesztett módszer szerint cellulóz-triacetátból, etil-cellulózból vagy PVC-ből készült üreges szálba zárják az enzimet /6/.

A másik elterjedt technika a mikrokapszulázás, melynek során diamin és adipoilklorid polimerizál a szerves oldószer

és az enzimet tartalmazó vizes fázis határán az enzim-molekulákat poliamid membránba zárva /7,8/. Ez utóbbi módszerrel több enzimet összehozva azok kölcsönhatásai is tanulmányozhatók, modellezve a sejten belüli kölcsönhatásokat, továbbá - mivel a mikrokapszulákkal szemben nincs immunfolyamat - azok konkrét terápiás alkalmazásának a lehetősége is adott.

Fizikai módszer az enzimek a d s z o r p c i ó v á l történő rögzítése is. Ez a legrégebben alkalmazott módszer, mivel a szilárd hordozó előállítása és az enzim rögzítése nagyon egyszerű /3, 9-11/. A legelső rögzített enzimet is ilyen módon állították elő 1916-ban, amikor Nelson és Griffin invertázt kötött aktiv szénhez /12/. Az adszorbenst úgy kell megválasztani, hogy az enzim nagy affinitással kötődjön hozzá, de minimális denaturációval. Hordozóként alkalmazhatók különböző fémek, ioncserélő gyanták, neutrális polimerek /13-16/.

A biospecifikus vagy másnéven affinitáskromatográfia széleskörűen elterjedt enzimmtisztítási eljárás. Ha a rögzített ligand csak egyetlen molekulával szemben mutat nagy aktivitást, akkor specifikus, ha egyszerre több molekulával szemben, akkor osztályspecifikus ligandról beszélünk. A rögzített ligand szerkezetétől és funkciós csoportjaitól, valamint a fehérje molekula szerkezetétől függően ionos és hidrofób kölcsönhatások alakulhatnak ki. Ha megfelelő affinitással kötődik az enzim a ligandhoz, lehetővé válik rögzített enzimként való felhasználásuk /2/. Ez a módszer átvezet a következő csoportokhoz, a kémiai módszerekhez.



A kémiai módszer egyik változata: ionos kötések kialakításával i o n o s k o m p l e x létrehozása. Az első olyan rögzített enzimet - az aminoacilázt -, amellyel aminosav racémátokat tonnás nagyságrendben tudtak rezolválni, ilyen módon kötötték DEAE-cellulózhoz illetve DEAE-Sephadexhez /2/. A módszer előnye, hogy a hordozó regenerálható.

Kovalens módon a rögzítés történhet keresztkötések kialakításával, illetve valamilyen polimer hordozóhoz való kovalens kötéssel.

I n t r a m o l e k u l á r i s k o v a l e n s k e - r e s z t k ö t é s e k az enzim molekulák katalitikusan nem aktiv oldalláncai között hozhatók létre bi- vagy multifunkciós reagensekkel. Ilyenek például: a glutáraldehid /Schiff-bázis/, az izocianát származékok /peptidkötés/, a bisz-diazobenzidin /diazó kötés/, az N,N'-etilén-bisz-maleimid /peptidkötés/ /2/. Adszorbeált vagy bezárt enzim-molekulák között is lehet kötések kialakítani a rögzített enzim stabilitása érdekében. A módszer mégsem túl elterjedt a keletkező nagyméretű aggregátumok kedvezőtlen tulajdonságai, valamint az aktiv centrum sztérikus gátlásának nagy valószínűsége miatt.

Az enzimek valamilyen p o l i m e r h o r d o z ó - h o z való kovalens kötése a leggyakrabban alkalmazott módszerek közé tartozik. A kötés feltétele, hogy mind a hordozó, mind az enzim tartalmazzon egymással kémiai reakcióra képes csoportokat. A megfelelő eljárás kiválasztásakor minden esetben figyelembe kell venni az enzim funkciós csoportjainak típusát, valamint a hordozó reaktív csoportjainak kémiai tulajdonságait. A kovalens kötésben résztvevő fehérje funkciós csoportja nem lehet az aktivitás szempontjából esszenciális.

A kötésnek tehát az enzim molekulák katalitikus aktivitás szempontjából közömbös oldalláncai és a hordozó aktivált csoportjai között kell létrejönnie. A kapcsolási eljárások többnyire a peptidszintézis módszereivel mutatnak rokonságot és a kötés néhány esettől eltekintve - pl. a polimoleinsav-anhidrid származékokról lehidrolizálhat az enzim - irreverzibilis.

A fehérjék következő csoportjai vihetők kovalens kötésbe a polimer hordozóval:

1. a polipeptid lánc N-terminális α -amino, és a lizin ϵ -amino csoportjai
2. β és γ -karboxil csoportok, valamint a C-terminális aminosav α -karboxil csoportja
3. a tirozin fenol gyűrűje
4. a cisztein szulfhidril csoportja
5. a szerin, treonin és a tirozin hidroxil csoportjai
6. a hisztidin imidazol csoportja
7. a triptofán indol gyűrűje.

A leggyakoribbak az amino- és a karboxil csoportok, valamint a tirozin illetve a hisztidin gyűrűinek reakciói.

A kapcsolási reakcióknál leginkább térszerkezeti kritériumoknak kell teljesülniük. Természetesen az aktiv centrum létrehozásáért felelős oldalláncokat védő csoportokkal reagáltatva is megakadályozhatjuk abban, hogy részt vegyenek kovalens kötés létrejöttében. A védő csoportok a kovalens kötés létrejötte után, viszonylag könnyen eltávolíthatók /2,3/.

A kovalens rögzítési eljárásnak a legnagyobb előnye, hogy a kémiaailag kötött enzimek többsége stabilabb, mint ugyanezen enzimeknek a vizes oldata, ugyanis a megkötéssel rögzítődik az aktiv térszerkezet. Az enzim-hordozó kölcsönhatása következtében megváltozhatnak egyes enzimatisz tulajdonságok, így például az önemésztésre is képes fehérjebontó enzimek elveszthetik ezt a képességüket.

Mindez természetesen nem azt jelenti, hogy ezek a készítmények a végtelenségig megtartják aktivitásukat, hanem csak azt, hogy még vizes szuszpenzió formájában is hosszú ideig eltarthatók. Előfordul, hogy a kötött enzimek fajlagos aktivitása sokkal kisebb az oldatban levőknél, de ezt tartósan megőrzik. Az aktivitás csökkenésének az oka, hogy az enzim molekulák egy része károsodik a hordozóhoz való kötés során, ezenkívül a kötött enzimhez szterikus okok miatt esetleg nehezebben férnek hozzá a szubsztrát molekulák, mint az oldott enzimhez.

Az enzimek stabilitásának megnövelésén túl a kovalens kötések keresztüli rögzítés további előnye, hogy csak így keletkezik széles szubsztrát koncentráció tartományban alkalmazható, jól definiálható molekuláris komplexum.

A módszer eddig felsorolt előnyei miatt kovalens módon rögzítettük különböző hordozókhoz a glikolízis egyik enzimét, az FDP aldolázt /fruktóz-1,6-difoszfát-D-gliceraldehid-3foszfát liázt; EC 4.1.2.13/.

2. Az aldolázok molekuláris tulajdonságai

Az aldolázokat két osztályra különíthetjük hatásmechanizmusuk alapján /19,20/.

Az első osztályba a Schiff-bázist képező aldolázok tartoznak, melyek az állatokban, a növények túlnyomó többségében és egyes mikroorganizmusokban fordulnak elő. Az emlős szövetek aldolázai négy alegységből állnak és szervspecifikus izoenzimrendszerrel rendelkeznek. Ehhez három különböző típusu alegységet kell szintetizálni, amelyeket A, B és C-vel jelölünk, így összesen tizenkét kombináció /izoenzim/ adódik. Az egyes izoenzimek jól elkülöníthetők katalitikus, immunológiai, elektroforetikus és kromatográfiás sajátásaik alapján.

Az izomzatban túlnyomóan az A_4 izoenzim fordul elő /aldoláz-A/, a májban és a vesében a B_4 izoenzim található /aldoláz B/ kis mennyiségű AB hibriddel együtt, az agyban és a szívben pedig AC hibridenzimek vannak. Míg az aldoláz-A nagyobb affinitást mutat a FDP-hoz mint a FLP-hoz, addig az aldoláz-B mindkét szubsztráthoz egyformán kis affinitást mutat /21/. Az aldoláz-A esetén az FDP/FLP hasítási arány 50 körüli, ugyanez aldoláz-B-nél 1-2, a C típusu aldolázra pedig 12 körüli értéket irnak le /22/. Ezek a szubsztrát- K_m értékek annyira jellemzőek az enzimre, hogy a laboratóriumi vizsgálatoknál diagnosztikai jelentőséget tulajdonítanak nekik, ember esetén a vázizomaldolázra 22,0, a májaldolázra 1,2 az elfogadott /23/.

Az I. osztályba tartozó aldolázok működésükhöz nem igényelnek fém ionokat, sőt a fém ionok gátló hatást fejtenek ki merkaptid kötések kialakulása révén. Az enzim aktiv centrumában lizil oldalláncok vannak /25/ amelyek a katalizált reakcióban a szubsztrátok karbonil-csoportjával Schiff-bázis képzésében vesznek részt. Az enzimet - szubsztrát jelenlétében - a nátrium borohidrid NaBH_4 inaktiválja. Molekulatömegük 147-180 ezer dalton /26/.

Az aldolázok II. osztályába a baktériumok és gombák aldolázai tartoznak. A katalizisben nem vesznek részt lizin oldalláncok, helyettük jelentős szerepük van a két vegyértékű fémeknek, többnyire Zn^{2+} -nek. A reakció során nem történik Schiff-bázis képződés. Az EDTA gátolja az enzimet, de a gátlás rDP-vel kivédhető. A molekulák feltehetően két alegységből állnak /27/, molekulatömegük körülbelül 70-80 000 dalton. Optimális aktivitásuk kifejtéséhez fémionokat igényelnek /28,29/. Élesztőből irták le az első idetartozó enzimet /30/. A metalloaldolázok jellemző specifikus aktivitása élesztő esetén 173 U/mg, míg az emlős vázizomból izolált Schiff-bázis-képző lizin aldolázokra 15 U/mg körüli értéket irtak le /31/.

Az enzimet izom és élesztő kivonatokban Meyerhof és Lohmann /37/ mutatta ki először 1934-ben, de az rDP enzimatis hasítását Fischer és Tafel /33/ már 1887-ben felfedezte. Az első TIM mentes nyul-izomaldoláz izolálása pedig Herbert

és munkatársai nevéhez fűződik /34/. Ezáltal nyílt meg az út az enzim tulajdonságainak részletes vizsgálata előtt.

Az aldoláz intracelluláris enzim, amely a citoplazma oldható frakciójában fordul elő. Az emlősök vázizomzatában található fehérjék legnagyobb részét a glikolitikus enzimek teszik ki, amelyek közül az aldoláz mennyiségi aránya 8-10% /37/.

A nyul-vázizom aldoláz izolálására leggyakrabban a Taylor /1/ és munkatársai által kidolgozott módszert alkalmazzák, mely szerint a vizes extraktum frakcionálása, továbbá a preparátumok átkristályosítása semleges, telített ammonium-szulfát oldattal történik.

Az aldoláz preparátumokat általában 3-5-ször átkristályosított formában használják. További tisztítás ioncserés kromatográfia segítségével /DEAE vagy foszfo-cellulózok/ történhet.

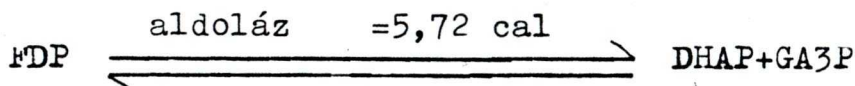
A nyulizom enzim móltömege 160 000 körül van /38,39/. A molekula alkalikus borátban, ureában /40,41/, savban /42,43/ és guanidinium hidrokloridban /44/ négy alegységre disszociál. Ezek közül két alegység azonos, míg a másik kettő az elsődleges strukturában eltér ettől /45/.

Az ugynevezett A típusú alegység két molekuláris alformában / α és β / fordul elő, amelyeket a C-terminális hexapeptidjében egy aminosav eltérése különböztet meg egymástól /46/. Az α -láncban Ile-Ser-Asn-His-Ala-Tyr, míg a β -láncban Ile-Ser-Asp-His-Ala-Tyr az aminosavak sorrendje.

A nyul-izomaldoláz tetramer szerkezete tehát a következő:
 $\alpha_2 \beta_2$. Egy-egy alegység móltömege körülbelül 40 000 dalton /47/, prolin az N-terminális /48/ és tirozin a C-terminális /49/ aminosav. Az alegység BrCN-nal történő hasítása és a hasítási termékek Sephadex G-75 oszlopon való elkülönítése eredményeképpen Lai /50/ négy jól kimutatható frakciót kapott. Az V. és az aktiv centrumot tartalmazó /A/ IV. frakció két rövid peptid, míg a C-terminális /C/ és az N-terminálist /N/ magában foglaló két peptid /III. illetve II. frakció/ hosszabb. Az első frakció az összes aminosavnak kevesebb mint 10%-át tartalmazza.

3. Az aldolázok katalitikus tulajdonságai

A glükolízis folyamatában a fruktóz-1,6-difoszfátot az aldoláz két triózfoszfátra bontja. A folyamat az aldolkondenzáció megfordításának felel meg.



A fenti - egyensúlyra vezető - reakció standard körülmények között az FDP keletkezése irányában van eltolva. Mivel a sejtekben az FDP koncentrációja aránylag kicsi /~ 0,1mM/, nagy mennyisége lebomlik, mielőtt még az egyensúlyi koncentrációt elérné.

Az FDP-nek az aldolázhoz való elsődleges kötődése valószínűleg a foszfát-csoportokon keresztül történik /52/.

Mehler és Bloom fotometriásan követték a DHAP karbonil csoportja és az aldoláz aktiv centrumában lévő /lys 221/ aminosav csoportja között létrejövő Schiff-bázis intermedier kialakulását /17/.

A vázizom aldoláz nemcsak az alapreakciót katalizálja, hanem más aldoldimerizációs illetve szén-szén kötés hasítási reakciók katalizálására is képes. /pl: $F 1P = DHAP + D-GA$ /

Az aldoláz pH-optimuma pH=7,5-10-nek adódott, az aktivitást α -GDH segítségével mérve. Más módszerekkel kapott adatok szerint az optimum intervalluma szűkebb, ami valószínűleg az ezen módszereknél használt anyagok magasabb pH értékkel szembeni érzékenységéből adódik /18/.

4. Nyul vázizom aldoláz rögzítése

Nyul vázizomból izolált aldolázt rögzítettek már fizikai és kémiai módszerekkel egyaránt különféle vizoldhatatlan hordozókhoz.

Fizikai módszerekkel történt az enzim térhálósított poliakrilamid gélbe való bezárása /56/.

Kémiai úton, kovalens kötésekkel az alábbi hordozókhoz kötöttek már aldolázt:

- szubsztituált poliakrilamid gélhez /60/;
- CM-agarózhoz;
- Sepharose 4B-hez /57/;
- aminoetil cellulózhoz /AEC/, etilén /moleinsav-anhidrid/ kopolimerhez /EMA/, és p-aminobenzil cellulózhoz /PAB//58
- N,N'-polimetilén-bis-jodacetamidhoz /74/;

A fenti kísérletek eredményeit az I. táblázat foglalja össze.

I. táblázat: Különböző hordozókhoz rögzített nyúl vázizom aldoláz katalitikus tulajdonságainak összehasonlítása

Hordozó	Kötés típus	Aktivitás /U/ml gél/	Spec.akt. /U/mg xerogél/	Rögzített fehérje /mg/mg szárazanyag/	Apparens K_m mM/	Maradék akt. /%/
Poliakrilamid	bezárás	-	-	$2,1 \cdot 10^{-2}$	-	10,4
Szubsztituált poliakrilamid	kovalens	15	-	-	-	40,0
CM-agaróz	kovalens	-	-	2,8 ml	-	13,3
Sepharose 4B	kovalens	0,859	4,2	0,206/ml	-	-
Aminoetil cellulóz	kovalens	-	-	$4,2 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^{-2}$	7,0
Etilén /maleinsav anhidrid/ kopolimer	kovalens	-	-	$4,9 \cdot 10^{-2}$	3,6	10,0
P-aminobenzil cellulóz	kovalens	-	-	$1,4 \cdot 10^{-2}$	$6 \cdot 10^{-3}$	-
N,N'-polimetilén bis-jodacetamid	kovalens	-	-	-	-	40,0

Az izomaldolázt kísérleteink során poliakrilamid alapú karboxil funkciós csoportokat tartalmazó Akrilex és aldehid csoportokat tartalmazó szilikát alapú szilokrom gélekhez kötöttük.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A felhasznált anyagok Reanal gyártmányúak voltak, a következők kivételével: CMC /Sigma/, etilén-glikol-monometiléter, Folin-Ciocalteus fenolreagens /MERCK/ és Sephadex G-200 /Pharmacia/.

Aldoláz aktivitásának mérése

Az aldoláz által katalizált reakció egyensúlyra vezet, amely az FDP keletkezése irányában van eltolva. Az enzim aktivitásának mérésére a reakció lefolyásának mindkét irányba történő követése felhasználható, az egyensúly kivánt irányba történő eltolása mellett. A gyakorlatban leginkább a triofoszfátok keletkezési sebességét mérik. Ebben az esetben az egyensúly eltolása enzimátikus úton /pl.: GAPD, TIM, GDB/ történő továbbalakításával, vagy a keletkező triofoszfátok kémiai blokkolása útján /hidrazinnal és hidrazinszármazékokkal/ lehetséges.

Az aldoláz aktivitásának mérésére több módszert is felhasználhatunk:

1. A segédenzimmel történő mérés

a. GAPD segédenzimmel történő aktivitásmérés /51/

A reakcióelegy összetétele:

Végtérfogat: 1,85 ml

Végkoncentrációk

a reakcióelegyben: FDP: 0,8 mM

NAD⁺: 1,7 mM

GAPD: 33 U

HAO₄: 0,8 mM

Puffer:

TRIS/HCl: 50 mM /pH=7,5/

Az egy perc alatt átalakított szubsztrátmolekulák számát az alábbi képlettel számítottuk ki:

$$EU = \frac{1,85}{1,0 \times V_{\text{minta}} / \text{ml}} \Delta E_{340} / \text{perc} \quad / \text{U/ml minta} /$$

Figyelembe kell vennünk, hogy a reakció lefutását a GAPD : aldoláz arány erősen befolyásolja, ezért a GADP-t mindig feleslegben kell a reakcióelegyhez hozzáadni.

b. TIM/GDH segédenzimmal történő aktivitásmérés /62,63/

A reakcióelegy összetétele:

Végtérfogat: 3,00 ml

Végkoncentrációk

a reakcióelegyben: FDP: 1,1 mM

NADH+H⁺: 0,2 mM

TIM/GDH: 9,6/1,5

Puffer:

TRIS/HCl: 50 mM /pH=7,5/

Foszfát: 10 mM - 800 mM /pH=7,5/

Az enzim aktivitásának meghatározás az alábbi képlet segítségével történik:

$$EA = \frac{3,00}{1,0 \times V_{\text{minta}} / \text{ml} \times 2} \Delta E_{340} / \text{perc} \quad / \text{U/ml minta} /$$

2. Segédenzim nélküli aktivitásmérést a kovalens kötődés és a hőmérsékletfüggés vizsgálatkor Sioley és Lehninger módszere alapján végeztük /64/.

A mérés elve, hogy a reakcióban a DHAP és a α -GA3P a hidrazinnal kapcsolódik. Ezt NaOH-dal hidralizáljuk, és az így előállított szabad triozokat a 2,4-DNPH-val reagáltatjuk. Ez metilglixál-3,4-dinitrofeniloszazonból és piro-szólósav-2,4-dinitrofenilhidrazonból álló keveréket eredményez. Mindkét komponens vörös színnel oldódik lugos közegben. Az adszorpció maximum 535-540 nm között van, ami az alkálikus metilcelloszolv használata esetén 570 nm-re tolódik el.

A méréshez az alábbi oldatokat készítettük el:

1. Frissen készített a szubsztrát reagens

0,02 M FDP : 0,12 M hidrazin pH=8,2 /1:1/

Hidrazin preparálása: 1,5 M NaOH/1M hidrazin szulfát

2. 30% TCA

3. 0,06N NaOH

4. 0,075 M 2,4 DNPH 1,5N HCl-ban oldva

5. Alkálikus metilcelloszolv /1 térf. 1N NaOH + 2 térf.

etilénglixol monometiléter/

Mérés: 10 μ l mintát mikrokécsövekbe teszünk, jeges fürdőn. 100 μ l szubsztrátreagenst pipettázunk minden mintához, majd összekeverjük. 38°C-on 30 percig inkubáljuk, majd 20 μ l TCA-t és 100 μ l NaOH-ot adunk hozzá és összerázzuk. Ha sok a protein, lecentrifugáljuk. A lug hozzáadása után 30 ± 5

perccel 50 μ l aliquothoz 50 μ l DNP_H-t pipettázunk és óvatosan összekeverjük. 30-60 perc múlva szobahőmérsékleten 1 ml lugos metilcellulózsolvot adunk hozzá és újabb 30 perc múlva 570 nm-en leolvassuk a színes hiarazon extinkcióját.

Az aktivitás meghatározása a következőképpen történt:

$$\text{Térf. akt.} = \frac{E_{570}}{\epsilon} \cdot \frac{60}{t} \cdot \frac{1100}{50} \cdot \frac{230}{10} = \text{/M/l eredeti minta/ora/}$$

$\epsilon = 58000$; $t = \text{inkubációs idő /perc/}$

A rögzített enzim aktivitásának mérése során a reakcióelegyet félkémcsőbe mérve a rögzített enzimmel kevertetve történt az inkubálás. Az üvegszűrőn leszűrt reakcióelegy extinkciójából $\Delta E_{340}/\text{sec}$ mérésével az oldott enziméhez hasonlóan számoltuk a rögzített enzim aktivitását.

/A kevertetés azért lényeges, mert e nélkül az enzimmészítmény külön fázisként halmozódik fel - mivel a gélszemcsék kiülepednek - és ez végső soron azt eredményezi, hogy a reakciósebességet az elegyben lejátszó diffúziós folyamatok határozzák meg./

A fehérjetartalom meghatározása

A fehérjeoldatok koncentrációjának meghatározása E_{280} mérésével, illetve Lowry és munkatársai /1951/ módszere alapján történt /65/. A kalibrációs görbe felvételekor marha serumalbumint /BSA/ használtunk. A különböző hordozókhoz rögzített fehérjemennyiséget indirekt uton - a reakcióelegybe

vitt és a rögzítési eljárás után a felüluszoban, illetve a mosófolyadékban maradt fehérjemennyiség különbségeteként - határoztuk meg.

Poliakrilamid gél elektroforézis

Az enzimek homogenitásának vizsgálata poliakrilamid gélelektroforézissel történt, az Ornstein és Davis által kidolgozott /64/ diszkontinuális pufferrendszerben. A vizsgálathoz az alábbi oldatokat használtuk:

A oldat:	1N HCl	48,0 ml
	TRIS	36,6 g
	TEMED	0,23 ml
	1000 ml-re feltöltve desztillált vízzel, pH= 8,9	
B oldat:	1N HCl	48,0 ml
	TRIS	5,98 g
	TEMED	0,46 ml
	1000 ml-re feltöltve, pH= 6,7	
C oldat:	Akrlamid	28,10 g
	BIS	0,635 g
	1000 ml-re feltöltve,	
D oldat:	Akrlamid	10,0 g
	BIS	2,5 g
	1000 ml-re feltöltve,	

E oldat: Riboflavin 4,0 mg

100 ml-re feltöltve

F oldat: Szaharóz 40,0 g

100 ml-re feltöltve

G oldat: Ammóniumperszulfát 0,14 g

100 ml-re feltöltve

Elektrodpuffer törzsoldat: TRIS 6,0 g

Glicin 28,8 g

1000 ml-re feltöltve,

pH= 8,3

Használat előtt 10x
nigítani!

Alsó /szeparáló/ gél: 5ml A oldat

10ml C oldat

5 ml H₂O

20ml G oldat

2-2 ml monomert üvegcsőbe mérünk, rá 1-2 mm-nyi vizet rétegzünk. A polimerizációs idő körülbelül 30 perc. A gél 7%-os az akrilamid monomerre nézve.

Felső /tömörítő/ gél: 5ml B oldat

10ml D oldat

20 ml F oldat

5 ml E oldat

0,2 -0,2 ml monomert mérünk a szeparáló gélek felületére, majd rá néhány ml vizet rétegzünk. A gél fotopolimerizációs folyamatban keletkezik.

Minta-előkészítés: a minta vezetőképessége a 8x-ra hígított A oldat vezetőképességénél nem lehet nagyobb. A mintákat 20%-os szakaróz oldatban vittük fel a gélekre, az elektroforézis 5 mA/gél egyenáram mellett 2 óra volt. A géleken elvált fehérjefrakciók festése 12,5% TCA-ban oldott 0,012% Comassie Brilliant Blue 6250 oldattal, a festés utáni tartósítás 5% ecetsav oldatban történt. Az aldoláz specifikus kimutatására az alábbi reakcióelegyet használtuk:

1,3 m~~x~~ NAD⁺
0,45 mg jód-tetrazólium-hidroklorid
0,14 mg fenazin-metoszulfát
1,5 mol FDP
0,9 mol Na₂HASO₄
33 U GAPD
1 ml 0,1 M TRIS/HCl pH=7,5

A géleket a reakcióelegyben 15 percig inkubáljuk 37°C-on és a megjelenő ibolyaszínű csíkok alapján azonosíthatjuk az aldolázt. A szín tartósítása 10%-os etanolban történt, amelyben a gél nem aktív részeiből kioldódik a színezék.

A molekulatömeg meghatározása az Ornstein-Davis által meghatározott gél- és pufferrendszerekkel, SDS gélelektroforézissel történt. SDS jelenlétében a polipeptidláncok gélelektroforetikus mobilitását pusztán molekulatömegük határozza meg. E jelenség alapján Weber és Osborn egyszerű és gyors módszert dolgoztak ki a molekulatömeg gyors meghatározására. /75/. A molekulatömeg kiszámítása ismert molekulatömegű poli-

peptidek és fehérjék felhasználásával készült kalibrációs görbe segítségével történik. Molekulatömeg standardként mioglobint, BSA-t, nyul-vázizom aldolázt és GOD-ot használtunk.

Az aldoláz rögzítése szilárd fázisu hordozókon

Az enzim rögzítéséhez szerves /Akrilex/ és szervetlen /Sziloxrom/ alapanyagú hordozókat használtunk.

Az Akrilex gélek alapvázát akrilamid-akrilsav-N,N'-metilénbiszakrilamid alkotja. A hordozó Akrilex P-100 típusú gélből készülnek, amelynek szemcseátmérője 100-320 μ m.

Az Akrilex C-100 gél karboxil funkciós csoportokkal / $6,2 \pm 0,3$ meq/g száraz gél/ rendelkezik, amelyek aktiválása vizolható karbodiimidokkal történt. A fehérjék karboxilát tartalmú polimerekhez karbodiimidekkel való kapcsolásának elve Weliky és Weetall /1965/ nevéhez fűződik /71/. A sertés-vázizom aldoláz rögzítéséhez használt eljárás kidolgozásánál elsősorban Kovács és munkatársai által - kolineszteráz rögzítésére - közölt módszerre támaszkodtunk /70/.

Az Akrilex AH-100 hordozó - amely akrilamid, N,N'-metilén-biszakrilamid és akrilsav-hidrazid kopolimerjének tekinthető - hidrazid funkciós csoportjainak / $4,5 \pm 0,2$ meq/g szárazanyag/ aktiválása salétromos savval történt. A kovalens kötés az így létrejövő sav-azid csoportokon keresztül jön létre. A sertés-vázizom aldoláz rögzítésére használt módszerünk

Michael és Evers CM-cellulóz-fenérje konjugátumok előállítására szolgáló módszerén alapul /72/.

A Szilokrom-aldehid hordozó szilikát alapvázu, aldehid funkciós csoportokat tartalmazó gél, amelyet a szövet gyártó bocsátott a rendelkezésünkre. A gél gyárilag megadott jellemzői a következők: szemcseméret 0,1-0,2 μm , porusméret 400-600 Å, felület 80 m^2/g . A sertés-vázizom aldoláz rögzítésekor Lomako és munkatársai /68/ munkájára támaszkodtunk, amelyben a glükóamiláz rögzítését írják le.

V. EREDMÉNYEK

1. Sertés-vázizom aldoláz izolálása és összehasonlító vizsgálata

1.1 Az aldoláz izolálása sertés-vázizomból

1 kg, zsírtól és kötőszöveti részekről megtisztított, majd megdarált sertéscomb 1,5 l hideg $+4^{\circ}\text{C}$ / desztillált vízben szuszpendáltunk. 40 percig $+4^{\circ}\text{C}$ -on kevertettük, majd 3000 xg-vel lecentrifugáltuk. A szűrlet pH-ját 1N NaOH-dal 7,5-re állítottuk és lassu kevertetés közben kb. 30 perc alatt 48%-ra telítettük kristályos ammónium szulfáttal. Félórás állás után $+4^{\circ}\text{C}$ -on szűrtük az oldatot. A szűrletet 60%-ra telítettük ammóniumszulfáttal. A szűrlet ezek után 7 napig $+10^{\circ}\text{C}$ -on állt. A kristályosítás kivételével a preparálás minden lépését 0°C körüli hőmérsékleten végeztük.

1. átkristályosítás: A szuszpenziót redős szűrőn szűrtük. A csapadékot desztillált vízben oldottuk, majd kristályos ammóniumszulfátot adtunk hozzá, enyhe opaleszcencia megjelenéséig.

Egy hét állás után a kristályokat szűrtük és a kristályosítást még háromszor megismételtük.

Az aldoláz ammóniumszulfátos frakcionálása illetve átkristályosítása során mért aktivitásokat és a tisztulás mértékét egy tipikus izolálási kísérlet során a II. táblázat mutatja.



II. táblázat: Aldoláz izolálása sertés vázizomból

Izolálási lépés	Térfogat /ml/	Össz- aktivitás /U/	Kitermelés /%/	Össz- fehérje /g/	Specifikus aktivitás /U/mg fehérje/	Tisztulás
Nyers extraktum /3000 g felülúszó/	6 500	162 500	100,0	1 170,0	0,14	1,0
Ammónium-szulfátos frakcionálás /48 % telítésű felülúszó/	3 500	157 500	96,9	350,0	0,45	3,2
Ammónium-szulfátos frakcionálás /48-60 % telítésű csapadék	1 800	99 000	60,9	144,0	0,69	4,93
1. Átkristályosítás /csapadék/	1 250	75 000	46,1	62,5	1,2	8,57
2. Átkristályosítás /csapadék/	675	61 020	37,5	24,975	2,44	17,4
3. Átkristályosítás /csapadék/	255	49 725	30,6	6,375	7,8	55,7
4. Átkristályosítás /csapadék/	250	45 500	28,0	5,0	9,1	65,0

Mint a táblázatból látható, módszerünkkel közel 70-szeres tisztulást értünk el a kiindulási extrakthoz képest. A tisztulás a nyers extraktum specifikus aktivitására vonatkozó^{lat} aktivitásnövekedést jelenti. A négyszer átkristályosított enzim specifikus aktivitása 9,1 U/mg volt, ami az enzimszuszpenzio hűtőszekrényben való tárolásának első hónapja alatt lassan 9,6 U/mg-ra növekedett. További kísérleteinket ezzel a termékkel végeztük.

A 4x átkristályosított sertés-izomaldoláz fehérjére festett elektroferogramját az 1/a ábra mutatja. Összehasonlításként az 1/e ábrán 3x átkristályosított nyul izomaldoláz elektroferogramját mutatjuk be. A sertés aldoláz nem bizonyult elektroforetikusan homogénnek, ezért a 4x átkristályosított enzimet megkíséreltük tovább tisztítani ioncserélő kromatográfiával DEAE cellulóz oszlopon. A 28 cm³ térfogatú gélt /2,1 cm x 9,2 cm/ 0,02 M TRIS/HCl pufferrel /pH=7,0/ hoztuk egyensúlyba, majd 30 mg sómentes fehérjét vittünk rá. A fenti pufferrel mosva az oszlopot a fehérjék két csúcsban moshatók át /2. ábra/. Az első csúcs tartalmazza a felvitt összes aldoláz aktivitását, míg a második fehérjecsúcs egyik frakciójából sem mérhető aktivitás. A két csúcs ezek szerint arra utal, hogy az aldoláz nem, míg a szennyező fehérjék gyenge kölcsönhatásba lépnek a géllal és így csak késleltetve - azaz a pufferrel tovább mosva az oszlopot - jelennek meg. A DEAE oszlopon tisztított aldoláz elektroforetikus képét az aktív frakció esetén az 1/b, míg az inaktív csúcsét az 1/c ábra mutatja fehérjére festve.

Az aktiv frakció aktivitásra festett elektroferogramját az 1/a ábra mutatja. Az aktiv frakció homogenitását további gélaromatográfiával is ellenőriztük. Ez 0,1 M NaCl-ot tartalmazó 0,02 M TRIS/HCl pufferrel /pH=7,0/ egyen-súlyba hozott, Sephadex G-200 gélt tartalmazó oszlopon történt. További tisztulást már nem sikerült elérni, mivel csak 1 fehérje csucst kaptunk./3. ábra/ Ennek elektroferogramja teljesen megegyezik az 1/b ábrán látnatival. A tisztított aldoláz specifikus aktivitása 10,8 U/mg volt, GAPD segéd-enzimes módszerrel mérve.

A tisztított enzim molekulatömegének meghatározása SDS gélelektroforézissel történt és 150 000 körülinek adódott /4. ábra/, ami a nyul vázizom aldoláz molekulatömegével megegyezően azonosnak tekinthető.

1.2 Sertés és nyul vázizom aldoláz katalitikus tulajdonságai- nak és stabilitásának összehasonlító vizsgálata

1.2.1 katalitikus tulajdonságok

1.2.1.1 A sertés és a nyul vázizom aldoláz katalitikus akti- vítás pH függésének vizsgálata

Az aktivitás pH függésének vizsgálata 6,0-9,0 tarto-mányban történt. pH= 6,0-8,0 között 0,05 M foszfátot, pH= 7,0-9,0 között TRIS/HCl-puffert használtunk. Az átfedő pon-tonál az aktivitásban tapasztalható eltérés a két puffer használata esetén minimális. A katalitikus aktivitás pH optimuma sertés aldoláz esetén 7,25, nyul aldoláz esetén 7,0 /5. ábra/. Fontos, hogy a foszfát puffer koncentrációja

0,05 M-nál kisebb legyen. Az aktivitás foszfát koncentrációtól való függését vizsgálva kiderül, hogy mind a sertés, mind a nyul aldoázát jelentősen gátolja a növekvő foszfát koncentráció /6. ábra/. Az ábrán megfigyelhető, hogy a foszfát ionok kevésbé gátolják a sertés aldoázát, mint a nyul vázizomból izolált enzimet.

1.2.1.2 A katalitikus aktivitás látszólagos hőmérsékletfüggése

Az aktivitás látszólagos hőmérsékletfüggését 25-60°C tartományban, 5°C-onként vettük fel. Az aktivitást Sibley és Lenninger /64/ módszere szerint mértük, az enzimet a szubsztrát reagenssel 30 percig incubáltuk. Az aktivitás látszólagos hőmérsékleti optimuma sertés aldoáz esetén 40°C, míg a nyulból preparált enzim esetén 45°C-nak adódott /7. ábra/.

1.2.1.3 A szubsztrátkoncentráció hatása a sertés vázizom aldoáz aktivitására

A szubsztrátkoncentráció hatását a sertés vázizom aldoáz aktivitására a 8. ábra mutatja Lineweaver-Burk féle linearizálással. A méréseket 1×10^{-3} - 8×10^{-6} M /FDP/, illetve 1×10^{-3} - $1,6 \times 10^{-4}$ M /F1P/ koncentráció tartományban, 0,05 M TRIS/HCl pufferben /pH=7,5/ és 25°C-os hőmérsékleten végeztük.

A segédenzimes módszerrel mért Michaelis állandó értéke $2,9 \times 10^{-5}$ M szubsztrátaként FDP-t használva /8/a ábra/ és $2,8 \times 10^{-3}$ M F1P esetén /8/b ábra/.

A nyul aldoláz aktivitásának enzimátikus uton mért szubsztrátkoncentráció függésére irodalmi utalást találhatunk /32/. Eszerint a K_M értéke FDP-re $1,4 \times 10^{-5}$ M, FlP szubsztrátra pedig 7×10^{-3} M. A sertés aldoláz K_M értéke tehát mind FDP, mind FlP szubsztrátra nézve közel kétszerese a nyul aldoláz megfelelő értékeinek.

1.2.2 Sertés és nyul izomaldoláz stabilitásának vizsgálata

1.2.2.1 Hőstabilitás

Az aldolázok hőstabilitását $50-65^{\circ}\text{C}$ tartományban hasonlítottuk össze, 5 fokként. A méréseket $0,05$ M TRIS/HCl pufferben /pH=7,5/ végeztük, meghatározott időpontokban mintátá véve az inkubált enzimekből. A reakcióelegyek fehérjekoncentrációja $0,1$ mg/ml, térfogata pedig $5-5$ ml volt.

50 és 55°C -on egy aktiválódási folyamat volt megfigyelhető a sertésizomból izolált enzim esetén /9/a ábra/. Ilyen jelenség a nyul izomaldoláz vizsgálatakor nem mutatkozott /9/b ábra/. A sertés aldoláz a vizsgált hőmérsékleti tartományban jelentősen stabilabbnak bizonyult a nyul aldoláznál. Ez utóbbi hőinaktiválódása egyetlen elsőrendű kinetikával leírható, míg a sertés aldoláz átmeneti aktiválódását legalább két lépésben lezajló inaktiválódás követi.

1.2.2.2 A hőinaktiválódás sebességének függése a fehérjekoncentrációtól

A sertés vázizom aldoláz hőinaktiválódásának függését a fehérjekoncentrációtól Friedrich és munkatársai /66/ módszere alapján vizsgáltuk $0,01$, $0,1$ és $1,0$ mg/ml koncentrációju

aldoláz oldatokkal, 0,01 M EDTA-t tartalmazó, 0,2 M TRIS/HCl pufferben /pH=7,5/, 55°C-on. Sertés izomaldoaláz esetében minenárom vizsgált koncentrációra az első 20 percben egy ~~ak~~ aktiválódás volt megfigyelhető /10. ábra/. Ilyen aktiválódás a nyul vázizom aldoláz esetében nem tapasztalható. Ugyanakkor - hasonlóan a nyul aldolázhoz - a nőinaktiválódás sebessége a vizsgált koncentrációtartományon belül független a fehérjekoncentrációtól.

1.2.2.3 A nőinaktiválódás pH függése

A pH függés vizsgálatát 55°C-on, pH= 5,0-9,0 tartományban végeztük, az alábbi pufferekben: 0,05 M acetát pufferben /pH= 5,0/, 0,05 M foszfát pufferben /pH= 6,0-8,0/ és 0,05 M TRIS/HCl pufferben /pH= 7,0-9,0/. A fehérjekoncentráció 0,1 mg/ml volt. A sertés aldoláz hőstabilitásának maximuma pH= 6,0-nál észlelhető; pH= 7,0 és pH= 7,5 pufferben csak kis mértékben függ a pH-tól. Az inakubációs időt növelve az enzim pH= 7,5-nél sokkal stabilabbnak mutatkozott, mint az ettől eltérő pH-kon. A vizsgálat 120. percében pH= 7,5-nél még a kiindulási aktivitásnak mintegy 35%-a volt mérhető, míg az ezutáni legnagyobb aktivitás pH= 7,0-nél már 10% alatt van.

Nyul aldoláz esetén ilyen jelenséget nem tapasztaltunk /11/b ábra/, a vizsgált pufferekben inakubált enzim aktivitása mereveken csökkent. A hőkezelés hatására bekövetkező aktivitásvesztesség pH= 7,0 pufferben a leglassabb. Az aktivitás pH optimumához közeledő pH értékeken mind a két enzim a legstabilabb.

1.2.2.4 Az urea hatásának vizsgálata

A mérések 1-5 M urea koncentrációjánál, 0,05 M TRIS/HCl pufferben /pH= 7,5/ 25°C-on történtek. A fehérjekoncentráció 0,1 mg/ml volt. A sertés aldoláz 1-2 M ureában stabilabbnak mutatkozott /12/b ábra/. 1M urea esetén $t_{1/2}$ sertés aldoláz esetén kb. 140 percre tehető, míg nyul aldoláz esetén 30 perc; 2M urea esetén ezek az adatok 55, illetve 25 percre módosultak. 5M urea hatására a sertés izomaldoláz kb. 40 perc alatt inaktiválódott / $t_{1/2}$ = 6 perc/, nyul aldoláz aktivitást már 5 perc elteltével sem lehetett mérni.

1.2.2.5 Tárolási stabilitás

A tárolási stabilitást 0,1 mg/ml fehérjekoncentrációju, sómentesített enzimeken vizsgáltuk, különböző hőmérsékleteken. Az eredményeket a III. táblázat foglalja össze.

III. táblázat. Sertés- és nyul vázizom aldoláz tárolási stabilitásának összehasonlítása

Hőmérséklet /°C/	Nyul aldoláz $t_{1/2}$ /óra/	Sertés aldoláz $t_{1/2}$ /óra/
4	63	124
10	58	103
25	21	49

A táblázatból látható, hogy a sertés aldoláz tárolási stabilitása mintegy kétszerese a nyul aldolázénak.

Kísérleteinket összegezve arra a következtetésre jutottunk, hogy a sertés aldoláz nagyobb stabilitása miatt alkalmasabbnak látszik a különböző hordozókhoz való rögzítésre és gyakorlati alkalmazásra, mint a nyul aldoláz.

2. Rögzített sertés vázizom aldoláz előállítása és összehasonlító vizsgálata

2.1 Aldoláz rögzítése, különböző gélekhez

2.1.1 Rögzítés Akrilex C-100 gélhez

0,5 g xerogélt 25 ml hideg 0,1 M foszfátpufferben /pH= 7,0/ szuszpendáltunk. Közben 1 g CMC-t oldottunk 12,5 ml 0°C-os pufferben. Ezt a gélhez adva 10 percig rázattuk jeges fürdőn. Az így aktivált gélhez 0,2 g előzőleg dializálással sómentesített enzimet adtunk 12,5 ml pufferben. Az oldat fehérjekoncentrációja 16 mg/ml, térfogati aktivitása 130,9 U/ml volt. A szuszpenziót 4°C-on, 48 órán át inkubáltuk, közben 18 órán át kevertettük, majd a gélt 3 x 100 ml foszfát pufferrel, 3 x 100 ml 0,05 M NaCl-ot tartalmazó foszfát pufferrel, végül ismét 3 x 100 ml foszfát pufferrel mostuk a nem kovalensen kötött fehérjék eltávolítása céljából. A rögzítés mérlegét a IV. táblázat mutatja.

IV. táblázat. Aldoláz rögzítése Akrilex C-100 gélen

Reakcióelegybe vitt fehérje	0,2 g
Rögzített fehérje	67,5 %

Reakcióelegybe vitt aktivitás	1636 U
Rögzített aktivitás	61,6 %
Oldott állapotban visszanyert aktivitás	33,1 %
Aktivitás veszteség	5,3 %
Rögzített enzim specifikus aktivitása	7,46 U/mg fehérje
Rögzített enzim szárazanyagra vonatkoztatott aktivitása	2015 U/g xerogél
Rögzített enzim térfogati aktivitása	15,5 U/ml gél

2.1.2 Rögzítés Akrilex AH típusu hordozóhoz

8 térfogat géluszuszpenzióhoz jeges vízfürdön 1 térf. 2N HCl-ot, majd cseppenként 4 térf. 4%-os NaNO_2 oldatot adtunk. 15 perc kevertetés után 0,1 M K-foszfát pufferrel /pH=7,0/ a szuszpenziót semlegesséig mostuk. Az így aktivált gélhez jeges vízfürdön 4,0 ml 3,5 mg/ml-es fehérjekoncentrációju enzimet vittünk fel. A gél 24 óra hosszat kevertettük a hidegszobában. Az V. táblázat a rögzítés eredményét mutatja.

V. táblázat. Aldoláz rögzítése Akrilex AH-200 gélhez

Reakcióelegybe vitt fehérje	7,04 mg
Rögzített fehérje	14,3 %
Reakcióelegybe vitt aktivitás	45 U
Rögzített aktivitás	11,1 %
Oldott állapotban visszanyert aktivitás	26,7 %
Aktivitás veszteség	62,2 %
Rögzített enzim specifikus aktivitása	5 U/mg fehérje
Rögzített enzim térfogati aktivitása	0,62 U/ml gél

2.1.3 Rögzítés Szilokrom-aldehid gélhez

1 g Szilokrom gélét olyan desztillált vízzel mostunk át, amelynek a pH-ját előzetesen 8,0-ra állítottuk be. Ilyen desztillált víz 8,5 ml-ében 240 mg aldolázt oldottunk, rá-mértük a gélre és a szuszpenziót 2 órán át $+4^{\circ}\text{C}$ -on kevertettük. Ezt követően szűrtük a gélét és a nem kötődött fehérjét 8,0-as pH-ju desztillált víz 5 x 40 ml-ével kimostuk. 1% NaBH_4 -ból 8 ml-t mérve a gélre 1 órán át kevertettük a szuszpenziót, a gél aldehid és az enzim amino-csoportjai közt létrejött Schiff-bázis redukálására - és ezáltal a kötés stabilizálására - , majd 5 x 40 ml desztillált vízzel kimostuk.

Mivel az ily módon rögzített enzim nem bizonyult elég stabilnak, feltételeztük, hogy a gélhez kötött aldoláz aktivitását a gél el nem reagált aldehid csoportjai befolyásolhatják, ezért a szabadon maradt aldehid csoportokat úgy kötöttük le, hogy a gélét egy órán át 1 mg/ml hidroxilaminnal kevertettük $+4^{\circ}\text{C}$ -on. Ezt szűrés követte, majd mosás 5 x 40 ml desztillált vízzel. Ismételten redukáltuk a gélét NaBH_4 -del, amit 5 x 40 ml desztillált vízzel történő mosás követett.

A rögzítés eredményét a VI. táblázat mutatja.

VI. táblázat. Sertés vázizom aldoláz rögzítése Szilokrom gélen

Reakcióelegybe vitt fehérje	32,2 mg
Rögzített fehérje	59,8 %
Reakcióelegybe vitt aktivitás	286,8 U
Rögzített aktivitás	12,9 %

Oldott állapotban visszanyert aktivitás	37,9 %
Aktivitás veszteség	49,2 %
Rögzített enzim specifikus aktivitása	1,92 U/mg fehérje
Rögzített enzim szárazanyagra vonatkoztatott aktivitása	37 U/g xerogél
Rögzített enzim térfogati aktivitása	41,1 U/ml gél

2.2 A rögzített aldoláz katalitikus tulajdonságainak és stabilitásának vizsgálata

A rögzítés során az enzim és a hordozó közötti kölcsönhatások miatt megváltozhatnak a katalitikus tulajdonságok, ezért fontos a rögzített enzimek katalitikus tulajdonságainak és stabilitásának összehasonlítása az oldott enzim megfelelő tulajdonságaival.

Mivel az Akrilex AH hordozóhoz történt rögzítés nem bizonyult stabilnak, így csak az Akrilex C-100, illetve a Szilikrom-aldehid hordozóhoz rögzített aldolázt vizsgáltuk. A mérésekhez az oldott enziméhez hasonló aktivitásmennyiséget reprezentáló rögzített enzimet használtunk és a kísérleteket az oldott enzim jellemzésekor leírt körülmények között végeztük.

2.2.1 A rögzített aldoláz katalitikus tulajdonságainak vizsgálata

2.2.1.1 Az aktivitás pH-függésének vizsgálata

Az aktivitás pH-függésének vizsgálata pH= 6,0 - 9,0 tartományban történt 25°C hőmérsékleten; pH= 6,0 - 8,0 között 0,05 M foszfát-, pH= 7,0 - 9,0 között 0,05 M TRIS/HCl puffert használtunk. Az Akrilex C-100-on /13/a ábra/, illetve a

Szilokrom hordozón /13/b ábra/ rögzített enzim pH optimuma 7,5-nél, az oldott enzimé pH= 7,25-nél volt.

2.2.1.2 Az enzimaktivitás látszólagos hőmérsékletfüggése

Az aktivitás látszólagos hőmérsékletfüggését 25-60°C tartományban 5°C-onként vettük fel. Az aktivitást Sibley és Lehninger módszere szerint mértük, az enzimet 30 percig inkubáltuk a szubsztrát reagenssel. Az Akrilex és a Szilokrom aldoláz látszólagos hőmérsékleti optimuma 45°C-nál /14/a,b ábra/ míg az oldott enzimé 40°C-nál volt.

2.2.1.3 A szubsztrátkoncentráció hatása az enzimaktivitásra

A Michaelis állandó meghatározása 0,05 M TRIS/HCl pufferben /pH= 7,5/ történt, az Akrilex-aldoláz esetén 1×10^{-3} - 8×10^{-6} M, a Szilokrom-aldoláz esetén pedig 1×10^{-3} - $1,3 \times 10^{-5}$ M FDP szubsztrátkoncentráció tartományban. Értéke enzimatis uton mérve Akrilex-aldolázra $1,5 \times 10^{-4}$ M /15/a ábra/, Szilokrom-aldolázra $1,4 \times 10^{-4}$ M /15/b ábra/. Ezek az értékek mintegy négyszer nagyobbak az oldott enzim K_M értékénél.

2.2.2 A rögzített aldolázok stabilitásának vizsgálata

2.2.2.1 Hőinaktiválódás

A rögzített enzimek hőinaktiválódási kinetikáját 50-65°C tartományban vizsgáltuk, 0,05 M TRIS/HCl pufferben, amelynek pH-ja 7,5 volt.

Az Akrilex-aldoláz esetén 50 és 55°C-on kis mértékű aktiválódást tapasztaltunk, amit lassu inaktiválódás követett. A vizsgálat ideje alatt 35-40%-kal csökkent az enzim aktivitása,



így hőstabilitása az oldott enziménél jóval nagyobbak bizonyultak 60 és 65°C-on az enzim rohamosan inaktiválódik, de a rögzített enzim itt is stabilabbnak bizonyult /16. ábra/.

A Szilokrom-enzim aktivitása ezzel ellentétben a hőmérséklet hatására viszonylag gyorsan csökkent és a vizsgálat végén csak 65°C-nál mutatkozott stabilabbnak, mint az oldott enzim /17. ábra/. 65°C-on az akrilex hordozón rögzített aldoláz stabilitását is felülmúlja.

A VII. táblázat - a jobb összehasonlítás kedvéért - az oldott és a rögzített aldolázok hőinaktiválódásának felezési idejét mutatja be a különböző hőmérsékleteken.

VII. táblázat. Oldott és rögzített aldolázok hőinaktiválása

Hőmérséklet /°C/	$t_{1/2}$ Oldott aldoláz /perc/	$t_{1/2}$ Akrilex aldoláz /perc/	$t_{1/2}$ Szilokrom aldoláz /perc/
50	110	120	78
55	63	120	68
60	28	65	60
65	11	36	46

2.2.2.2 Az Akrilex-aldoláz hőinaktiválódásának pH-függése

Az Akrilex-aldoláz hőinaktiválódásának pH-függését 0,05 M TRIS/HCl pufferben /pH= 7,0- 8,5/, 0,05 M foszfát pufferben /pH= 6,0 - 8,0/ és 0,05 M acetát pufferben /pH= 5,0/ hasonlítottuk össze 55°C-on az oldott enzimével /18. ábra/. Az Akrilex-enzim pH= 7,5 -nél volt a legstabilabb, de pH= 7,0, illetve

pH= 8,5-nél is stabilabbnak mutatkozott, mint az oldott enzim. A leginkább szembeötlő eltérés pH= 6,0-nál mutatkozott, ahol az oldott enzim aktivitásának felezési ideje 75 perc, míg az Akrilex aldolázé csak 34 perc volt. pH= 5,0-nél az oldott és rögzített enzim stabilitása közel megegyezett.

2.2.2.3 Urea hatása a rögzített enzimek aktivitására

Az urea hatását a rögzített enzimek aktivitására 1,0-5,0 M koncentrációtartományban 0,05 M TRIS/HCl pufferben /pH= 7,5/ vizsgáltuk, 25°C-on.

Az Akrilex-aldoláznál az 1-4 M koncentrációju urea csak lassu aktivitáscsökkenést okozott. 4 M urea hatására a 80. percben az oldott enzim kiindulási aktivitásának már csak 1,3%-át lehetett visszamérni, míg az Akrilex-aldoláz esetén ez az érték 52,4% volt. Az 5 M urea hatására az inaktiválódás már rohamosabb, de az Akrilex-enzim $t_{1/2} = 18\text{p}$ / itt is stabilabbnak mutatkozott az oldott aldoláznál $t_{1/2} = 6\text{p}$ / /19. ábra/.

A Szilokrom-aldoláz esetén az inaktiválódás jóval gyorsabb mint az Akrilex enzimé, azonban még így is lassubb, mint az oldott aldolázé /20. ábra/. 5 M urea koncentrációnál oldott enzim esetén csak 7 perc, míg a Szilokrom-aldoláznál 36 perc az aktivitás felezési ideje.

2.2.2.4 Tárolási stabilitás

A tárolási stabilitást +10°C-on vizsgáltuk sómentes oldott és a két rögzített enzim esetén /0,05 M TRIS/HCl pufferben, pH= 7,5/. Az adatokat a VIII. táblázat foglalja össze.

VIII. táblázat. Oldott és rögzített aldolázok tárolási stabilitása $+10^{\circ}\text{C}$ -on /zárójelben a rögzített enzimen történő lassu puufferátfolyatáskor mért értékeke/

Tárolási idő /nap/	M A R A D É K	A K T I V I T Á S	/%/
	Akrilex	Szilokrom a l d o l á z	
0	100	100	100
1	99,8 /96,1/	100 /99,0/	
2	99,7 /94,9/	98,9 /98,1/	79
3	98,2 /93,8/	98,2 /96,3/	
7	96,1 /93,2/	83,8 /70,1/	36,2
11	95,0 /92,6/	62,0 /58,8/	21,3
14	93,8 /91,1/	49,9 /45,4/	3,9
21	89,0 /86,5/	18,6 /11,2/	
28	77,0 /74,3/		
42	63,1 /60,1/		
51	49,2 /45,1/		

A rögzített enzimeken történő lassu, /1,1 ml/ órá/ 0,05 M TRIS/HCl puuffer /pH=7,5/ átfolyatás mérhető aktivitás kimosódását nem okozta, az aktivitás változása a mérési hibahatáron belül nem tért el jelentősen a fenti táblázat adataitól. A mért értékeket a VIII. táblázat megfelelő helyein zárójelben közöljük.

VI. MEGVITATÁS

1. A sertés vázizom aldoláz izolálása, katalitikus aktivitása és stabilitása

Munkánk célja az volt, hogy aldolázt kovalens módon, nagy hatásfokkal rögzítsünk különböző hordozókhoz, gyakorlati célok, pl. triózfoszfátok előállítása érdekében.

Az aldoláz izolálására sikerült Taylor /1/ - nyul vázizomzatból történő aldoláz-izolálásra leírt - módszerét úgy módosítanunk, hogy ezáltal az enzimet a jóval olcsóbb és nagyobb mennyiségben beszerezhető sertés vázizomból állíthattuk elő, ammóniumszulfátos frakcionálással. Összehasonlító méréseink alapján megállapíthatjuk, hogy a sertés vázizom aldoláz katalitikus tulajdonságait tekintve alapvetően nem különbözik a nyul izomaldoláztól, stabilitását tekintve azonban lényeges különbséget találtunk.

Az általunk előállított sertés vázizom aldoláznak a nyul vázizom aldolázhoz való hasonlóságát bizonyítja a megegyező specifikus aktivitás és szubsztrát specifitás, valamint a pH optimum, a látszólagos hőmérsékleti maximum és a Michaelis-állandó értékeinek hasonlósága.

A sertés vázizom aldoláz hőstabilitása nagyobb mint a nyul vázizom aldolázé, és a hőinaktiválódás mértéke 55°C-on - adott pH tartományon belül - csak kis mértékben függ a puf-

fer pH-jától. Urea hatására hasonlóképpen nagyobb konformációs stabilitást tapasztalhatunk sertés aldoláz esetén. A tárolási stabilitást vizsgálva megállapítható, hogy a sómentesített sertés vázizom aldoláz stabilitása nagyobb a nyul izomaldolázénál.

A nativ sertés vázizom aldoláz hő, illetve pH-változtatás hatására bekövetkező inaktiválásának vizsgálata során felfigyeltünk arra, hogy a nyul vázizom aldoláznál megfigyelhető elsőrendű kinetika helyett az inaktiválódás egy jellegzetes, összetett reakciómenetet mutat.

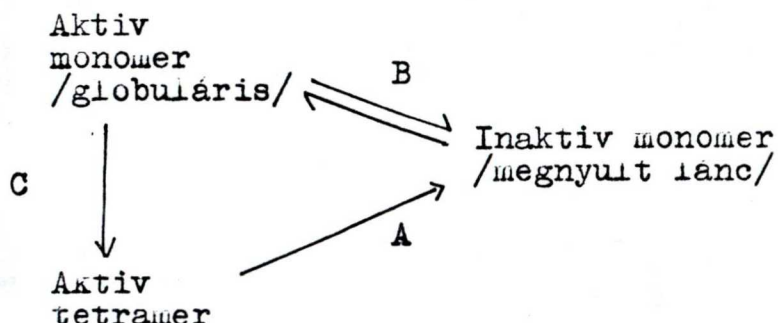
A fenti hatásokra bekövetkező inaktiválódás abban az esetben mutathat ilyen összetett reakciómenetet, ha:

- a rendszerben azonos funkciójú, de eltérő stabilitású enzimformák /pl. izomerek/ találhatók;
- a kezelés során izomerizáció következik be; vagy
- az oligomer enzim disszociál és az oligomer, illetve a monomerek eltérő stabilitásuk /73/.

A fehérje két aldoláz elegye nem lehet, mivel a keverékben a két enzim arányának adottnak kell lennie, így a féllogaritmikus ábrázolásban a lassabb reakciót jellemző egyenesnek azonos pontban - mégpedig a két enzimforma arányában - kellene az y tengelyt metszenie.

Mivel az emlős izomaldolázok tetramer molekulák /44/, önként adódott a feltételezés, hogy az általunk észlelt összetett reakció a tetramer disszociációjával kapcsolatos.

Az urea hatására, illetve a semlegestől eltérő pH-jú közeg alkalmazása során az aldoláz az alábbiak szerint disszociál /57/.



Az ábrán feltüntetett reakcióutak az alábbi esetben teljesülnek: A= 3M urea, vagy pH= 10,5 /ill. 5,0/

B= 2M urea, vagy pH= 9,7 /ill. 5,3/

C= a B-nél kisebb urea koncentració, illetve a semlegeshez jobban közelítő pH esetén.

Megállapítható tehát, hogy a fenti hatásokra a disszociációs egyensúly a monomerek irányába tolódik el. Az aktív monomerek katalitikus tulajdonságaikban / K_M , szubsztrát specifikus, aktiválási energia/ nem különböznek a tetramertől. A polipeptid láncok közötti kölcsönhatás következtében a tetramer stabilitása nagyobb mint a monomereké. Erre utal az a tény is, hogy az aktív monomerek reasszociációja /C/ - az ott leírt feltételek mellett - irreverzibilis, mert még magas hígításban / μ g/ml/ sem mutatkoznak a disszociáció jelei.

A sertés vázizom aldoláz inaktiválódásának kezdeti szakaszán megfigyelhető aktiválódás az aldoláz disszociációjakor létrejövő fellazult szerkezetű, metastabilis tetramér termék /42

kialakulásával magyarázható. E fellazult szerkezetű enzim - amelyhez a szubsztrátmolekulák könnyebben hozzáférnek, mint a nativ enzim esetén - valószínűleg stabilabb a sertés izom-aldoláz esetén, mint a nyul vázizom enzimmél; létezését ezáltal észlelhetjük a kezelések időgörbéinél.

Az inaktiválás további részében megfigyelhető összetett reakciómenet a disszociáció, illetve a bekövetkező izomerizáció /globuláris $\rightleftharpoons$ megnyult láncu fehérje/ együttes hatásként jön létre. Erre utalnak az extrém hőmérséklet /65°C/, a pH /5,0/, illetve az urea koncentráció /4,5 M/ értéknél létrejövő - az előzőektől eltérő - reakciómenetek.

Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a sertés és nyul vázizom aldoláz inaktiválódásánál fellépő eltérő reakciómenet az enzimek harmad, illetve negyedleges szerkezetének eltéréséből fakad. A két enzim primer szerkezete a rendelkezésünkre álló irodalmi adatok szerint alapvetően nem különbözik, mindössze néhány aminosav mennyiségében mutattak ki csekély eltérést /67/.

2. A sertés vázizom aldoláz rögzítése

Célunk az aldoláznak minél nagyobb hatásfokkal és stabilitással történő rögzítése volt.

A rögzítésnek a kovalens kémiai kötésekön keresztüli formáját választottuk, mivel csak ebben az esetben keletkezik jól definiálható, stabilis, széles szubsztrátkoncentráció-

tartományban alkalmazható molekuláris komplexum. A rögzítéshez a stabilabb - azaz a rögzítés behatásaira várhatóan kevésbé érzékeny, annak jobban ellenálló - sertés vázizom aldolázt használtunk. A sertés vázizom alkalmazásának további előnye, hogy olcsóbb nyersanyagból állitható elő.

A különböző típusu hordozók és kapcsolási eljárások kipróbálása során azt tapasztaltuk, hogy a sertés vázizom aldoláz kovalens kötésekkel legeredményesebben karboxil funkciós csoportokkal rendelkező - Akrilex C-100 - hordozón rögzíthető, vizoldható karbodiimides aktiválással. Az aldoláznak ez a kis aktivitásveszteséggel történő bekötődése meglepő, mivel a rögzítés során a fenti hordozóval kialakuló savamid kötésekben elsősorban az enzim szabad aminocsoportjai vesznek részt, és az enzim aktiv centrumában is egy lizil oldallánc ϵ -aminocsoportja található /53/. A jelenség a hordozó aktiválása során keletkező, nagy térkitöltésű o-acil-izourea származék létrejöttével magyarázható, amely sztérikus okok miatt nem tud behatolni az enzim aktiv centrumába.

Az aldoláznak a Szilokrom-aldehid hordozóhoz való rögzítése során bekövetkező nagyobb méretű aktivitásvesztesége részben az aktiv centrum amino-csoportjainak megváltozásával, részben pedig sztérikus hatásokkal /az aktiv centrum lefedése a hordozó vagy a szomszédos enzim molekula által, illetve több oldalláncon keresztüli kötés/ magyarázható.

Rögzítési kísérleteink során a legkisebb stabilitást a salétromsav maradékkal aktivált Akrilex AH-100 hordozó alkalmazásával értünk el.

3. Az oldott és rögzített aldolázok tulajdonságainak összehasonlítása

A rögzítés során az enzim és a hordozó között kialakuló kölcsönhatások miatt megváltozhatnak a katalitikus tulajdonságok, ezért fontos a rögzített enzimek katalitikus tulajdonságainak és stabilitásának összehasonlítása az oldott enzimével.

Az Akrilex-aldoláz katalitikus tulajdonságai csak kis mértékben térnek el az oldott enzimétől. A rögzített enzim pH-optimuma kis mértékben alkalikus irányba tolódott el az oldott enzim pH-optimumához képest / a vizsgálatot azonos ionerősségű közegben végeztük/. Ezt a jelenséget tapasztalták Szajáni, illetve Kovács és munkatársai az Akrilex C-100 gélen rögzített aminoaciláz /69/ illetve kolineszteráz /70/ esetén is. A jelenség a poliamionos mikrokörnyezet hatásával, illetve a rögzítés során fellépő néhány aminosav oldallánc módosulásával magyarázható /11/.

A Michaelis-állandó értéke az oldott enzimeknél mintegy ötször nagyobb, mivel a szubsztrát és a mátrix egyaránt negatívan töltött. Hasonló jelenséget tapasztaltak japán kutatók /76/ az élő szervezet sejtmembránhoz kötött aldolázainál is.

A katalitikus aktivitás látszólagos hőmérsékleti maximumában a rögzítés eredményeként jelentkező magasabb optimumérték a megnövekedett hőstabilitás következménye.

A hőinaktiválási és az urea denaturáló hatását vizsgáló kísérletek azt mutatják, hogy az Akrilex-enzim az oldottnál sokkal stabilabb..A rögzítés során az enzim molekula és a gél megfelelő csoportjai között létrehozott kovalens kötések rögzítik az enzim aktiv konformációját és így csak erőteljesebb denaturáció hatására változik a harmad és negyedleges szerkezet. A hőinaktiválódás bonyolult, többlépcsős folyamat, amely erősen pH függő.

A hőinaktiválást, valamint az urea hatására bekövetkező denaturációt egy jellegzetes aktiválódás vezeti be, amely az oldott enzimnél is megfigyelhető. A jelenséget itt is a szerkezet fellazulásával magyarázhatjuk, amely a rögzítés során kialakuló és a katalitikus aktivitást zavaró laza kötések felszakadásának következménye.

A sertés vázizom aldoláz aldehid funkciós csoportokat tartalmazó Szilokrom gélhez történő rögzítése során, az Akrilex C-100 hordozókhoz való kötéshez viszonyítva, lényegesen nagyobb az aktivitásvesztés, azonban azonos térfogatú géleket vizsgálva - mivel a Szilokrom gél nem duzzad - az Akrilex gélen mérhető a kisebb térfogati aktivitás.

A Szilokrom-aldoláz katalitikus tulajdonságai az Akrilex-enziméhez hasonlóan módosultak, viszont az enzim stabilitása kisebb ennél. A hőinaktiválódás sebessége nagyobb, mint az oldott enzimé, viszont az urea hatása kevésbé érvényesült, a mikrokörnyezeti hatások miatt.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

Az aldoláz sertés vázizomból történő izolálására Taylor nyul vázizom aldoláz izolálására leírt módszerét módosítottuk, ezáltal nagy specifikus aktivitású, tiszta enzimet állítottunk elő, jó kitermeléssel.

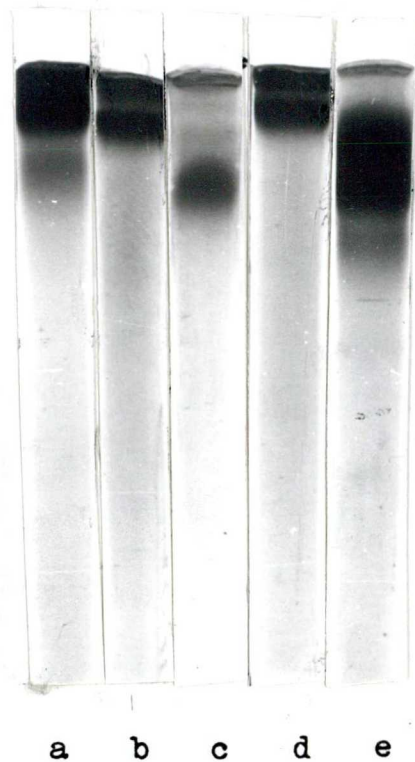
Az enzim katalitikus tulajdonságait tekintve nem különbözik a nyul vázizom aldoláztól, stabilitását tekintve azonban lényeges különbségeket találtunk.

Rögzítési kísérleteink során megállapítottuk, hogy a sertés vázizom aldoláz kovalens kötésekkel a legeredményesebben karboxil funkciós csoportokkal rendelkező Akrilex C-100 hordozóhoz rögzíthető, vízolátható karbodiimides aktivitással.

A rögzített aldoláz katalitikus tulajdonságai csak kis mértékben térnek el az oldott enzimétől, viszont a stabilitás nagyobb.

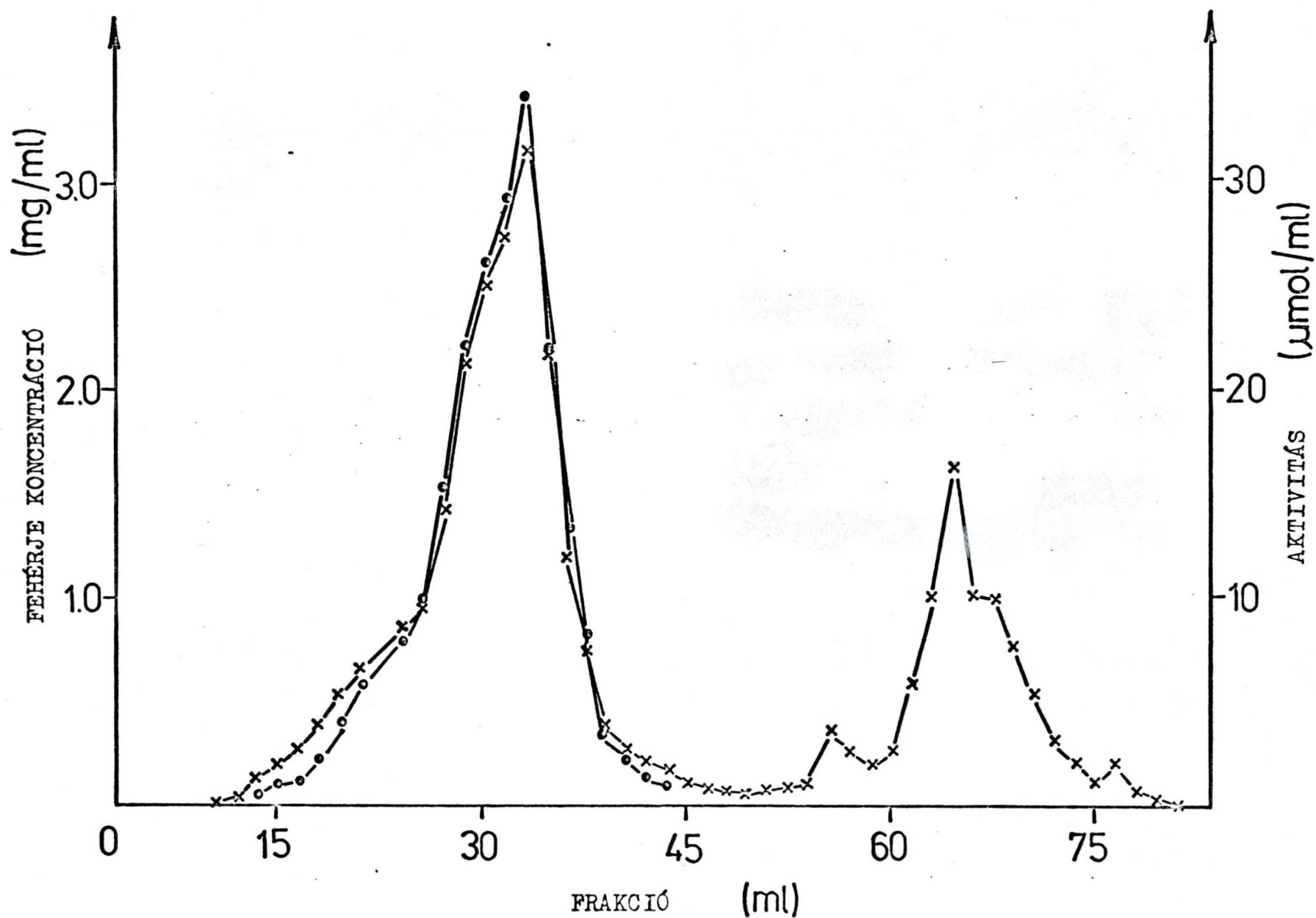
A Szilokrom-aldoláz katalitikus tulajdonságai az Akrilex-enziméhez hasonlóan módosultak, csupán stabilitása kisebb ennél.

VIII. ÁBRÁK



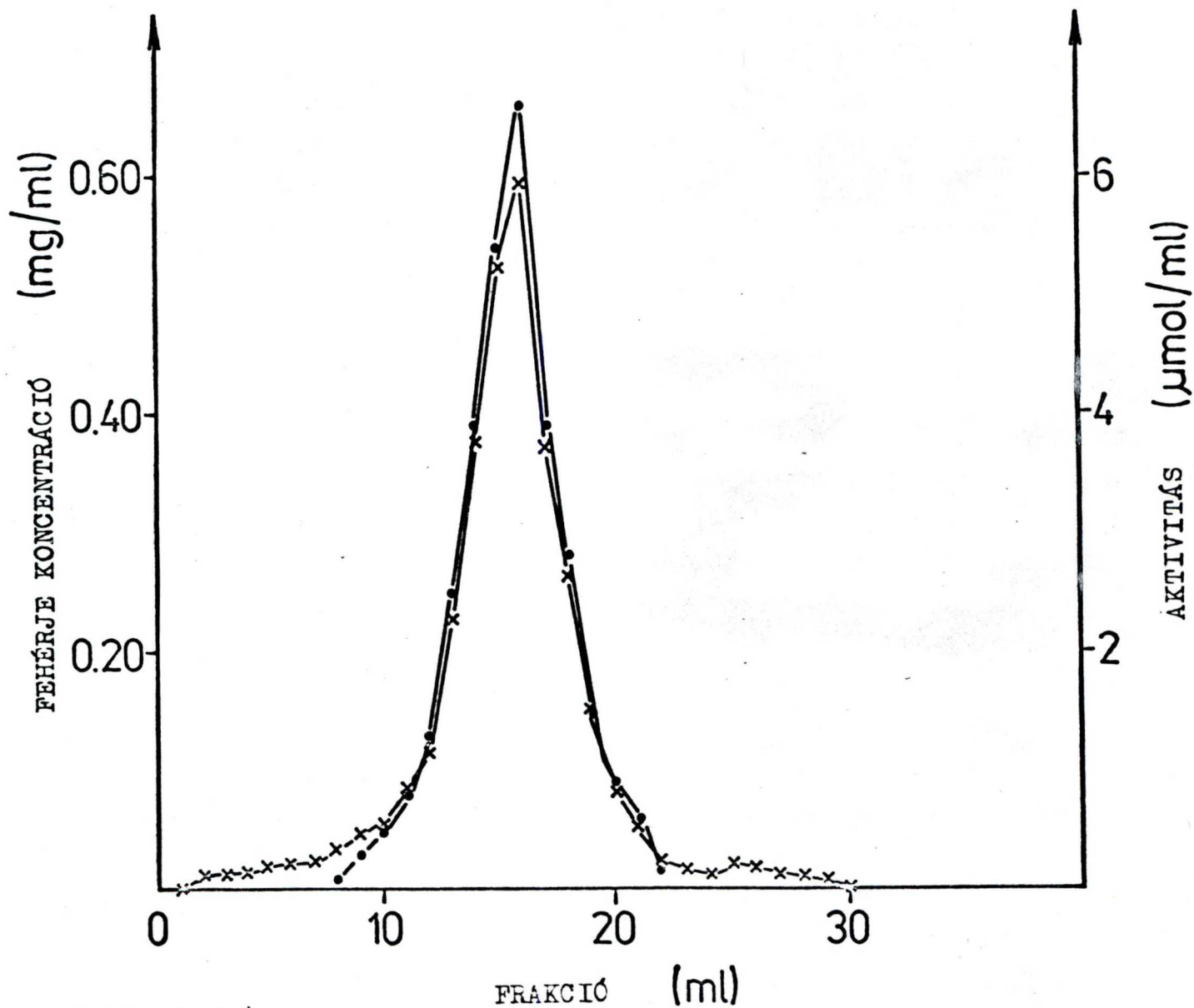
1. ábra. Aldoláz homogenitásának vizsgálata gélelektroforézissal.

- a./ Négyyszer átkristályosított sertés vázizom aldoláz elektroferogramja /fehérjére festve/.
- b./ DEAE oszlopon tisztított sertés vázizom aldoláz aktív frakciójának fehérjére festett elektroferogramja.
- c./ Az inaktív frakció elektroforetikus képe fehérjére festve.
- d./ Az aktív frakció aktivitásra festett elektroferogramja.
- e./ Háromszor átkristályosított nyúl vázizom aldoláz elektroferogramja /fehérjére festve/.



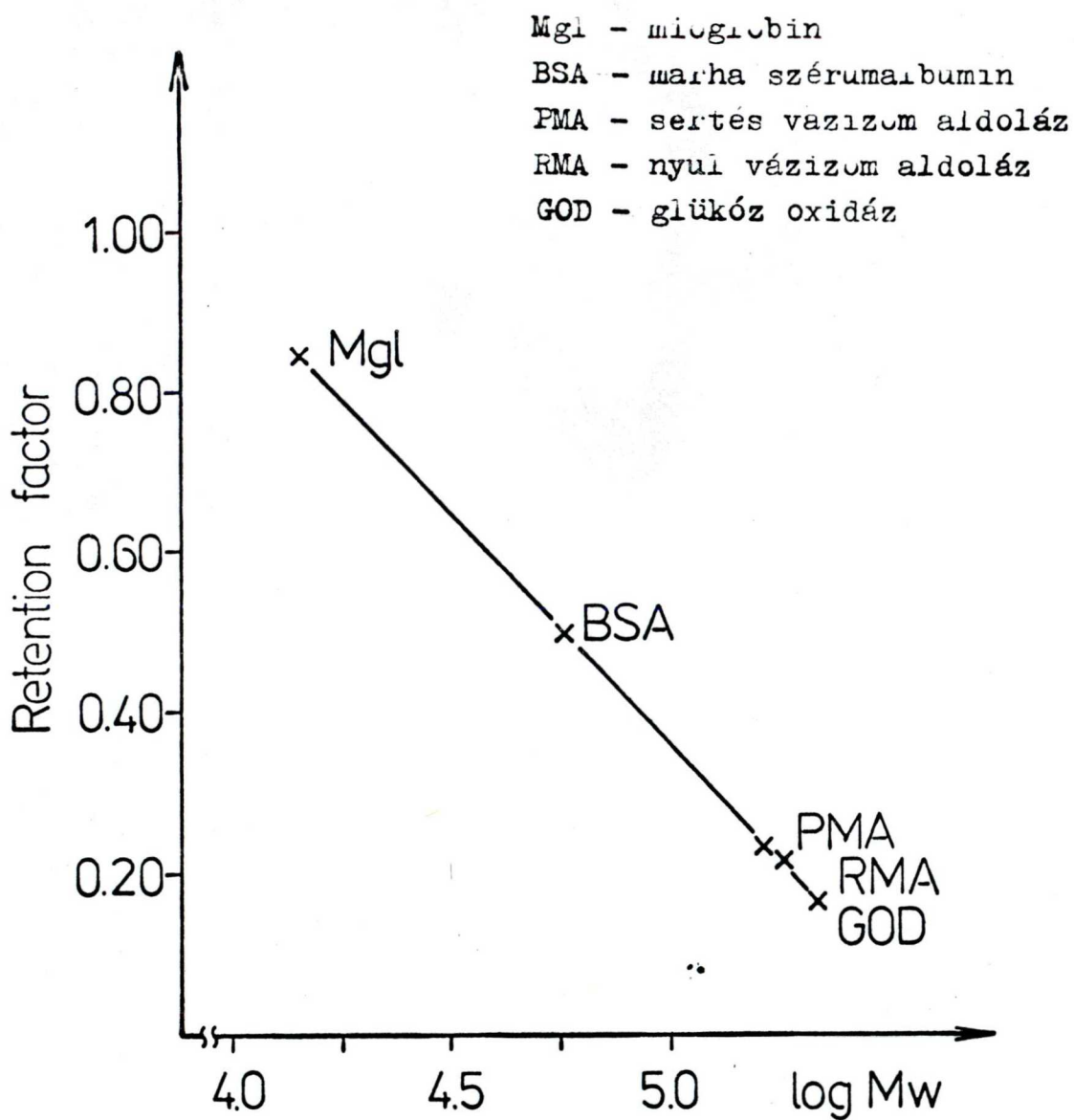
2. ábra Sertés vázizom aldoláz tisztítása DEAE cellulóz oszlopon

Jelölések: --•-- aktivitás; --x-- fehérje



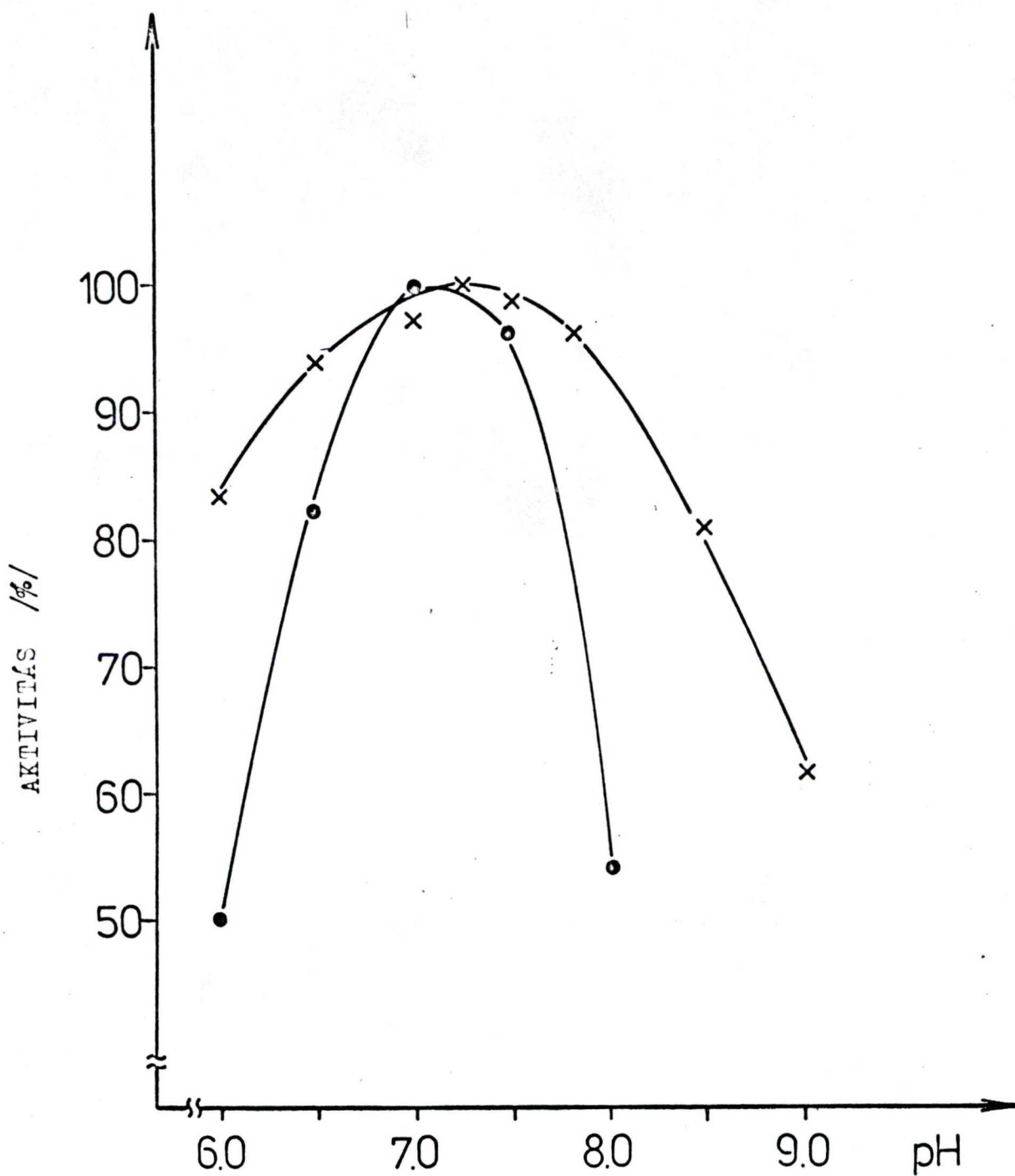
3. ábra DEAE cellulózon tisztított sertés vázizom alkoholáz aktiv
frakciójának gélaromatográfiája Sephadex G-200 oszlopon

Jelölések: -•- aktivitás; -x- fehérje

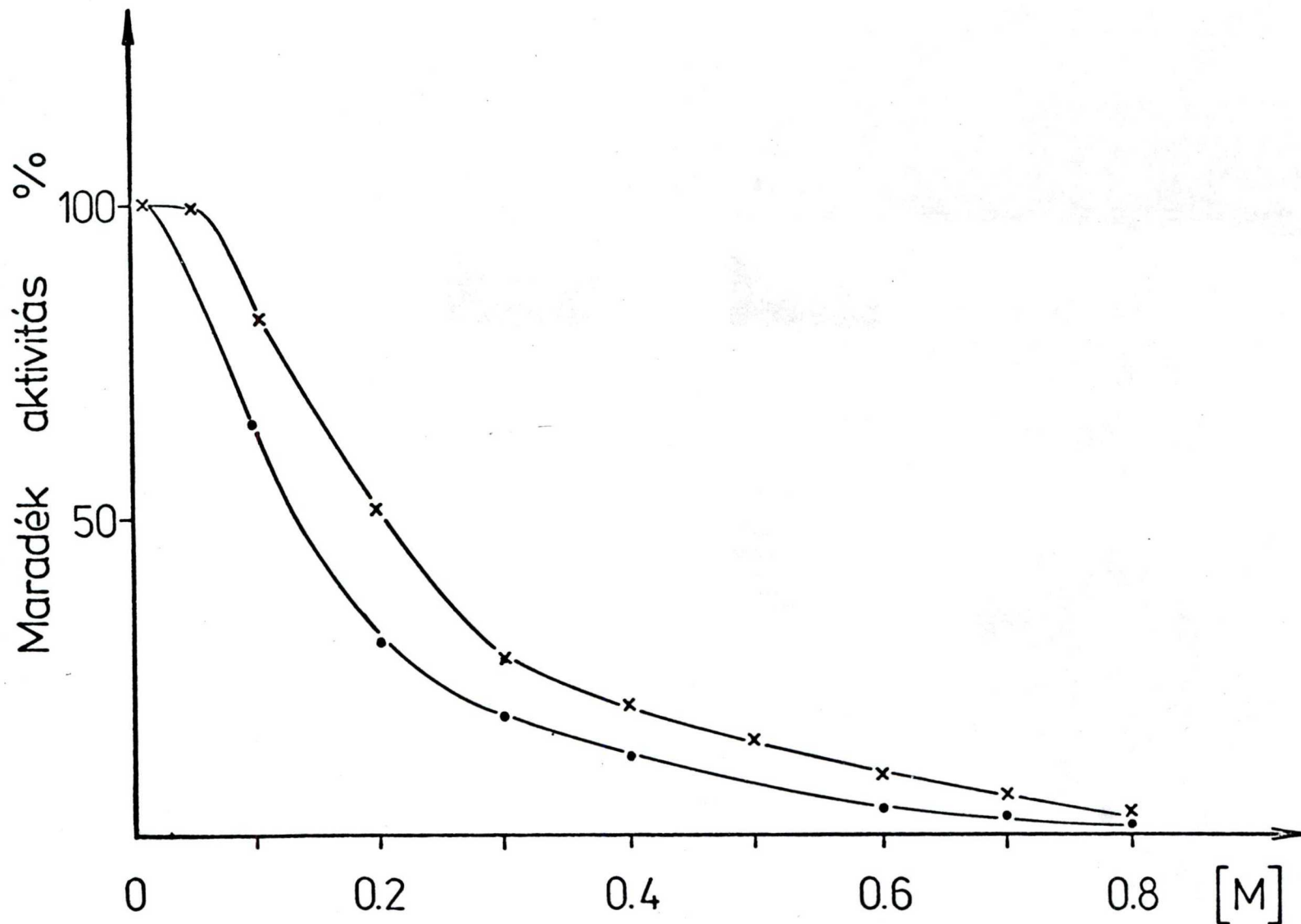


4. ábra Sertés vázizom aldoláz molekulatömegének meghatározása SDS gélelektroforézissal

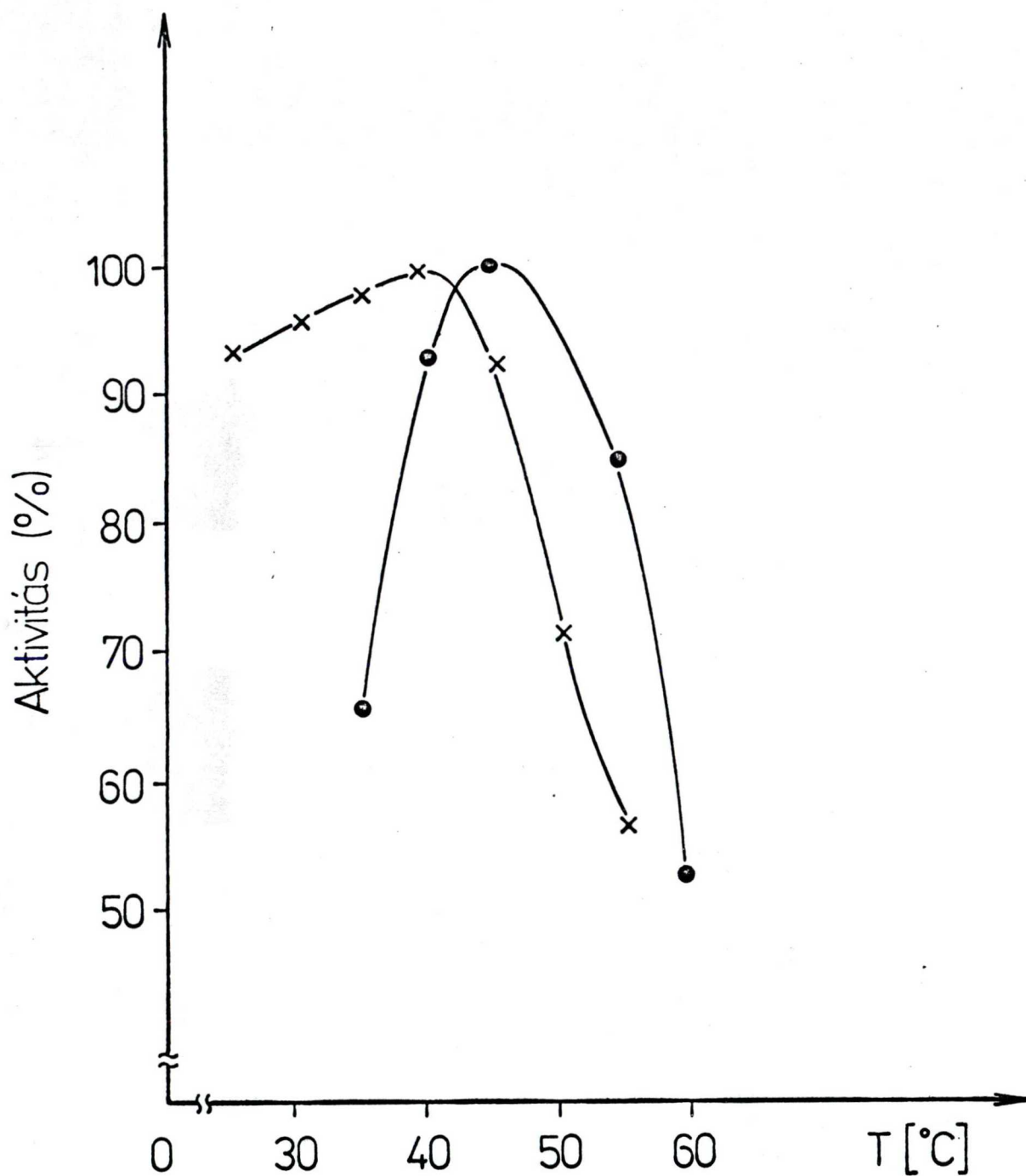




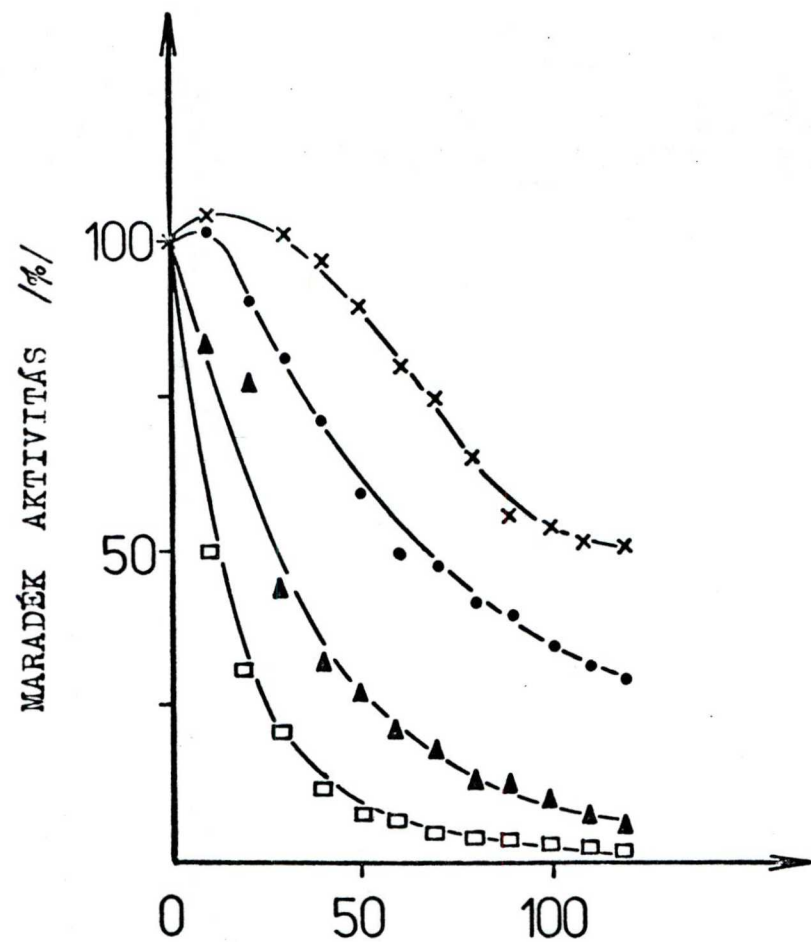
5. ábra Az aktivitás pH függése sertés és nyúl vázizom aldoláznál. A mérés pH=6,0-7,5 tartományban 0,05M foszfát-, pH=7,0-9,0 tartományban 0,05M TRIS/HCl pufferben történt. Jelölések: -x- sertés vázizom aldoláz;
 --- nyúl vázizom aldoláz.



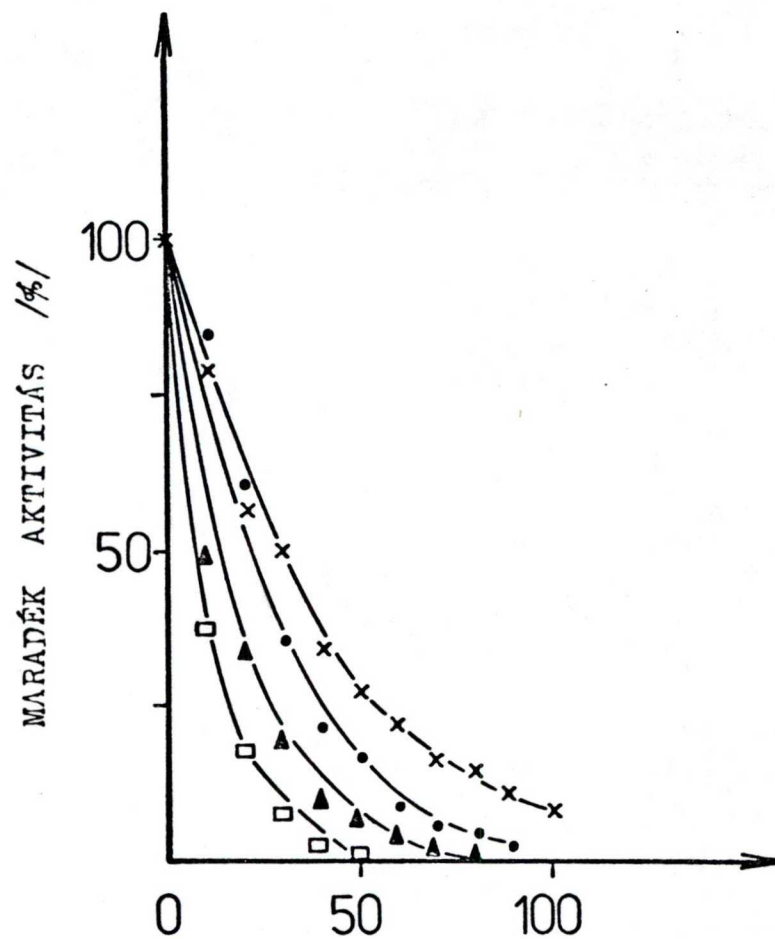
6. ábra Sertés és nyúl vázizom aldoláz aktivitásának foszfát koncentráció függése, pH= 7,0 foszfát pufferben, 25°C-on.
Jelölések: -x- sertés-, -•- nyúl vázizom aldoláz.



7. ábra Sertés és nyúl vázizom aldoláz aktivitásának hőmérsékletfüggése, 0,05M TRIS/HCl pufferben, pH=7,5.
 Jelölések: -x- sertés vázizom aldoláz;
 -•- nyúl vázizom aldoláz.



IDŐ /PERC/



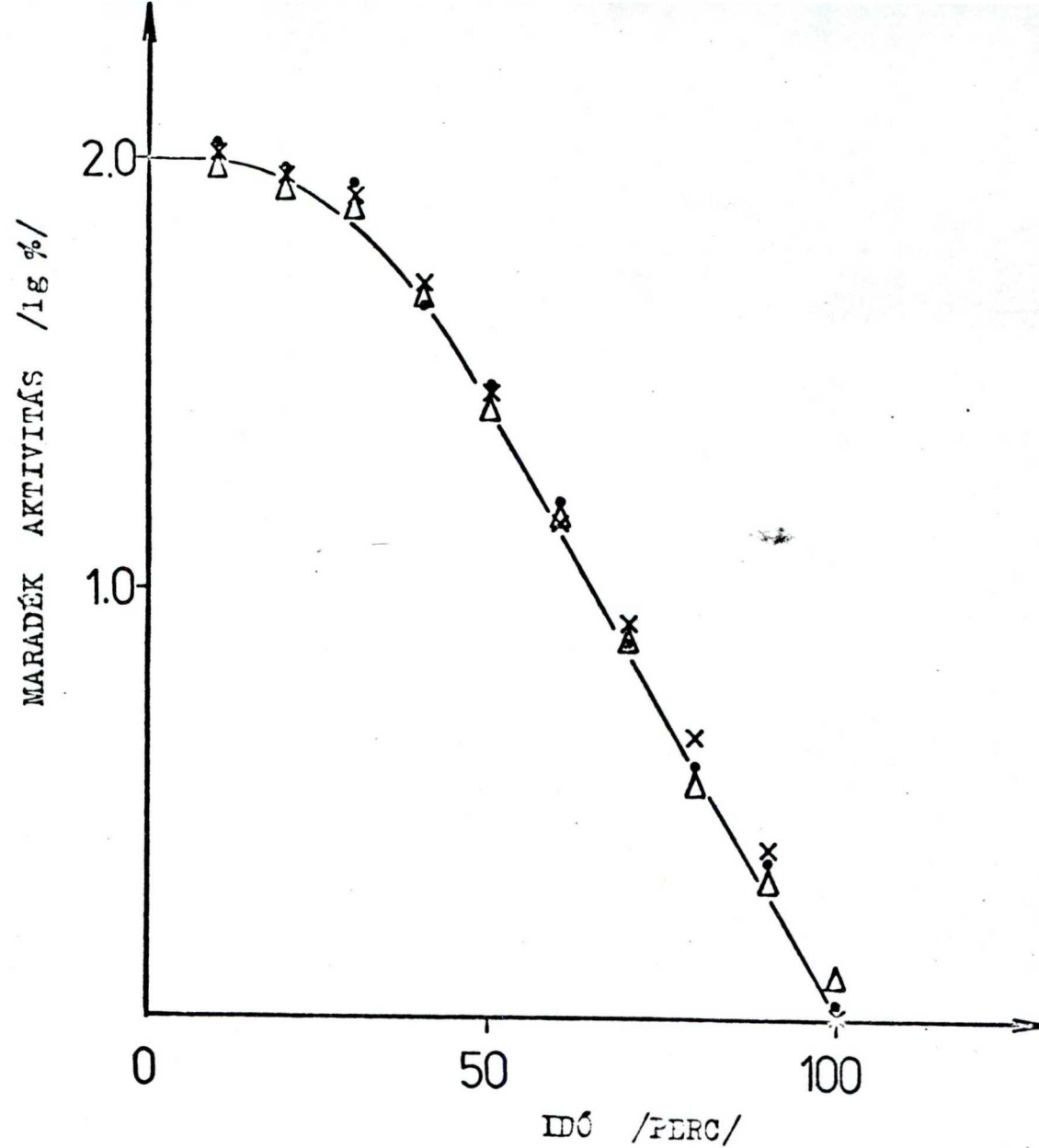
IDŐ /PERC/

9. ábra Az aldoláz hőinaktiválási kinetikája, 0,05M TRIS/HCl puffer, pH=7,5

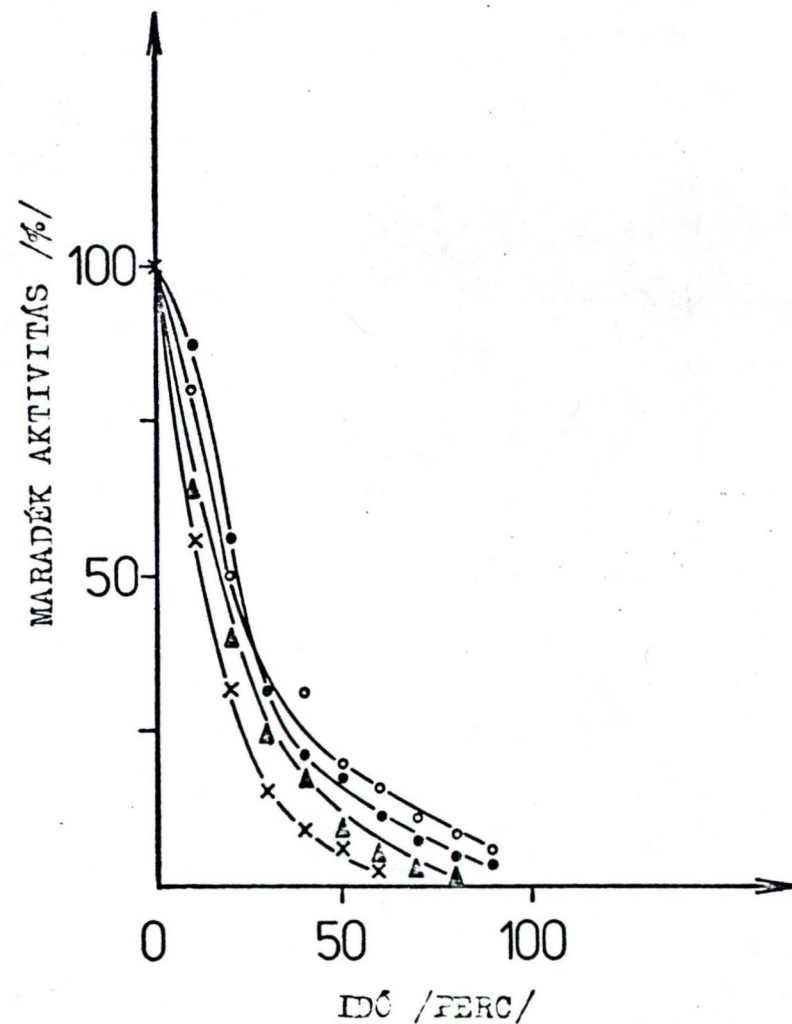
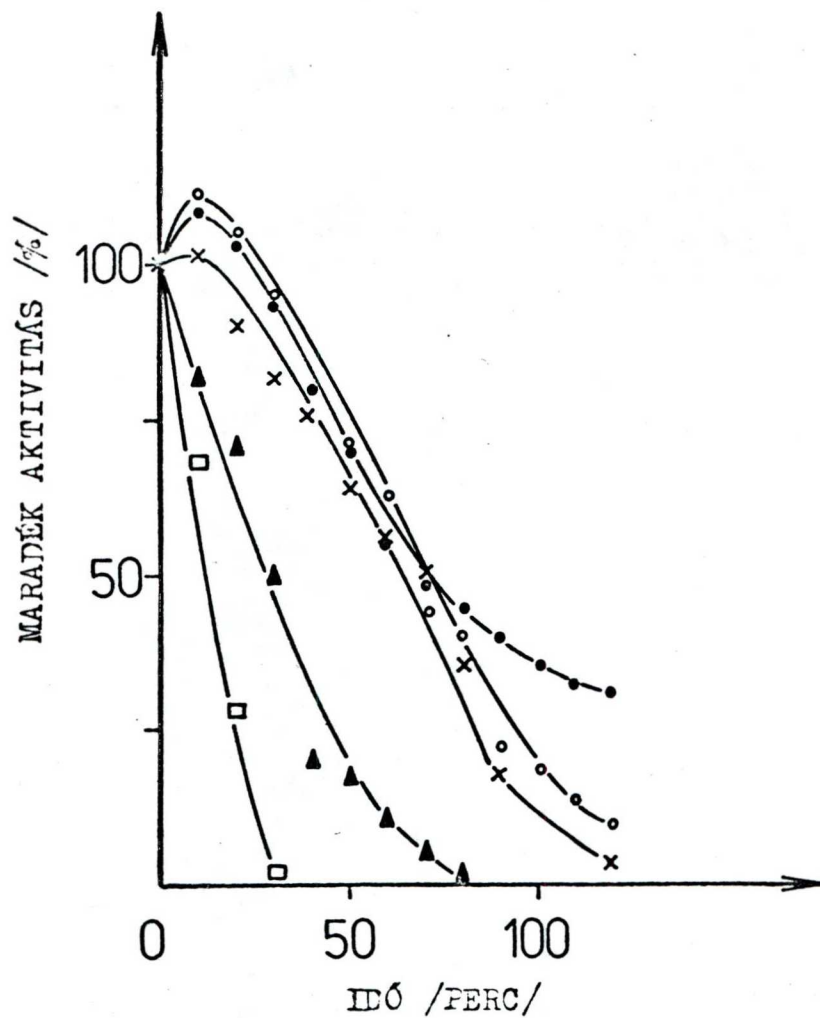
a/ sertés vázizom aldoláz

b/ nyul vázizom aldoláz

Jelölések: 50°C -x-; 55°C -•-; 60°C -▲-; 65°C -◻-.



10. ábra Sertés vázizom aldoláz hőinaktiválódásának fehérjekoncentrációtól való függése, 55°C hőmérsékleten, 0,05M TRIS/HCl pufferben pH=7,5
Jelölések: -x- 0,01mg/ml; -•- 0,1mg/ml; -Δ- 1,0mg/ml.



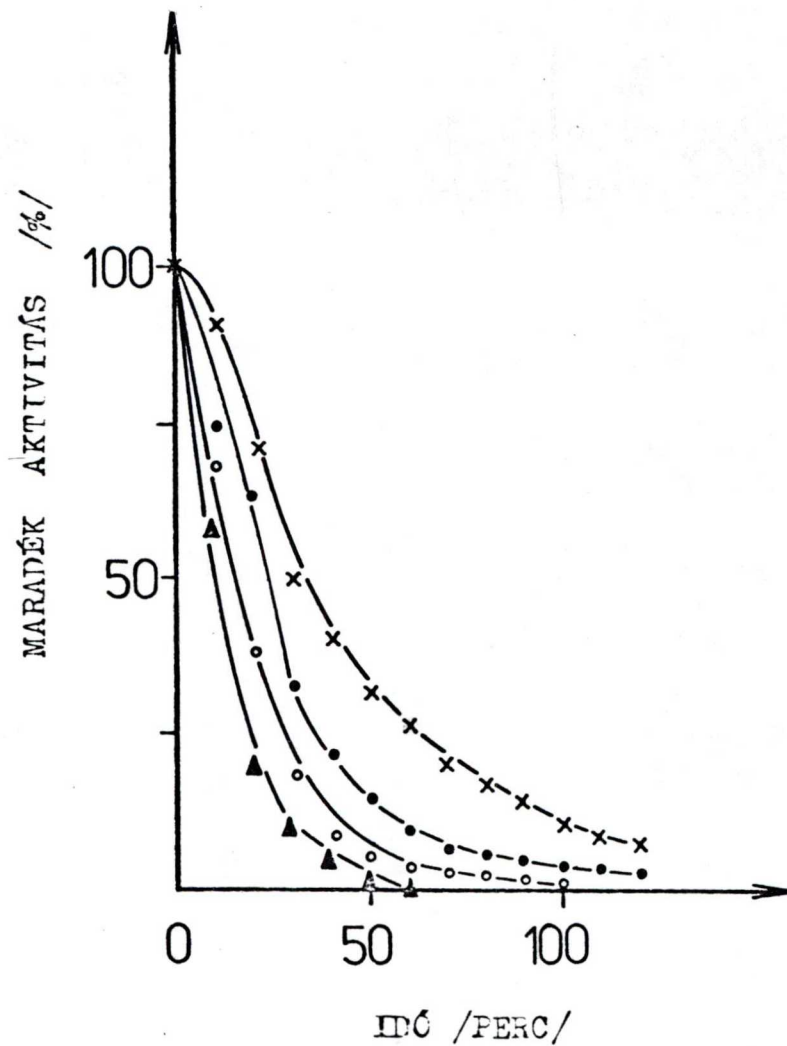
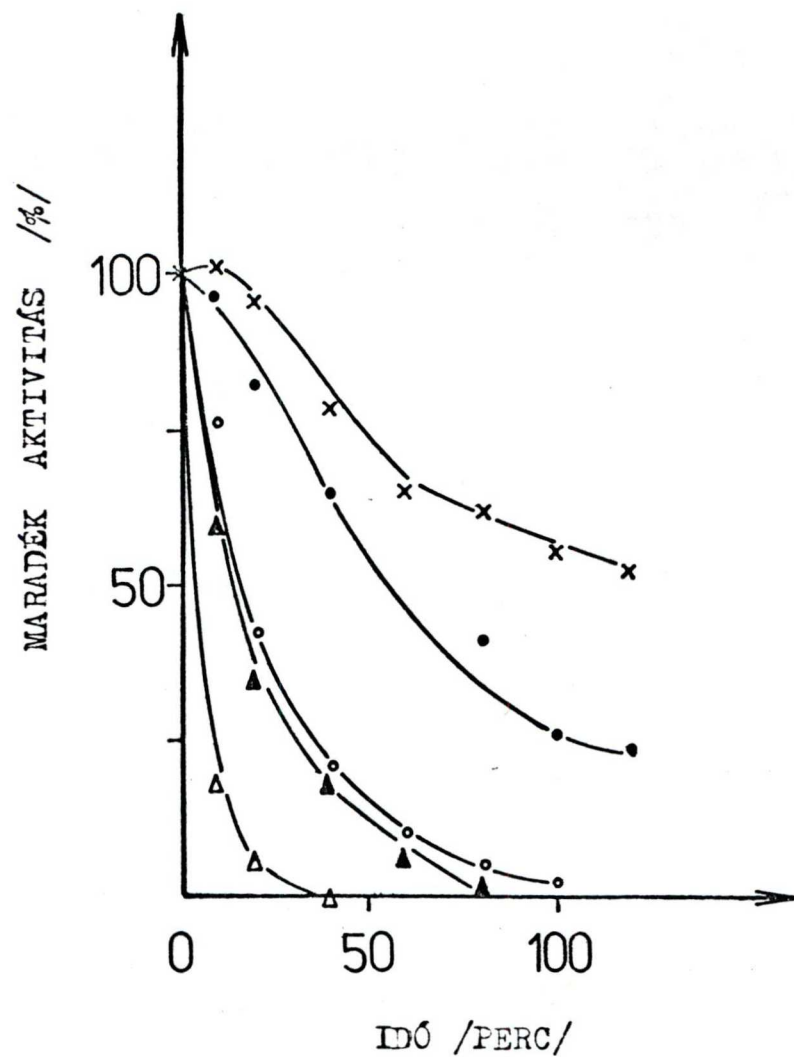
11. ábra Az aldoláz hőinaktiválódásának pH függése, 55°C-on. A pufferek 0,05M-osak

voltak: pH=5,0-nél acetát; pH=6,0-7,0 foszfát; pH=7,0-8,5 TRIS/HCl

a/ Sertés vázizom aldoláz

b/ Nyúl vázizom aldoláz

Jelölések: -□- pH=5,0; -x- pH=6,0; -o- pH=7,0; -.- pH=7,5; -▲- pH=8,5

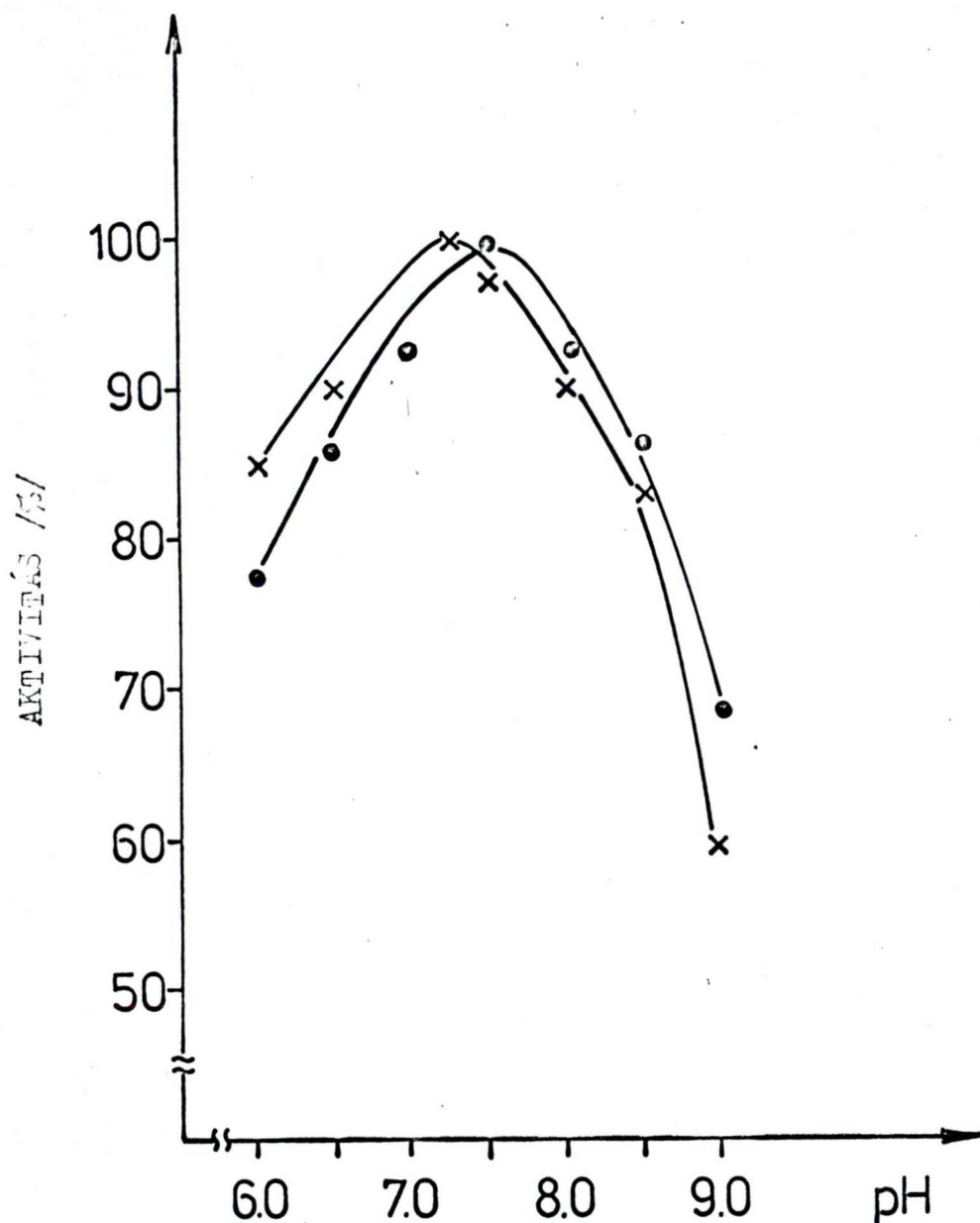


12. ábra Urea hatása az alkoholáz aktivitására, 0,1 M TRIS/HCl pufferben pH=7,5

a/ Sertés vázizom alkoholáz

b/ Nyúl vázizom alkoholáz

Jelölések: -x- 1 M; -•- 2 M; -○- 3 M; -▲- 4 M; -Δ- 5 M urea

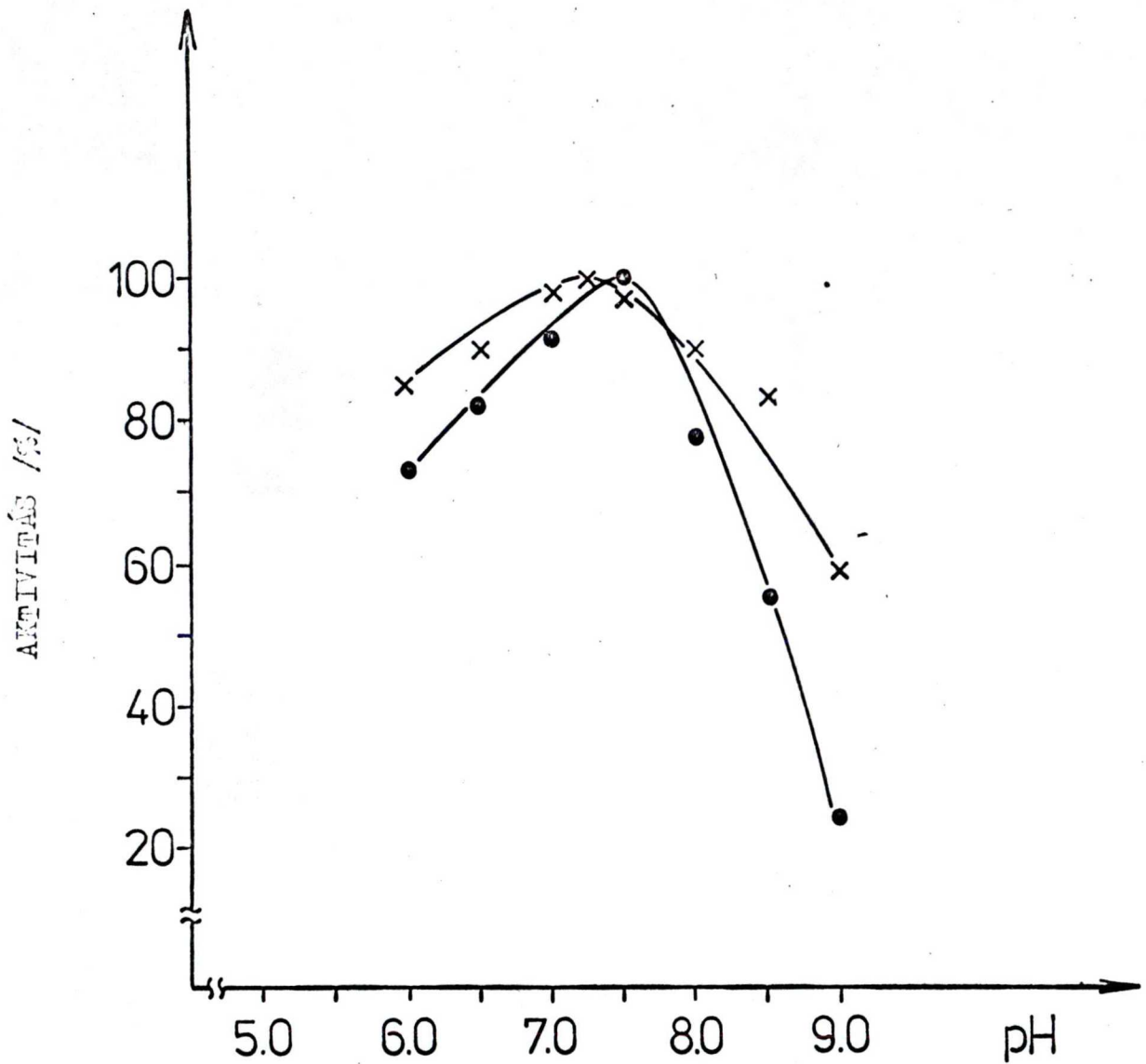


13/a ábra Akrix-aldoláz aktivitásának pH függése, 25°C-on mérve

Pufferek: 0,05 M foszfát pH=6,0-8,0

0,05 M TRIS/HCl pH= 7,0-9,0

Jelölések: ●- Akrix-aldoláz; x- Oldott aldoláz

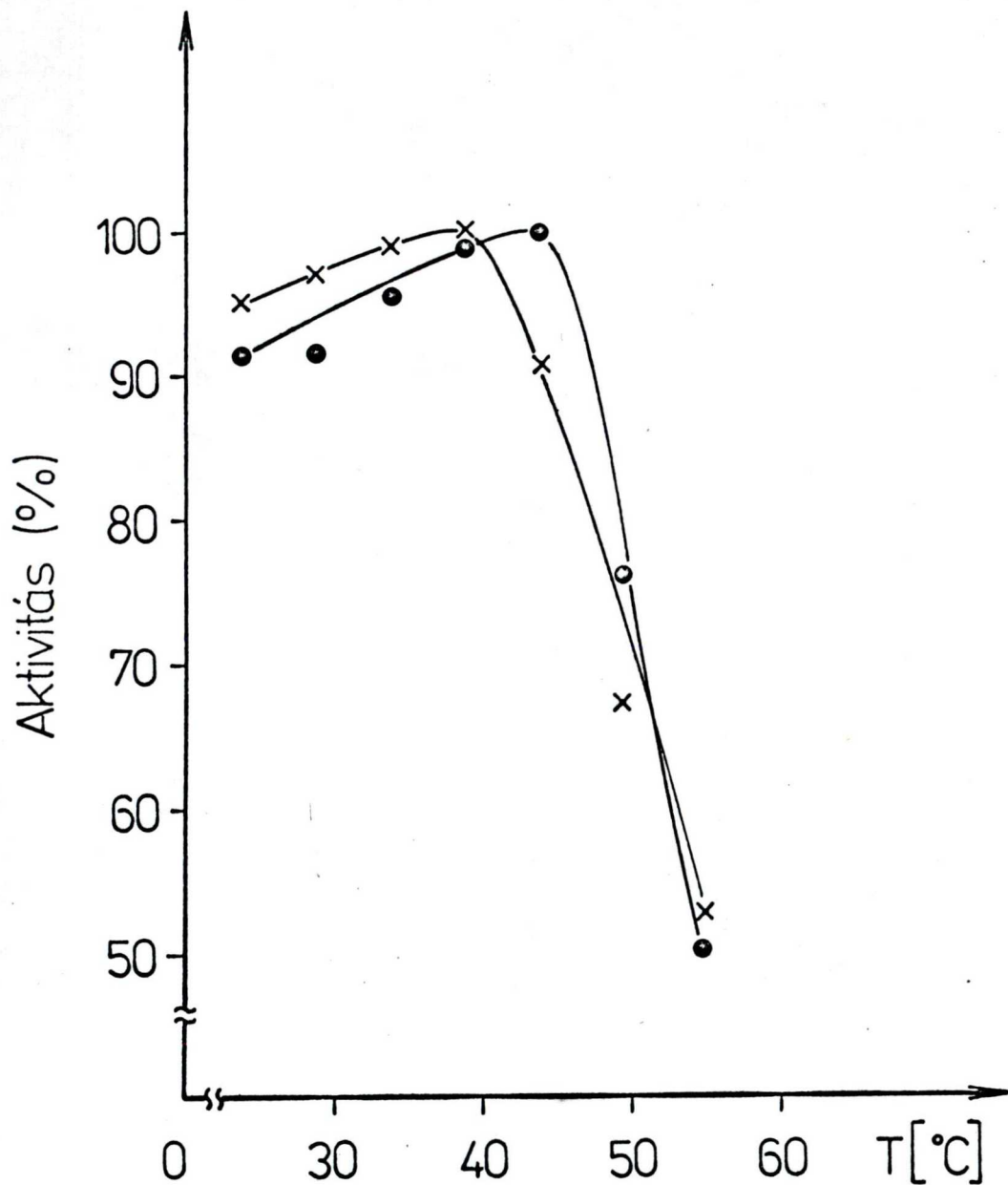


13/b ábra Szilokrom-aldoláz aktivitásának pH függése, 25°C-on mérve.

Pufferek: 0,05 M foszfát pH=6,0-8,0

0,05 M TRIS/HCl pH=7,0-9,0

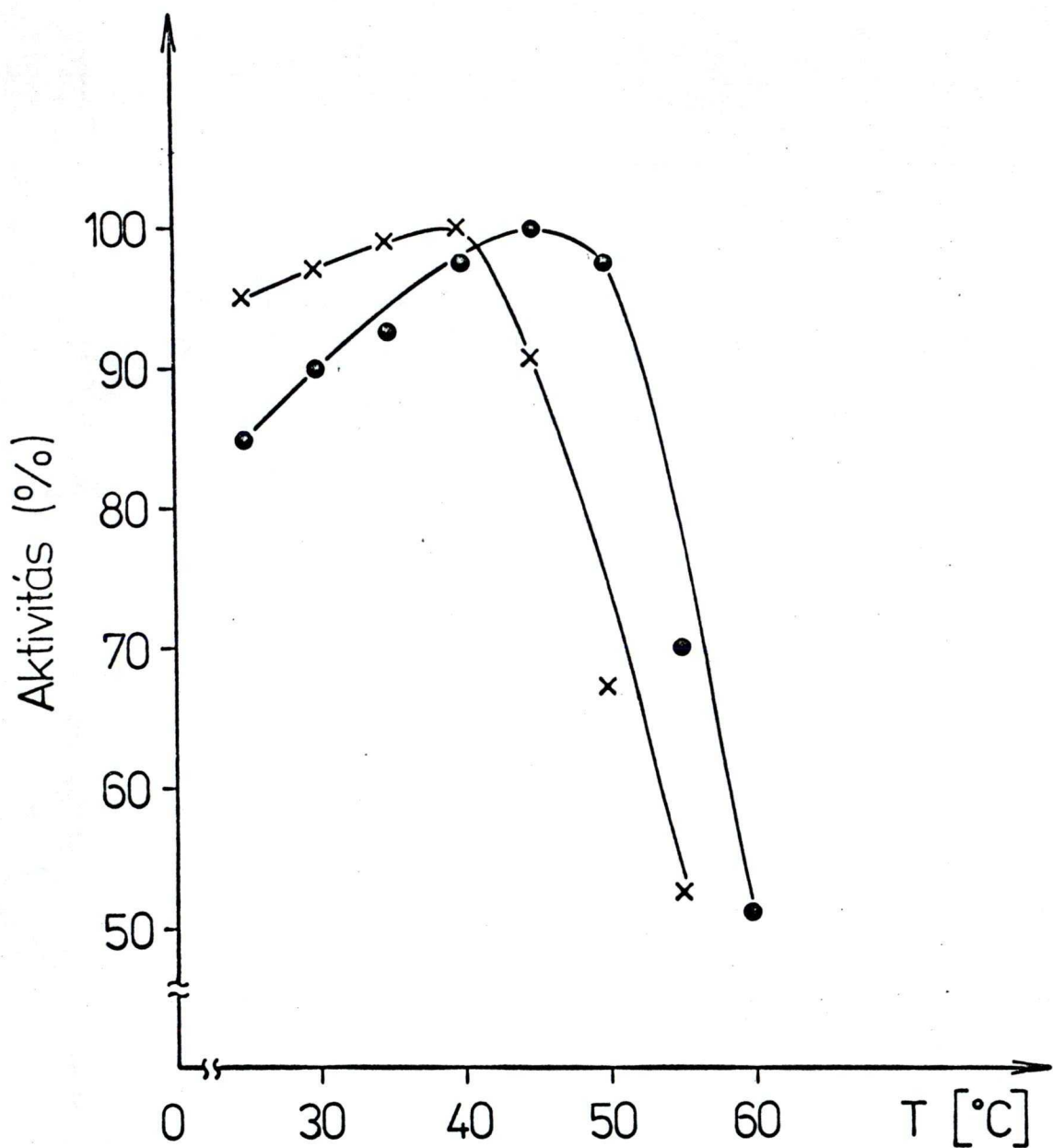
Jelölések: -●- Szilokrom-aldoláz; -x- Oldott aldoláz



14/a ábra Akrix-aldoáz aktivitásának hőmérséklet függése

0,05 M TRIS/HCl pufferben pH=7,5.

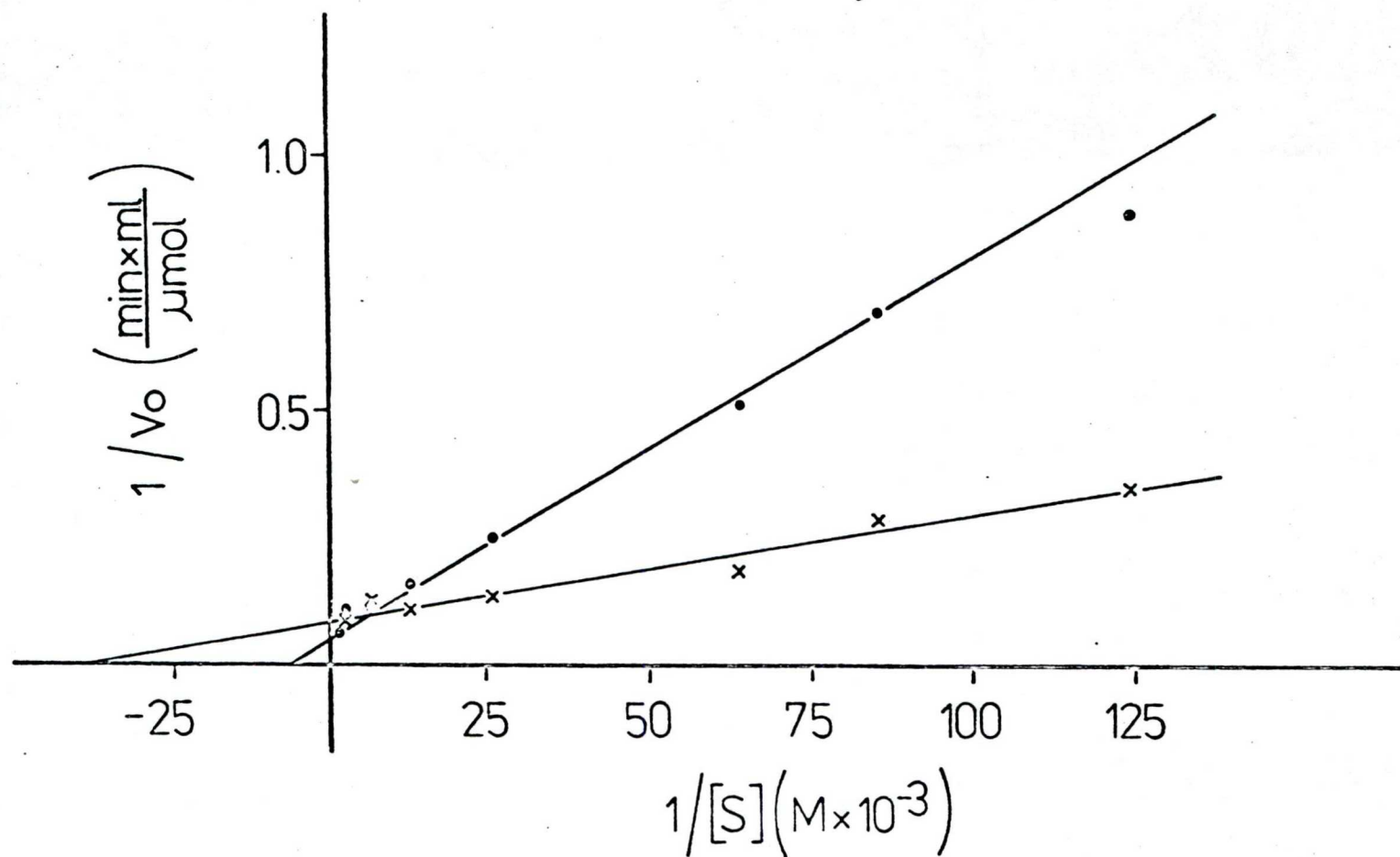
Jelölések: -●- Akrix-aldoáz; -x- Oldott enzim



14/b ábra Szilokrom-aldoláz aktivitásának hőmérséklet függése

0,05 M TRIS/HCl pufferben pH=7,5.

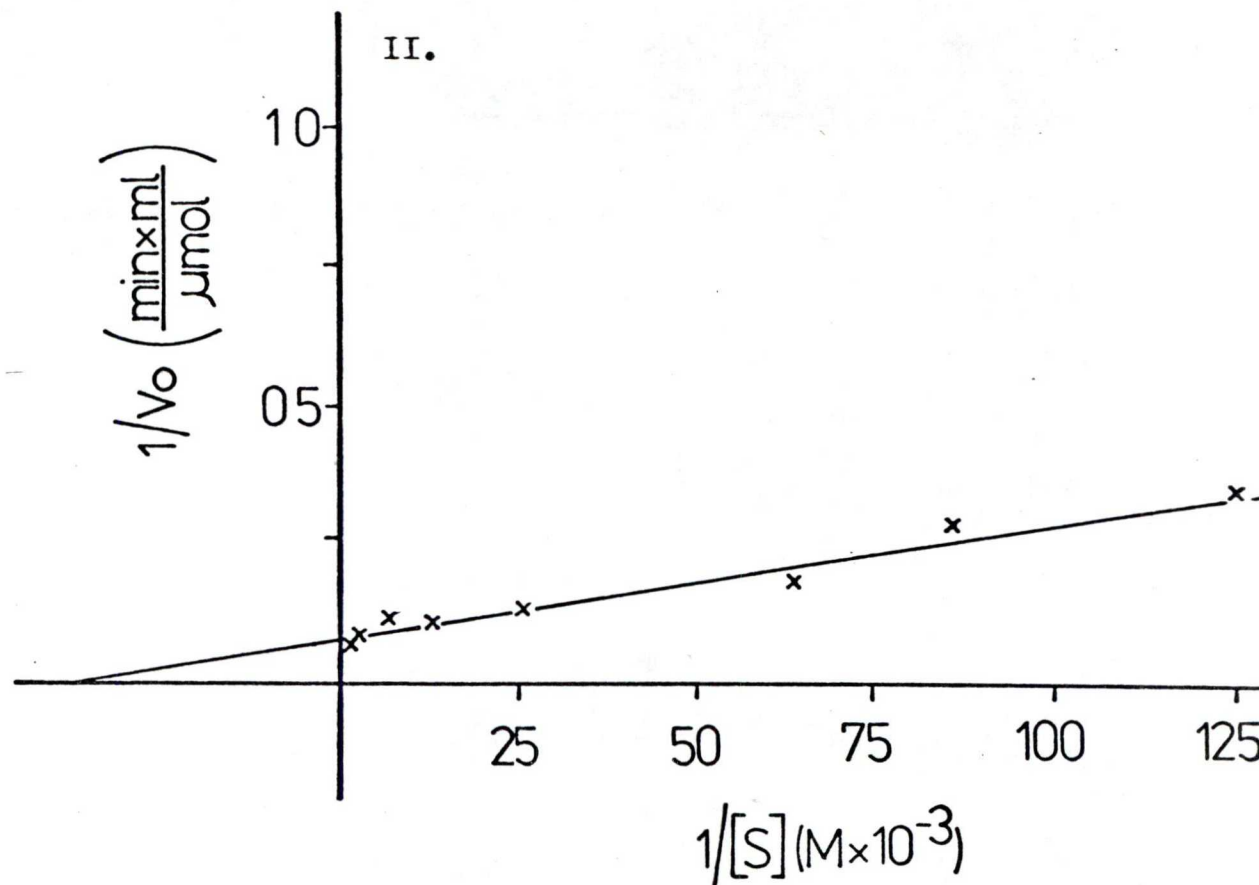
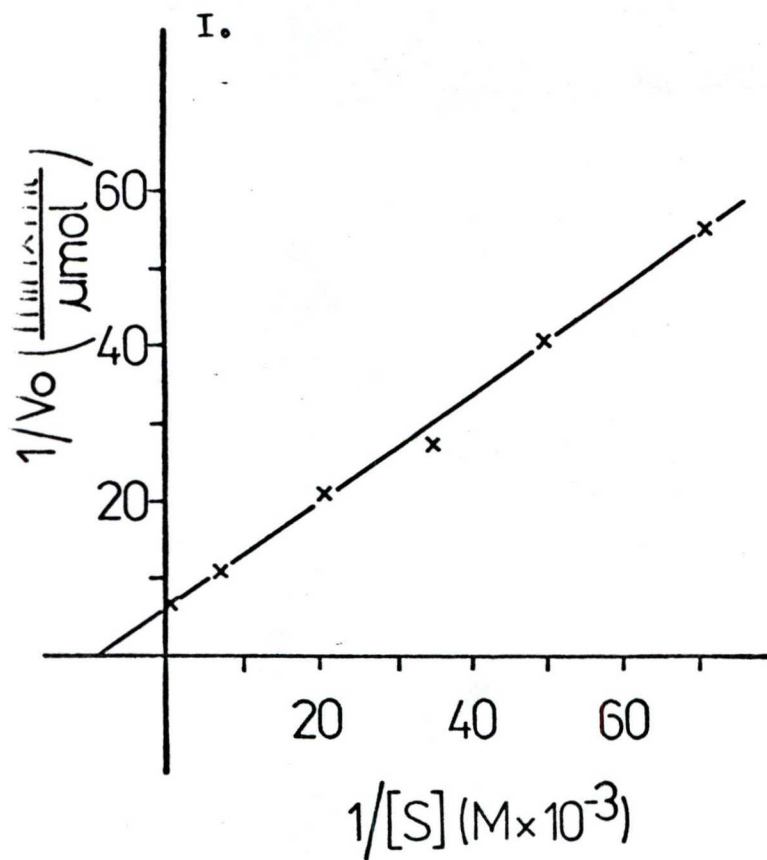
Jelölések: ●- Szilokrom-aldoláz; -x- Oldott enzim



15/a ábra Szubsztrát-koncentráció hatása az Akrix-alkoholáz aktivitására

0,05 M-os TRIS/HCl puffer pH=7,5; hőmérséklet: 25°C.

Jelölések: -●- Akrix-alkoholáz; -x- Oldott enzim

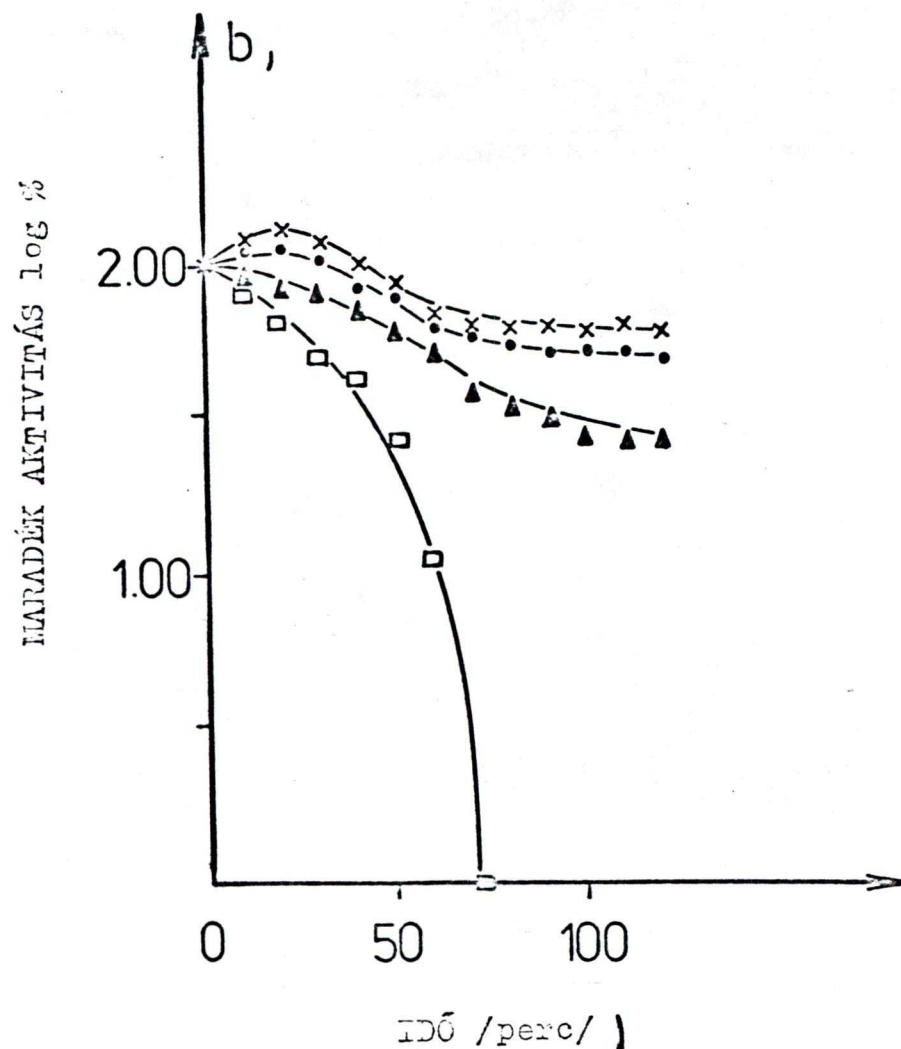
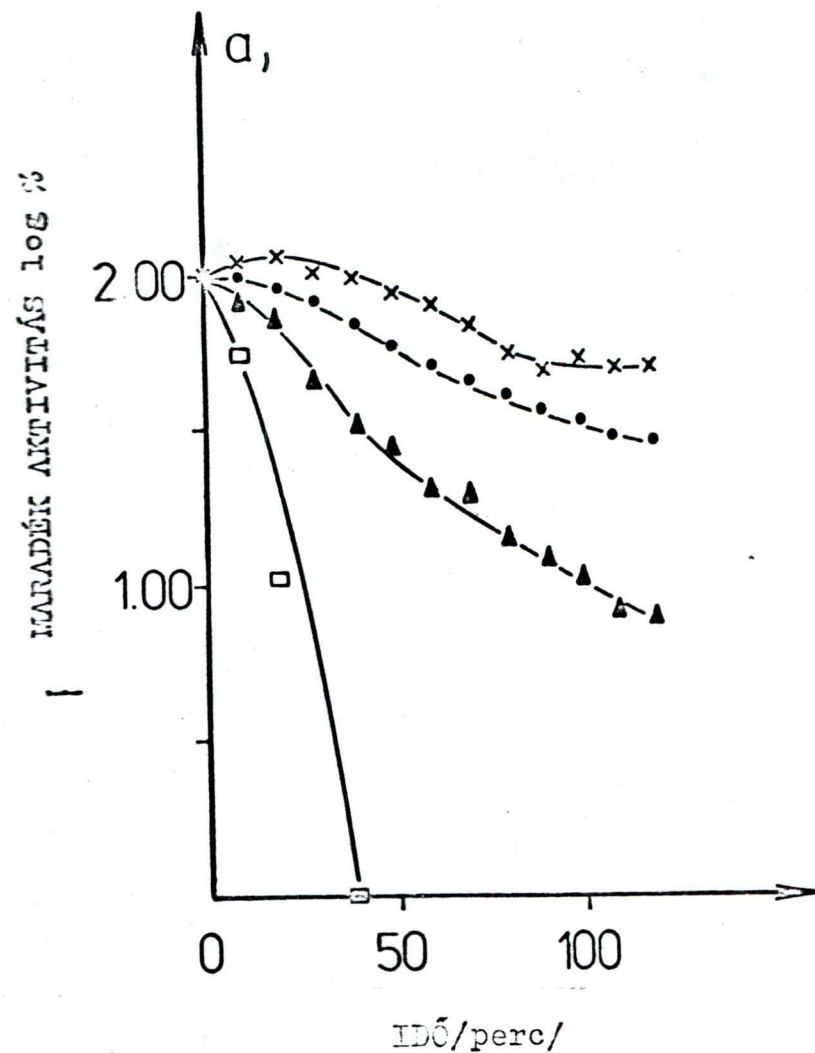


15/b ábra Szubsztrát-koncentráció hatása a Szilokrom-aldoláz aktivitására

0,05. M-os TRIS/HCl puffer pH=7,5; hőmérséklet: 25°C

I. Szilokrom-aldoláz

II. Olcott enzim



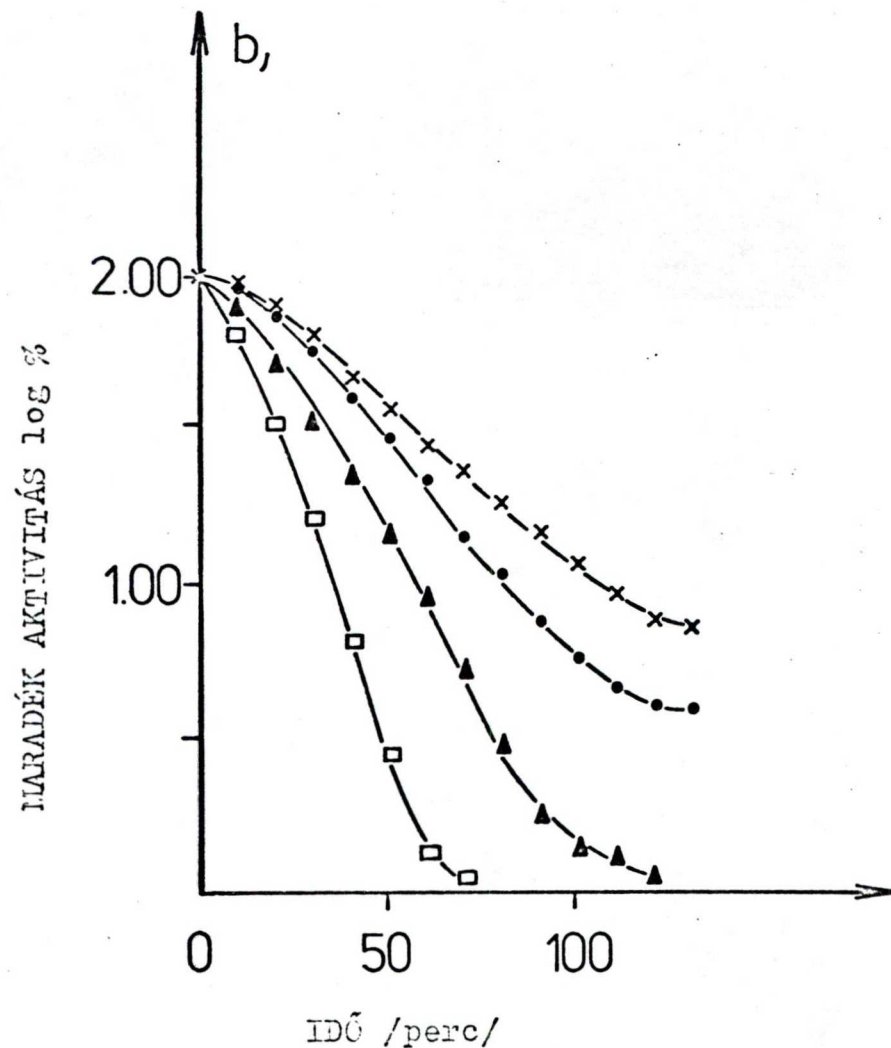
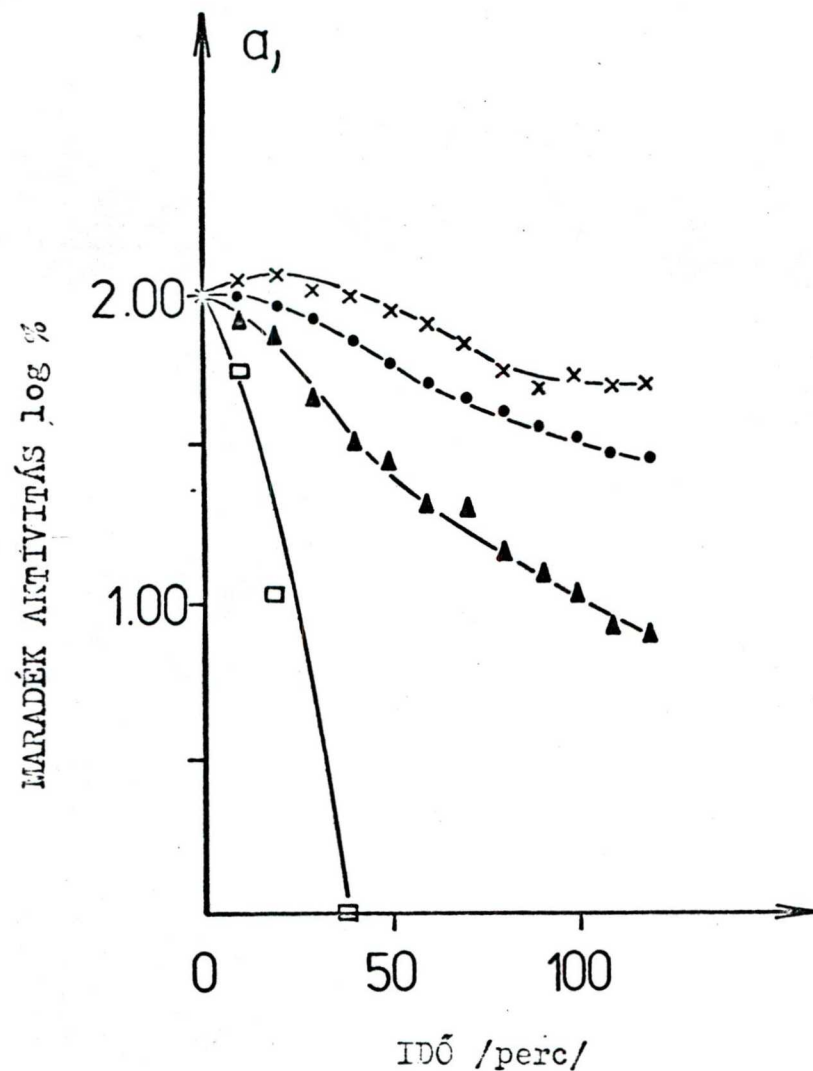
16. ábra Akrilex-alcoláz hőinaktiválódási kinetikája

0,05 M-os TRIS/HCl puffer pH=7,5

a/ Olcott alcoláz

b/ Akrilex-alcoláz

Jelölések: -x- 50°C; -•- 55°C; -▲- 60°C; -◻- 65°C



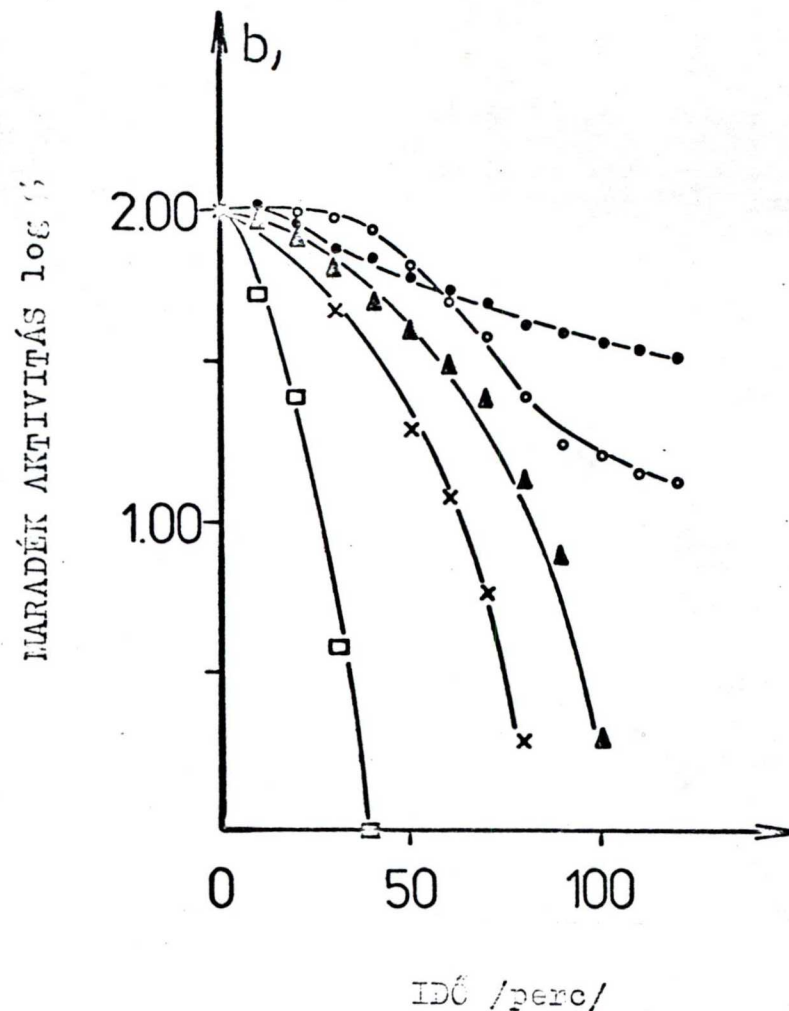
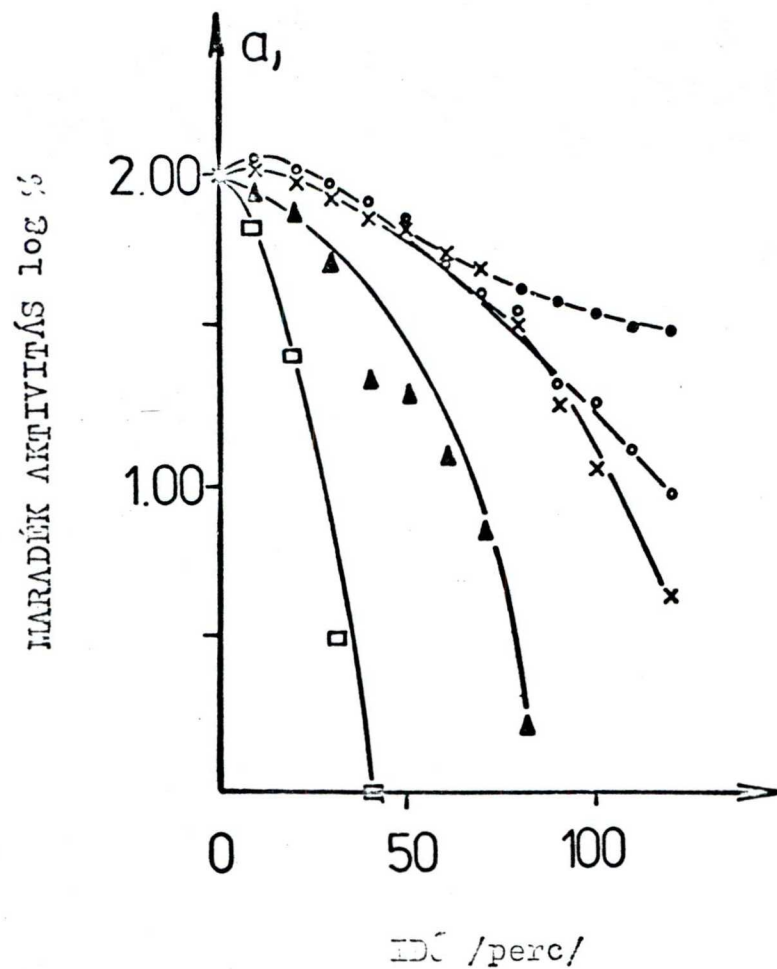
17. ábra Szilokrom-alcoholáz hőinaktiválódási kinetikája

0,05 M-os TRIS/HCl puffer pH=7,5

a/ Oldott alcoholáz

b/ Szilokrom-alcoholáz

Jelölések: -x- 50°C; -•- 55°C; -▲- 60°C; -◻- 65°C



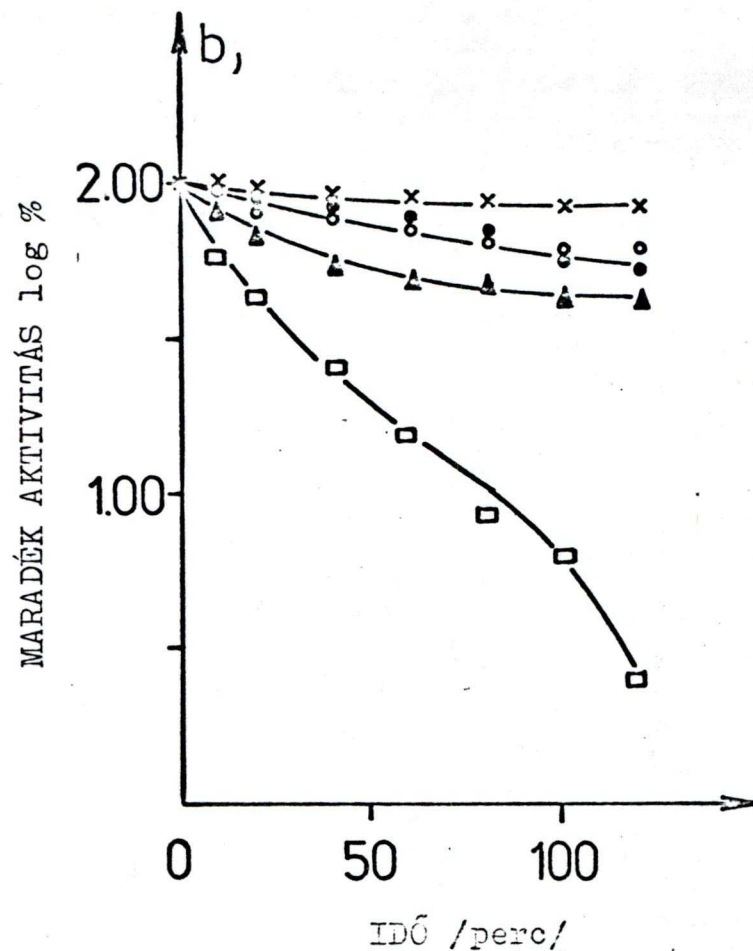
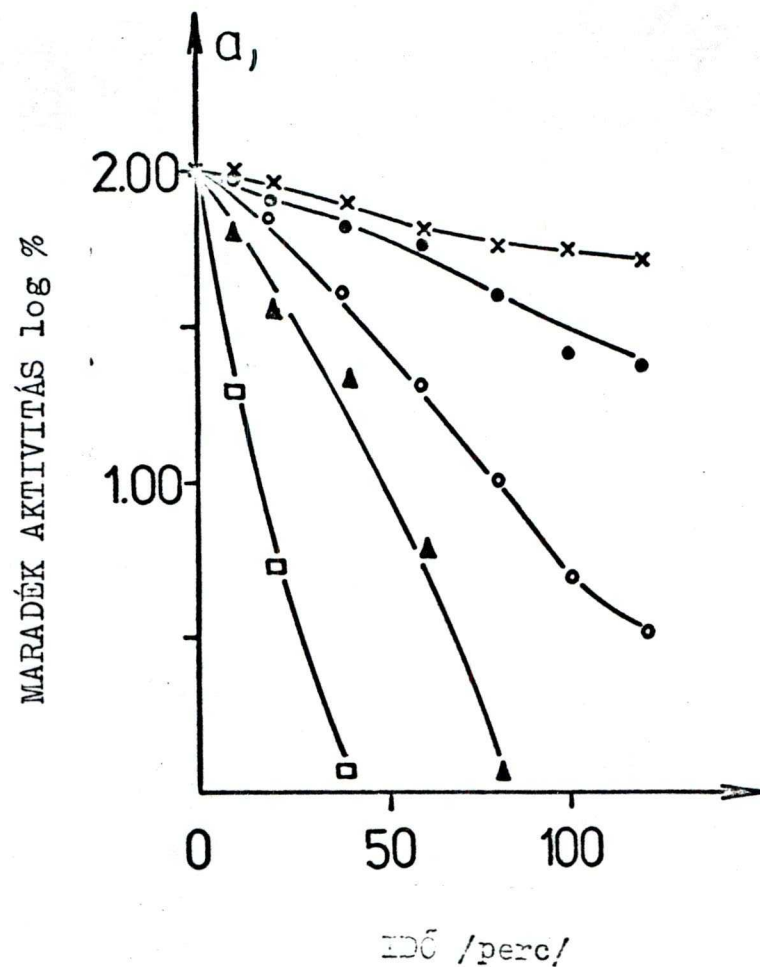
18. ábra Akrilex-alcohols hőinaktiválódásának pH függése, 55°C-on. Puffererek:

pH=5,0-nél acetát; pH=6,0-7,0 foszfát; pH=7,0-8,5 TRIS/HCl.

a/ Oldott alcohols

b/ Akrilex-alcohols

Jelölések: -□- pH=5,0; -x- pH=6,0; -○- pH=7,0; -●- pH=7,5; -▲- pH= 8,5



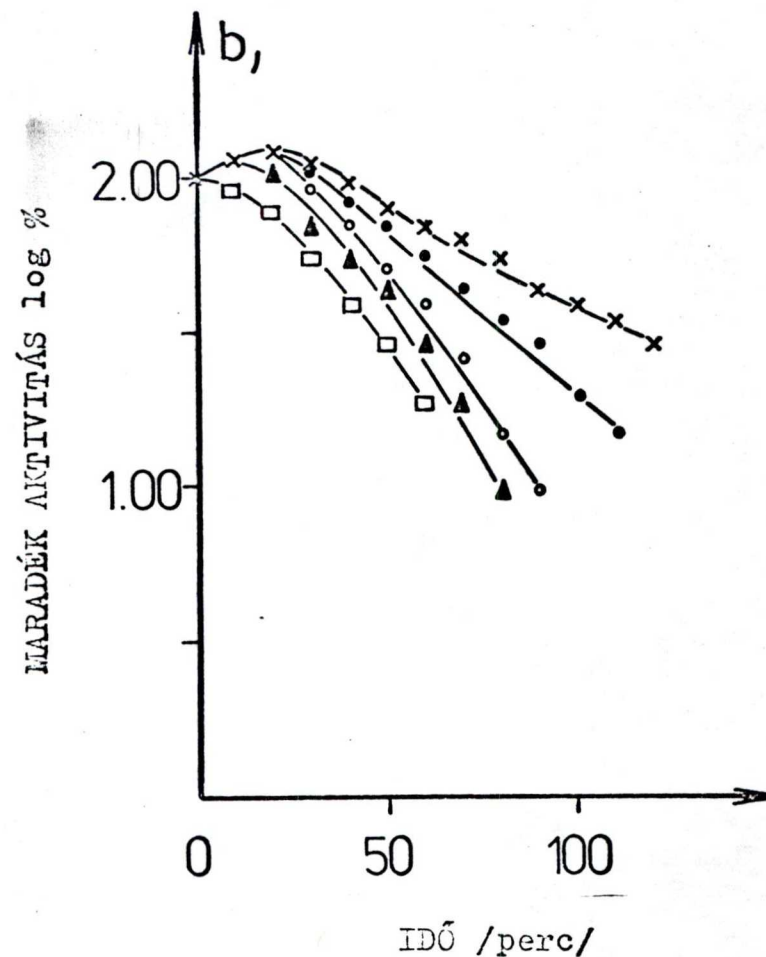
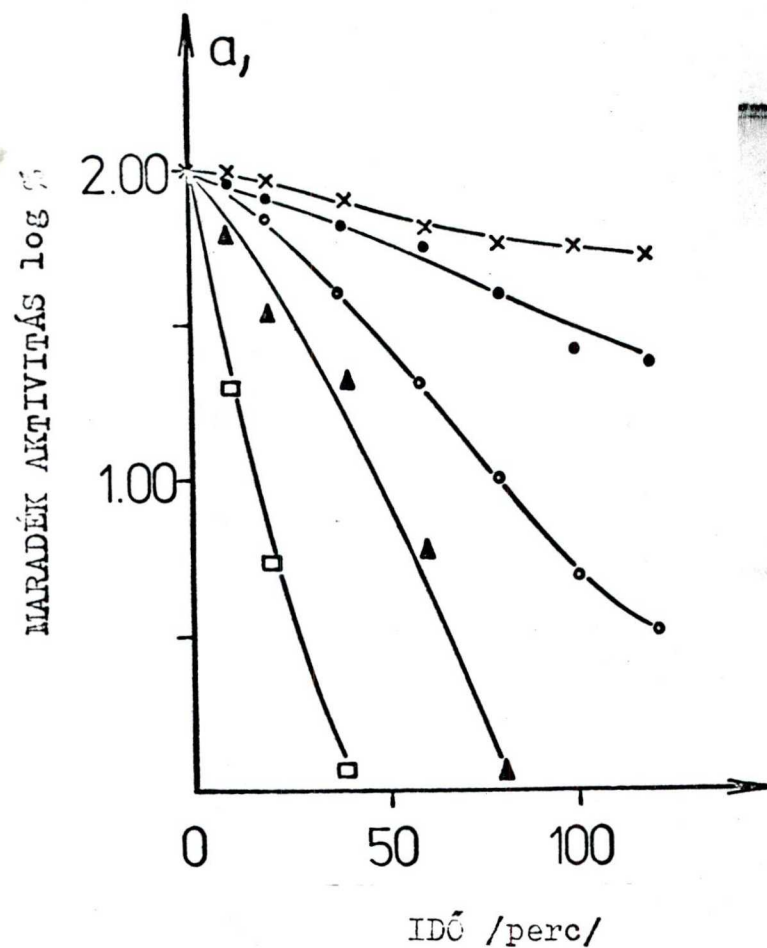
19. ábra Urea hatása az Akrix-alcoholase aktivitására

0,05 M-os TRIS/HCl puffer pH=7,5; hőmérséklet: 25°C

a/ Oldott alcoholase

b/ Akrix-alcoholase

Jelölések: -x- 1 M; -•- 2 M; -o- 3 M; -▲- 4 M; -◻- 5 M urea.



20. ábra Urea hatása a Szilokrom-alkoholáz aktivitására

0,05 M-os TRIS/HCl puffer pH=7,5; hőmérséklet: 25°C

a/ Oldott alkoholáz

b/ Szilokrom-alkoholáz

Jelölések: -x- 1 M; -•- 2 M; -o- 3 M; -▲- 4 M; -◻- 5 M urea



IX. IRODALOM

1. Taylor, J.F. - Green, A.A. - Cori, G.T.: /1948/
Biol.Chem. 173. 591.
2. Chibata, I.: /1978/ Immobilized Enzymes.
3. Zabosky, O.: /1973/ Immobilized Enzymes. ORC Press,
Cleveland, Ohio.
4. Maeda, S. - Suzuki, H. - Yamachi, A. - Sakimae, A.:
/1975/ Biotechnol., Bioeng. 17. 119.
5. Mosbach, K. - Matiasson, B.: /1970/ Acta Chem.Scand.
24. 2093.
6. Dinielli, P. - Marciani, W. - Morisi, F.: /1975/
Immobilised Enzymes. N.Y. Dekker. 171.
7. Chang, T.M.S.: /1964/ Science. 146. 524.
8. Poznanszky, M.J. - Chang, T.M.S.: /1974/ Biochem.
Biophys.Acta. 334. 103.
9. Zittle, C.A.: /1953/ Adv. Enzymed Relat. subj.
Biochem. 14. 319.
10. Grubhofer, N. - Schleith, L.: /1953/ Naturwissen-
schaften. 40. 508.
11. Goldman, R. - Goldstein, L. - Katchalski, E.: /1971/
Aspects of Reactions and Solid Supports Biochemical.
N.Y. Ac.Press.
12. Nelson, J.M. - Griffin, E.G.: /1916/ J. Am.Chem.Soc.
38. 1109.
13. McLaren, A.D. - Parker, L.: /1970/ Adv.Enzymed Relat.
Arcs.Mol.Biol. 33. 245.
14. Fletcher, G.L. - Okada, S.: /1959/ Radiat.Res. 11. 291.
15. Fletcher, G.L. - Okada, S.: /1955/ Nature. /London/
176. 882.
16. Easterday, R.L. - Easterday, J.M.: /1973.Nov.7-9./
Proceedings of the Symposium on Affinity Chromato-
graphy and Immob. Biochemicals. Charleston, /South
Carolina/.
17. Mehler, A.H. - Bloom, B.: /1963/ J. Biol.Chem. 238. 105.

18. Rutter, W.J.: /1961/ in "The Enzymes" vol. 5.
/szerkeszti Boyer, P.D. - Laray, H. -
Murbäck, K./ Academic Press, New York./2. kiad./
19. Rutter, W.J.: /1967/ Federation Proc. 23. 1248.
20. van Tamelen, E.E.: /1977/ Bioorganic Chemistry,
vol. 1. London, Acad. Press. 59.
21. Jungermann, K. - Möhler, H.: /1980/ Biochemie.
Berlin-Heidelberg-N.Y. Springer Verl. 204-223.
22. Penhoet, E.E. - Rutter, W.J.: /1971/ J. Biochem.
246. 318.
23. Wonneberg, B. - Graubau, H.J. - Jänecke, G. -
Hoffmann, H. - Wagenknecht, C.: /1973/ Ergeb-
nisse der experimentellen Medizin. Bd. 12.
Diagnostische Enzymologie. Berlin, Volk u. Ge-
sundheit 153.
24. Penhoet, E.E. - Rajkumar, T. - Rutter, W.J.: /1966/
Proc. Natl. Akad. Sci. US. 56. 1275.
25. Lai, C.Y. - Chen, C.: /1968/ Arch. Biochem. Biophysics.
128. 212.
26. Malcolm-Dixon, Edwin - Webb, C.: /1964/ Enzymes.
Longmanns. 454.
27. Annual Review of Biochemistry. 39. 658-659.
28. Rutter, W.J. - Hunsley, J.R. - Groves, W.E. -
Calder, J. - Rajkumar, T.V. - Woodfin, B.M.:
SP Colorwich and NO. Kaplan Methods in Enzymology.
vol. 9. 479. N.Y. - London, Acad. Press.
29. Horecker, B.L. - Tsolas, O. - Lai, C.Y.: /1972/ in
PD Boyer the Enzymes. /3. ed./ vol. 7. 213.
N.Y. - London.
30. Warburg, O. - Christian, W.: /1943/ Biochem. Z. 314.
2. 149.
31. Barmann, T.E.: /1969/ Enzyme Handbook. vol. 2. 736.
Berlin - Heidelberg, Springer Verl.
32. Spolter, P.D. - Adelman, R.C. - Weinhouse, S.: /1965/
J. Biol. Chem. 240. 1327.
33. Szajáni B. - Sajgó M. - Biszau B. - Friedrich, P. -
Szabolcsi, G.: /1970/ Eur. J. Biochem. 15. 171.

34. Herbert, D. - Gordon, A.H. - Subramanyan, V. -
Green, D.E.: /1940/ Biochem.J. 34. 1108.
35. Hartman, F.C. - Baker, R.: /1965/ Biochemistry. 4.
1068.
36. Swenson, A.D. - Boyer, P.D.: /1957/ J.Am.Chem.Soc.
79. 2174.
37. Meyerhof, O. - Lohman, K.: /1934/ Biochem. Z. 271.
89.; Naturwissenschaften. 22. 134.
38. Sia, C.L. - Horecker, B.L.: /1968/ Arch. Biochem.
Biophysics. 123. 186.
39. Velick, S.F. - Ronzoni, E.: /1948/ J.Biol.Chem.
173. 627.
40. Gralen, N.: /1939/ BJ. 33. 1342.
41. Taylor, I.F. - Lowy, C.: /1956/ Biochem.Biophys.
Acta. 20. 109.
42. Deal, W.C. - Rutter, W.J. - van Halbe, K.E.: /1963/
Biochemistry. 2. 246.
43. Stellwagen, E. - Schachman, H.K.: /1962/ Biochemistry.
1. 1056.
44. Kawahara, K. - Tanford, C.: /1966/ Biochemistry. 5.
1578.
45. Morse, D.E. - Chen, W. - Horecker, B.L.: /1967/
Proc.Nat.Acad. Science US. 58. 628.
46. Lay, C.Y. - Chen, C. - Horecker, B.L.: /1970/ BBRC.
40. 461.
47. Penholt, E. - Kochman, M. - Valentine, R. - Rutter, W.J.:
/1967/ Biochemistry. 6. 2940.
48. Uaenfriend, S. - Velick, S.F.: /1951/ J.Biol.Chem.
190. 733.
49. Winstead, J.A. - Wold, F.: /1964/ J.Biol. Chem. 239.
4212.
50. Lai, C.Y.: /1968/ Arch.Biochem.Biophysics. 128. 202.
51. Tung, T.C. - Ling, K.H. - Byrne, W.L. - Lardy, H.A.:
/1954/ Biochem.Biophysics Acta. 14. 488.

52. Ginsburg, A. - Mehler, A.H.: /1966/ Biochemistry. 5.
2623.
53. Metzler, David E.: /1977/ Biochemistry. The Chemical
Reactions of Living Cells. 412. San Francisco.
Acad. Press.
54. Stryer, Lubert: /1981/ Biochemistry. /2.ed./ 272.
San Francisco. Freeman and Co.
55. Palmer, Trevor: /1981/ Understanding Enzymes. 190-191.
Ellis Harward Limited Chichester.
56. Bernfeld, P. - Bieber, R.E. - Mac Dounel, P.C.: /1968/
Arch.Biochem.Biophysics. 127. 779.
57. Chan, W.C. - Mawer, H.M.: /1977/ Arch.Biochem.
Biophys. 149. 136.
58. Falb, R.D. - Liun, J. - Spira, J.: /1979/ Experientia.
29. 958.
59. Schell, H.D. - Scholnic, L. - Carstenau, M.: /1977/
Stud.Cercet.Biochim. 20. 1. 77.
60. Pollack, A. - Blumenfeld, H. - Wax, M. - Bangh, R.L.-
Whitesides, G.M.: /1980/ J.Am.Chem.Soc. 102. 6324.
61. Ornstein, L.: /1964/ Disc electrophoresis I. Ann N.Y.
Acad.Sci. 121. 321.
Davis, B.J.: /1964/ Disc electrophoreses II Ann N.Y.
Acad.Sci. 121. 404.
62. Beisenherz, G. - Boltze, H.J. - Bücher, Th. - Crok, R.-
Garbalda, K.H.: - Meyer-Arendt, E. - Pfeleiderer, G.:
/1953/ Z.Naturforsch. 8 b. 555.
63. Fischer, E. - Tafel, J.: /1887/ Ber. Dtsch.Chem.Ges.
20. 2566.
64. Sibley, J.A. - Lehninger, A.L.: /1948/ J.Biol.Chem.
177. 859.
65. Lowny, O.H. - Rosebrough, N.J. - Farr, A.L. -
Randall, R.J.: /1951/ J.Biol.Chem. 193. 265.
66. Friedrich, P. - Arányi P. - Nagy I.: /1972/ Acta
Biochim.Biophys. Acad.Sci.Hung. 7. 11.
67. Anderson, P.J. - Gibbons, I. - Perham, R.N.: /1969/
Eur.J.Biochem. 11. 503.

68. Lomako, O.V. - Menyailova, I.I. - Nakhapetyan, L.A. - Nikitin, Y.V. - Kiselev, A.V.: /1982/ Enzyme Microb.Technol. vol.4.
69. Szajáni B. - Ivony K. - Boross L.: /1980/ J.Appl. Biochem. 2. 72.
70. Kovács K.- Szajáni B. - Boross L.: /1980/ J.Appl. Biochem. 4. 11.
71. Weliky, N. - Weetall, H.H.: /1965/ Immunochemistry. 2.293.
72. Micheel, F. - Evers, J. + /1949/ Macromol.Chem. 3. 200.
73. Fischer, E. - Arányi P. - Keleti T.: /1973/ Acta Biol. Med.German. 31. 153.
74. Ozawa, H.: /1967/ J. Biochem. /Japan/ 62. 531.
75. Weber, K. - Osborn, M.: /1969/ J.Biol. Chem. 244. 4406
76. Nakashima, Kuino - Machika Ontsuki - Syoza Tuboi.: /1980/ Thoku J.Exp.Med. 130/2. 143.

Köszönetet mondok dr Boross László egyetemi tanárnak, a JATE Biokémiai Tanszék vezetőjének, hogy egyetemi előadásai alatt megszerettette velem a biokémiát, figyelmemet e témára irányította , és lehetőséget nyújtott jelen dolgozatom elkészítésére.

Köszönetemet fejezem ki dr Szajáni Béla c. egyetemi docensnek azért a sokoldalú, értékes segítségért, amelyet a vizsgálatok során felmerült elméleti és gyakorlati problémák megoldásához nyújtott.

Külön köszönet illeti Ábrahámné dr Gulyás Magdolna egyetemi adjunktust, aki munkámat kezdettől fogva figyelemmel kísérte, és a vizsgálatok lefolytatásakor, illetve az eredmények kiértékelésekor hasznos tanácsaival segítette dolgozatom létrejöttét.

Köszönettel tartozom Bellér Évának az ábrák szép kivitelezéséért, továbbá megköszönöm a JATE Biokémiai Tanszék egész kollektívájának a segítséget, amelyet munkám során nyújtott.