B 1751

SZERIN-PROTEÁZOK ÖSSZEHASONLITÓ VIZSGÁLATA KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A TERMOSTABILITÁSRA

Doktori értekezés

Jónás Erzsébet

JATE Biokémiai Tanszék

Szeged

1980.

TARTALOMJEGYZÉK

I. Bevezetés..... 1. old.

II. Irodalmi áttekintés..... 3. old.

1. A termofil mikroorganizmusok jellemzése 3. old.

2. A termostabilitást okozó tényezők áttekintése..... 4. old.

3. A termofil mikroorganizmusok enzimei.. 6. old.

3/a. A mikrobiális proteázok csoportositása 6. old.

3/b. Termostabilis mikrobiális proteázok. 7. old.

III. Anyagok és módszerek..... 11. old.

1. A termofil baktérium izolálása, jellemzése..... 11. old.

2. Extracelluláris proteáz termeltetése kazeint tartalmazó tápoldatban..... 12. old.

3. A baktériumtenyészet fenntartása..... 12. old.

4. A proteolitikus enzimek aktivitásának mérése..... 13. old.

5. Az oldatok fehérjetartalmának meghatározása..... 14. old.

6. A proteáz molekulasulyának meghatározása..... 14. old.

7. A bakteriális proteáz immobilizálása BrCN-Sepharose 4B gélre..... 14. old.

8. Az anyagok beszerzési helye..... 16. old.

IV. Kisérleti eredmények..... 17. old.

1. A JB-1 bakteriális proteáz tisztitása tápoldatból..... 17. old.

2. A tisztitott enzim molekulasulyának meghatározása..... 19. old.

SZEGED

3. Az enzimkatalizist befolyásoló tényezők vizsgálata..... 22. old.
3/a. A pH hatása a reakciósebességre..... 22. old.
3/b. A hőmérséklet hatása a reakciósebességre..... 22. old.
3/c. Az EDTA hatása a proteáz működésére.. 23. old.
3/d. A kétértékü fémionok hatása a JB-1 proteázra..... 27. old.
3/e. Az aktiv centrum természete..... 31. old.
4. Az enzim stabilitását befolyásoló tényezők vizsgálata..... 34. old.
4/a. A hőmérséklet hatása a stabilitásra.. 34. old.
4/b. A pH hatása a stabilitásra..... 39. old.
4/c. Detergensek hatása a JB-1 proteáz stabilitására..... 42. old.
5. A JB-1 proteáz immobilizálása és az immobilizált enzim tulajdonságai..... 46. old.
5/a. Immobilizálás BrCN-Sepharose 4B gélre 46. old.
5/b. Az immobilizált proteáz tulajdonságai 46. old.
5/c. Az immobilizált proteáz alkalmazása katalizátor oszlopként..... 47. old.
V. Összefoglalás..... 52. old.
VI. Irodalomjegyzék..... 54. old.

I. BEVEZETÉS

A hőhatással szembeni védekezés ösztöne a legegyszerűbb egysejtü szervezetektől a magasabbrendü élőlényekig mindenütt megfigyelhető, hiszen a magas hőmérséklet az élet minden formájára letális. Éppen ezért az élővilág egy különösen érdekes csoportját képviselik azok az egysejtü élőlények, amekyek a törzsfejlődés folyamán kialakult adaptációs mechanizmusuk révén nem csak létezni, de szaporodni is tudnak jóval 5o °C feletti hőmérséleten is. Ezeket az élőlényeket termofil mikroorganizmusnak nevezik.

A hőmérséklet lényeges környezeti faktor, amely hat a kémiai - igy a biokémiai - reakciók sebességére, valamint a sejt aktiv strukturáinak állapotára a biomolekulák közötti és a biomolekulákon belüli nem kovalens konformáció-összetartó erőkön keresztül. A sejt fehérjéinek és enzimeinek egy adott környezeti hőmérséklethez kell adaptálódnia, az adaptáció mértéke határozza meg az életidejét /termostabilitás/ és a biológiai aktivitását /strukturális flexibilitás/ /1/.

A termofil mikroorganizmusokból izolált fehérjék és enzimek mezofil megfelelőjüknél általában nagyobb termostabilitást mutatnak. Bár a különböző hőoptimummal rendelkező enzimek szerkezetének és kinetikai paramétereinek összehasonlitó vizsgálatából számos információ áll rendelkezésünkre a termostabilitást illetően, a termofilitás molekuláris mechanizmusának tisztázása továbbra is a kutatás középpontjában marad.

A termostabilis enzimek vizsgálatának igen nagy gyakorlati jelentősége van az alkalmazás szempontjából. Ma már egyre nagyobb számban használnak fel biokatalizátorként enzimeket az iparban és a mezőgazdaságban /pl. fehérjebontó enzimeket a bőriparban, az ipari fehérjehulladékok lebontására, a tápok emészthetőségének javitására stb./. Mivel a gyártási folyamat az enzimek rövid élettertama miatt még elég drága, a termostabilis enzimek alkalmazása jelentős anyag- és energiamegtakaritással járna. Az enzimek immobilizált formáinak alkalmazása további előnyöket biztosit.

Munkánk során célul tüztük ki termostabilis proteáz tisztitását és jellemzését egy uj termofil baktérium törzsből /JB-1/. Az enzim tulajdonságainak - főként termostabilitásának - más fajokból /mezofil és termofil/ izolált hasonló tipusu enzimek tulajdonságaival való összehasonlitása alapján további adatokat kivántunk szerezni a termofilitás molekuláris mechanizmusának jobb megértéséhez.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A termofil mikroorganizmusok jellemzése

Azokat a mikroorganizmusokat, melyek 5o °C felett is képesek növekedni és szaporodni, termofileknek nevezzük. A termofil mikroorganizmusok morfológiai és fiziológiai tulajdonságaik alapján nem tartoznak egy adott rendszertani kategoriába, közöttük autotrof és heterotrof, aerob és anaerob, fakultativ és obligát termofilek egyaránt megtalálhatók. Az evolució során a termofil mikroorganizmusok valószinüleg a mezofil törzsekből váltak ki, fokozatosan, sorozatos mutációkkal alkalmazkodva a magasabb hőmérséklethez /2/. Attól az egyedi tulajdonságuktól eltekintve, hogy magasabb hőmérsékleteken is képesek szaporodni, a felhasználható szén- és nitrogénforrás, valamint az anyagcsereutak hasonlósága alapján valamelyik mezofil rendszertani kategoriába besorolhatók.

A legtöbb termofil mikroorganizmus a baktériumok között található, melyekről Degryse /3/ adott legutóbb részletes áttekintést. A növekedés hőmérsékletoptimuma alapján a termofil baktériumok két csoportba oszthatók:

- a mérsékelten termofil mikroorganizmusok optimális szaporodási hőmérséklete 5o-65 °C, közéjük főként fakultativ termofilek tartoznak és különösen a Bacillus genus rendelkezik nagy számu képviselővel.
- az extrém termofil, vagy "caldo-activ" mikroorganizmusok 7o °C felett is képesek szaporodni, ezek közé főleg obligát aerob baktériumtörzsek tartoznak.

2. A termostabilitást okozó tényezők áttekintése

Az elmult 2o évben számos szerző próbált magyarázatot adni a termofilitásra. Először Allen /4/ vonta le kisérletei alapján azt a következtetést, hogy magas hőmérsékleten a növekedés és létezés a denaturálódó fehérjék gyors ujraszintézisével valósulhat meg. Hipotézisét Bubela és Holdsworth /5/ Bacillus stearothermophilussal végzett kisérletei is alátámasztották. Kenkel és Trela /6/ különböző genusba tartozó termofil baktériumok fehérjeszintézisének sebességét összehasonlitva azonban megállapitotta, hogy a gyors protein-turnover valószinüleg a spóraképzők egyedi tulajdonsága lehet és nem terjeszthető ki a többi termofil mikroorganizmusra.

Brock /7/ a fakultativ termofil baktériumok lipidösszetételét vizsgálva arra a következtetésre jutott, hogy a növekedést korlátozó tényező a citoplazmatikus membrán egységének felbomlása magasabb hőmérsékleten. Figyelembe véve azonban azt, hogy az egységmembrán több, mint 3o% fehérjét is tartalmaz, Singleton és Amelunxen /8/ a termofilitást elsődlegesen a makromolekuláris komplexek belső stabilitásából származtatja.

Oshima és mtsi /9/ azokat a tényezőket, amelyek a sejtalkotók termostabilitását okozhatják a következőképp csoportositják:

a./ A molekulák strukturájából eredő belső stabilitás, amely fokozott intramolekuláris kölcsönhatások eredménye. Ezek a kölcsönhatások lehetnek hidrofób jellegüek, ionos karakterüek és H-hidakon keresztül megvalósuló kölcsönhatások.

amelyek egyes fehérjéknél eltérő mértékben, de együttesen járulnak hozzá a molekula termostabilitásához /1o/. Fokozott mértékü apoláros kölcsönhatást tapasztaltak pl. Pangburn és mtsi /11/ a termolizin esetében. A termofil Clostridiumokból izolált formiltetrahidrofolát szintetáz /12/ és a Thermus aquaticus gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz /13/ esetén viszont növekvő mértékü - külső és belső sóhidakon keresztül megvalósuló - ionos kölcsönhatásokkal számolhatunk.

b./ A molekulák transzkripció, vagy transzláció utáni kovalens módositása. Watanabe és mtsi /14/ kimutatták, hogy az extrém termofil Thermus thermophilus baktérium t-RNS-benegy módosult bázis, az 5-metil-2-tiouridin jelenik meg, amely 7o ^{o}C alatt növesztett sejtekből teljesen hiányzik, igy szerepet tulajdonitottak neki a ribonukleinsav termostabilitásában.

c./ A molekulákhoz kapcsolódó védő faktorok hatása Viszonylag kevés példa van arra, hogy a termofil mikroorganizmusok specifikus védő faktorokat szintetizálnak /pl. a termospermin, amely a riboszóma-mRNS-aminoacil-tRNS terner komplex stabilitásában játszik szerepet /15/. Több szerző számolt be az egyes mezofileknél is stabilizáló szerepet játszó sejtkomponensek, a szubsztrátok, kofaktorok, ionok stabilizáló hatásáról /16/. Crabb és mtsi /17/ szerint a fehérjék kationok és anionok általi stabilizálása lényeges szerepet játszik a fakultativ termofilek hőmérséklethez való adaptálódásában. A kétértékü fémionok közül a Ca^{2+} stabilizáló szerepét bizonyitották több termofil proteáz esetén /25, 3o, 31, 32, 36/, mig a Mg^{2+} az enolázok stabilitását

növeli magasabb hőmérsékleteken /18/.

A fehérjék termostabilitását befolyásoló tényezőket legutóbb Amelunxen és Murdock igen részletesen elemezte /16/. Véleményük szerint a fehérjék termostabilitását nem egyetlen, hanem számos tényező együttes hatása okozza. A fehérjék belső stabilitásán, a szubsztrátok, kofaktorok és ionok stabilizáló hatásán kivül in vivo körülmények között számolnunk kell a fehérje-fehérje és fehérje-membrán között kialakuló makromolekuláris kölcsönhatások stabilizáló hatásával is.

3. A termofil mikroorganizmusok enzimei

a./ A mikrobiális proteázok csoportositása

A fehérjebontó enzimek, igy a mikrobiális proteázok is a hidrolázok közé tartoznak, peptid, esetleg észter kötés hidrolizisét katalizálják. A mikrobiális proteázok többsége extracelluláris endopeptidáz, melyeket Matsubara és Feder /19/ az aktivitás és stabilitás pH-függése, valamint az aktiv centrum természete alapján a következőképp csoportositják:

- savas proteázok, melyeknek pH-optimuma 3-5 között van.
- tiol-proteázok, melyek az aktiv centrumban cisztein tartalmaznak, ezért SH-reagensekkel gátolhatók. Fémiont nem tartalmaznak. Általában a semleges pH-tartományban a legaktivabbak.
- neutrális metalloendopeptidázok, amelyek az aktiv centrumban Zn^{2+} iont tartalmaznak, ezért EDTA-val és más komplexképző vegyülettel gátolhatók. pH-optimumuk pH 6-8 között található. Molekulasulyuk 35-40000, diszulfid hidakat nem

SZEGED

tartalmaznak és nagyfoku szekvenciahomológia jellemzi őket. A Ca^{2+} ionok általában szerepet játszanak a stabilitásukban-

- DIFP-szenzitiv alkálikus proteázok, melyeknek pH-optimuma pH 8-12 között található, általában erősen savlabilak. Az aktiv centrumban szerin oldallánc található, amely PMSF-fel, vagy DIFP-tal specifikusan gátolható /2o/, de egy hisztidin imidazol gyürü is részt vesz a katalizisben /21/. A peptid kötéseken kivül az észter kötéseket is hidrolizálják. Molekulasulyuk 2o-3oooo között van, diszulfid hidat, de legtöbbször ciszteint sem tartalmaznak. A Ca^{2+} ionok általában növelik a stabilitásukat. Legismertebb képviselőik a szubtilizinek /BPN' és Carlsberg/, amelyeket nagyfoku szekvenciahomológia jellemez.

b./ Termostabil mikrobiális proteázok

Termostabil proteolitikus enzimeket a baktériumokból és a gombákból egyaránt leirtak.

Legismertebb közülük a termolizin, amelyet Endo /22/ izolált és kristályositott először. A termolizin neutrális metalloendopeptidáz, olyan peptidkötéseket hasit, melyekben az amino-nitrogént hidrofób aminosav /Phe, Leu/ szolgáltatja /23/. Szerkezetét és katalitikus tulajdonságait tekintve homológ a Bacillus subtitlis neutrális proteáz A-val, hőstabilitásuk azonban jelentősen eltér egymástól/11/.

Ohta és mtsi /24, 25/ vizsgálatai alapján a termolizin 8o ^{o}C-on 1 órán keresztül stabil, a hődenaturációja 25-8o ^{o}C között elsőrendü reakcióként játszódik le. Alacsony hőmérsékleten pH 5-1o között stabilitást mutat, 8o ^{o}C-on az enzim stabilitása pH 6-8 között a legnagyobb. A 2o ^{o}C-on

és 8o °C-on mutatott stabilitási görbék kinetikai analizise alapján a szerzők arra következtettek, hogy a tirozin oldalláncok H-hidas és aromás kölcsönhatások kialakitásával jelentősen hozzájárulnak a termolizin stabilitásához. A termolizin alacsony hőmérsékleteken denaturálószerekkel /8 M urea, 4 M guanidin-HCl, 2o% etanol/ szemben ellenálló, a denaturáció ezeknek a reagenseknek a jelenlétében csak 4o °C feletti hőmérsékleteken következik be.

Feder és mtsi /27/ kimutatták, hogy a termolizinhez 4 Ca^{2+} ion kötődik, amelyeket EDTA-val eltávolitva az enzim már 4o °C-on labilissá válik. A termolizin aminosav-sorrendjének ismeretében /27/ Matthews és mtsi /28, 29/ röntgendiffrakciós analizissel kimutatták, hogy az aktiv centrumban Zn^{2+} ion található, továbbá, hogy a négy Ca^{2+} ion közül kettő a molekula belsejében együtt semlegesit öt savas jellegü csoportot, mig a másik kettő külön-külön kötődik a molekula felszinén lévő aszparagil oldalláncokhoz. A kettős kötőhelyről a Ca^{2+} ionok könnyen disszociálnak, mig a két másik Ca^{2+} ion közül az egyiknek a kötéserőssége 8o °C-on megnő /3o, 31/, és ez az egyetlen Ca^{2+} ion felelős a termolizin stabilitásáért magasabb hőmérsékleten. Dahlquist /32/ szerint a Ca^{2+} ionok nem csak a stabilitásban játszanak szerepet, hanem megvédik az enzimet az autolizistől is 5o °C feletti hőmérsékleten, azáltal, hogy kötődésükkel megakadályozzák az egyes kötőhely/ek/ körüli régió/k/ hőmérséklet hatására bekövetkező konformációváltozását.

Eddigi irodalmi adatok alapján a termolizin az egyetlen olyan enzim, amelynél stabil konformáció kialakulását a hőmérséklet indukálja.

Sidler és mtsi /33/ a Bacillus stearothermophilus és a Bacillus caldolyticus törzsekből izoláltak neutrális extracelluláris proteázokat, amelyek Ca^{2+} ionok nélkül szintén labilisak. Ezek a proteázok az N-terminális aminosav sorrend alapján valószinüleg homológ enzimek a termolizinnel.

Az egysejtü termofil gombákból leirt proteázok az alkálikus proteázok közé tartoznak.

A termomikoláz extracelluláris szerin proteáz, melyet Malbranchea pulchella törzsekből irtak le. pH-optimuma 8,o-8,5 között van, olyan peptid kötéseket hasit, amelyekben a C-terminális felőli aminosav aromás, vagy poláros karakterü /34/. 2o °C-on pH 6,5-9,o között 2o órán keresztül stabil. Bár a termomikoláz a termolizinnél nagyobb belső termostabilitást mutat, a Ca^{2+} ionok késleltetik a hődenaturációt, továbbá védik az enzimet az autolizistől is /35/. A termomikolázhoz csak egyetlen Ca^{2+} ion kötődik, a kötődés kinetikája analóg a termolizin esetében stabilizáló szerepet játszó egyetlen Ca^{2+} ion kötődésének kinetikájával /36/.

K. Mizusawa és mtsi /37/ a Streptococcus rectus var. proteolyticus által termelt extracelluláris alkálikus proteáz termostabilitásáról számolnak be. Enzimatikus tulajdonságai alapján a szubtilizinekhez hasonlit, azoktól azonban nagyobb hőstabilitásával és SH-reagensekkel szemben mutatott érzékenységével eltér. A szerzők szerint a cisztein oldallánc az aktiv centrum körüli régió konformációjának fenntartásában játszik szerepet, kémiai módositásával az enzim már 5o °C körül labilissá válik, mig a kezeletlen enzim csak 8o °C körül inaktiválódik 3o perc alatt.

Täufel és mtsi /38/ kimutatták, hogy a Thermoactinomyces vulgáris három fajta termostabilis extracelluláris proteázt termel, melynek fő komponensét a termitázt Ruttloff és mtsi /39, 4o, 41/ vizsgálták. A termitáz alkálikus szerin proteáz, /pH-optimuma pH 7-9 között található/, az aktivitása azonban 5o%-ig SH-reagensekkel is gátolható. Közepesen termostabil enzim, 7o ^{o}C-on a felezési ideje 5o perc. Az aktiv centrum szerin oldalláncának módositása megvédi az enzimetaz autolizistől és stabilizálja a pH, a hőmérséklet és a denaturáló szerek /urea,SDS/ hatásával szemben. A szerzők a Ca^{2+} ionok hatását nem vizsgálták, bár valószinü, hogy nem játszik szerepet a stabilitásban, mivel EDTA hatására nem tapasztaltak aktivitáscsökkenést.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. A termofil baktérium izolálása, jellemzése

A baktériumot a Szerencsi Cukorgyár BW présvizéből izoláltuk teljes táptalajon, 55 °C-on. A kinőtt telepekből tiszta tenyészetet készitettünk és az 55 °C-on leggyorsabban szaporodó törzzsel dolgoztunk tovább.

A tenyésztés optimális körülményeit 1% glükóz tartalmu, 0,5% élesztőkivonattal kiegészitett minimál tápoldatban határoztuk meg, 5o ml-es rázatott tenyészetben. A sejtszám növekedését 54o nm hullámhosszon turbidimetriás méréssel követtük 6 órán keresztül.

A baktérium tenyésztése szempontjából az enyhén lugos pH-tartomány optimális, pH 8,o felett a sejtek könnyen aggregálódnak. pH 7,5 értéken 3o-5o °C között a növekedés intenzitása enyhén emelkedik, 5o °C felett azonban hirtelen letörik és 65 °C-on már nem észlelhető szaporodás /1. ábra/. Optimális körülmények között /5o °C, pH 7,5/ a logaritmikus szaporodási fázisban a sejtek duplázódási ideje 12 perc, a maximális sejthozam a logaritmikus szaporodási fázis végén /kb. 6 óra/ 4-6 g nedves sejt literenként.

Szénhidrát tartalmu /glükóz, szacharóz, keményitő 1-1%/ tápoldatban proteolitikus exoenzim termelődését nem tudtuk kimutatni, mig szénforrásként kazeint tartalmazó tápoldatban fehérjebontó enzim termelődése indukálódik.

Az általunk izolált fakultativ termofil baktérium a JATE Mikrobiológiai Tanszéken végzett előzetes rendszer-

tani vizsgálat alapján a Gram/+/, endospóraképző Bacillus genusba sorolható.

2. Extracelluláris proteáz termeltetése kazeint tartalmazó tápoldatban

Fehérjebontó enzim termeltetésekor 2-5 literes folyadékkulturában, 5o °C-on végeztük a baktérium tenyésztését. A tenyészet oxigénigényét sterilre szürt levegő bevezetésével biztositottuk, amely egyben a kevertetést is elvégezte.

A tápoldat looo ml-e a következő komponenseket tartalmazta:

1.7 g kazein
5,o g $/NH_4/_2SO_4$
1,o g KH_2PO_4
o,5 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$
o,1 g $CaCl_2$
o,1 g élesztőkivonat /Bacto Yeast Extract Oxoid/

A tápoldat pH-ját sterilizálás előtt 4 N NaOH-dal pH 7,5-re állitottuk be és a továbbiakban nem változtattuk.

A kazein-tartalmu tápoldatban kb. 4o óra alatt proteolitikus enzim termelődése indul meg, amelynek szintézise logaritmikusan nő kb. a 6o. óra eléréséig. A tenyésztés idejének lerövidítésére a későbbiekben az enzimindukciót kazeint tartalmazó táptalajon, 24 órás inkubálással végeztük. A fermentálás leállitásának idejét minden esetben a proteolizikus enzim aktivitásának követésével határoztuk meg, amely általában 42-48 óra alatt érte el a maximumt értéket.

3. A baktériumtenyészet fenntartását 3%-os ferde aga-

ron, 5o °C-on végeztük 1% glükózzal és o,5 % élesztőkivonattal kiegészitett minimál táptalajon. A tenyészeteket naponta átoltottuk.

4. A proteolitikus enzimek aktivitásának mérése

Az enzimaktivitás méréséhez ureával denaturált Hammerstein kazeint használtunk, amelyet Anson /42/ által leirt módszer szerint készitettünk el 4%-os fehérje végkoncentrációban. A kazein törzsoldatot hütőszekrényben legfeljebb 1 hétig tároltuk.

Aktivitásmérések előtt a kazein törzsoldatot 1:5 arányban pufferrel higitottuk, majd beállitottuk a megfelelő pH-értéket. A standard aktivitásmérés körülményei az egyes enzimekre a következők voltak:

JB-1 proteáz: o,1 M Gly/NyOH puffer , pH 9,o, 5o °C

Nagarse proteáz: o,1 M Gly/NaOH puffer, pH 9,o, 37 °C

Tripszin : o,1 M foszfát puffer, pH 7,5, 37 °C

Minden esetben legalább 4 pontos kinetikai görbéről történt a kiértékelés.

- oldott enzimek aktivitásának meghatározásakor o,9 ml kazein oldathoz o,1 ml megfelelő higitásu proteáz oldatot adtunk és legfeljebb 6o percig inkubáltuk az adott hőmérsékleten. Az enzimreakciót 1o%-os TCA hozzáadásával állitottuk le. 1o perc állás után a csapadékot lecentrifugáltuk /3o perc, 2ooo g/ és mértük a felüluszó fényelnyelését 28o nm hullámhosszon. Az adatok kiértékeléséhez tirozinnal készitettünk kalibrációt. A fenti körülmények között 1 µmol tirozin fényelnyelése 28o nm-en o,397.

Egységnyinek tekintettük az enzim aktivitását akkor,

ha a fenti körülmények között 1 µmol tirozinnak megfelelő extinkciónövekedést eredményezett a TCA-s felüluszó értékében 1 perc alatt.

- immobilizált bakteriális proteáz aktivitásának mérésekor 1oo mg gélt kevertettünk 2o ml o,67%-os kazein oldattal /pH 9,o/ 5o °C-on. A kevertetett mintából különböző időpontokban 1-1 ml mintát vettünk, amelyet 2 ml 1o%-os TCA oldathoz pipettáztunk. Az aktivitás kiértékelése ezt követően az oldott enzimnél leirt módon történt.

5. Az oldatok fehérjetartalmát a 28o nm-en mért extinkcióalapján határoztuk meg és az $E^{o,1\%}_{28o}$=1,oo értékkel számoltunk.

6. A proteáz molekulasulyának meghatározása gélkromatográfiásan

Az enzim nativ molekulasulyának meghatározását Sephadex G-5o oszlopon végeztük. A gélt 1 mM $CaCl_2$ és o,15 M NaCl tartalmu 5o mM-os Tris/HCl pufferrel /pH 8,2/ ekvilibráltuk. A 82,5 cm²-es /1,4 x 55 cm/ oszlopra 1 ml fehérjeoldatot vittünk fel. A fehérjék eluálására a fenti ekvilibráló puffert használtuk, 11 ml/óra konstans átfolyási sebesség mellett 2 ml-es frakciókat gyüjtöttünk. Az oszlopot ismert molekulasulyu fehérjékkel kalibráltuk, melyeket egymás után kromatografáltuk ugyanazon az oszlopon. A felhasznált standardok pepszin /36ooo/, tripszin /238oo/ és lizozim /144oo/ voltak.

7. A bakteriális proteáz immobilizálása BrCN-Sepharose 4B gélre

Immobilizáláshoz szorbensként a kereskedelemben kap-

ható BrCN-nal aktivált Sepharose 4B gélt használtuk. A liofilezett gél előkezelését a gyár által megadott recept szerint végeztük.

1 g liofilezett BrCN -Sepharose 4B gélt 2o ml 1 mM sósav oldatban duzzasztottunk, majd a stabilizáló anyagok eltávolítására 2oo ml sósav oldattal G-2-es szűrőn folyamatosan mostuk. A sósav eltávolítáára a leszivatott gélt tovább mostuk o,5 M NaCl tartalmu o,1 M $NaHCO_3$ /pH 8,3/ oldat 2o ml-es részleteivel, amely egyben az enzim immobilizálásához használt kapcsoló puffer.

24 mg proteolitikus enzimet oldottunk lo ml kapcsoló pufferben, majd hozzákevertük a leszivatott gélt. Szobahőmérsékleten 2 órán keresztül kevertettük a gélszuszpenziót. Ezt követően a gélt leszürtük, majd a kapcsoló puffer 5-5 ml-es részleteivel mosva eltávolitottuk a nem kötődött fehérjéket.

A leszivatott gélt 25 ml 1 M etanolamin /pH 8,o/ oldatban felszuszpendáltuk, ujabb 2 órán keresztük kevertettük szobahőmérsékleten az esetlegesen aktiv csoportok blokkolására, majd az etanolamint szüréssel és a kapcsoló pufferrel történő mosással eltávolitottuk.

A nem kovalensen kötött fehérjéket a gélből egymástól eltérő pH-ju pufferrendszerek 3 x 2o ml-es részleteivel mostuk ki. A pufferek sorrendben a következők voltak:

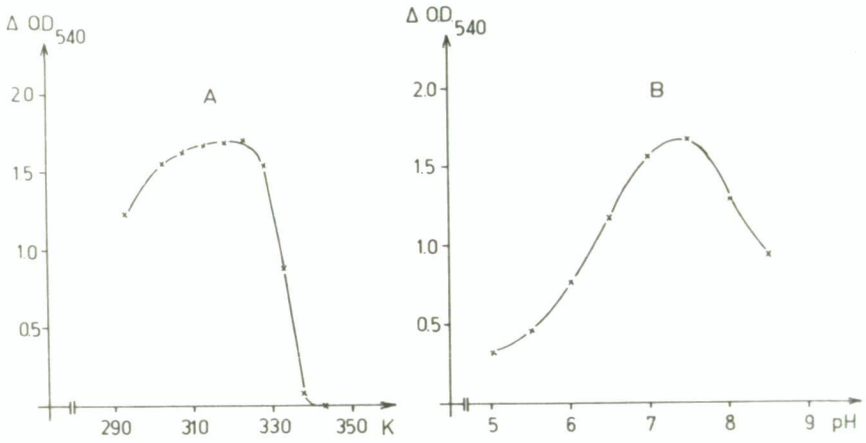
o,5 M NaCl tartalmu o,1 M $NaHCO_3$ /pH 8,3/ puffer

o,5 M NaCl tartalmu o,1 M acetát puffer /pH 4,o/

1 mM $CaCl_2$ tartalmu o,1 M Gly/NaOH puffer /pH 9,o/

A gélt az utolsó mosáshoz használt glicin pufferben 7 °C-on tároltuk.

8. A kisérletek során felhasznált anyagok közül a lizozim, a PMSF, a Servacell DEAE-32 SERVA készitmény, a pCMB, az NEM, a pepszin /3 x átkristályositott/, a tripszin /3 x átkristályositott/ FLUKA gyártmány volt, a Sephadex és Sepharose géleket a Pharmatia gyártól szereztük be. Az összes többi vegyszer REANAL gyártmány volt és további tisztitás nélkül került felhasználásra.



1. ábra

A hőmérséklet /A/ és a pH /B/ hatása a JB-1 baktérium növekedésének sebességére 1% glükózzal és 0,5% élesztőkivonattal kiegészitett minimál tápoldatban

IV. KISÉRLETI EREDMÉNYEK

1. A JB-1 bakteriális proteáz tisztitása tápoldatból

Az enzimek fermentléből való tisztitása viszonylag egyszerü frakcionálási eljárásokkal megoldható, mivel viszonylag kevés komponenst tartalmaznak. Alapvető probléma azonban az enzimre nézve rendkivül hig oldatnak tekinthető sejtmentes fermentlé betőményitése.

Az enzim tisztitásánál 2-5 liter tápoldatból indultunk ki. A tisztitás minden lépése szobahőmérsékleten is kivitelezhető, az önemésztés elkerülése végett azonban célszerü a preparálást hidegben végezni.

A tenyésztés befejeztével a baktériumsejteket 3ooo g-vel 2o percig tartó centrifugálással eltávolitottuk. 5 l fermentléhez 5o ml 1 M $CaCl_2$ oldatot adtunk /kb. 1o mM végkoncentráció/ és egy éjszakán keresztül állni hagytuk. A csapadékot centrifugálással kiülepitettük /1ooo g, 15 perc/, 5o-1oo ml deszt. vizzel mostuk, majd a felüluszókat egyesitettük. A $CaCl_2$ hatására afermentlében bontatlanul maradt kazein és a nagy molekulasulyu kazein hidrolizistermékek kicsapódnak. Ily módon jelentős fehérjementesités érhető el lényegesebb aktivitásveszteség nélkül, miközben az enzim a Ca hatására stabilizálódik.

A $CaCl_2$-dal kezelt fermentlét 85%-ig telitettük szilárd ammonium-szulfáttal. Egy éjszaka állás után a csapadékot szürtük, majd ujraoldottuk a kiindulási térfogat 3-5%-nak megfelelő térfogatu 1 mM $CaCl_2$ tartalmu 5o mM-os Tris/HCl

pufferben, pH 8,2 /a továbbiakban Tris puffer/. Ez a telitési lépés csak az enzimre nézve rendkivül hig oldat betöményitését szolgálta.

A kb. 1o mg/ml-es fehérjeoldatot 65%-ig telitettük szilárd ammonium-szulfáttal, majd 2 óra állás után 3ooo g-vel 3o percig centrifugáltuk. A csapadékot Tris pufferben oldottuk, majd ugyanezzel a pufferrel ekvilibrált Sephadex G-25 oszlopon /2,5 x 65 cm/ 2o-3o ml-es részletekben sómentesitettük, vagy 2 napon keresztül dializáltuk a pufferrel szemben.

A sómentes proteáz oldatot Tris pufferrel ekvilibrált Servacell DEAE-32 oszlopon kromatografáltuk tovább. Egy 15o cm³-es /2,5 x 5o cm/ ioncserélő oszlopra 4oo-5oo mg fehérje vihető fel. A fehérjék mintegy 85-9o%-a a fenti körülmények között erősen kötődik az oszlophoz, mig a proteáz pufferes mosással eluálható.

Az ioncserés kromatográfia proteolitikusan aktiv frakcióit összegyüjtöttük, liofilezéssel betöményitettük, majd o,1 M ammonium-formiát oldattal /pH 8,2/ ekvilibrált Sephadex G-5o oszlopon kétszer egymás után kromatografáltuk. Egy 9o cm³-es /1,4 x 6o cm/ Sephadex G-5o oszlopra egy-egy alkalommal 2 ml kb. 1o mg/ml-es fehérjeoldatot vittünk fel. 15 ml/óra konstans átfolyási sebesség mellett 2 ml-es frakciókat szedtünk. Két egymást követő gélkromatográfia tipikus kromatogramja a 2. ábrán látható.

A rekromatográfia után a proteolitukusan aktiv, azonos specifikus aktivitásu frakciókat összegyüjtöttük és liofilezett formában -18 °C-on tároltuk.

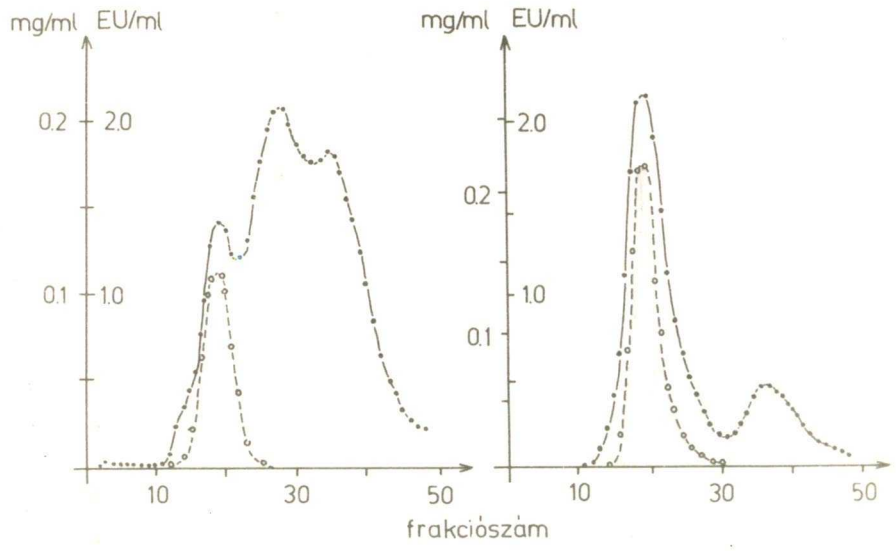
A tisztitás főbb lépéseinek adatait 1ooo ml kiindulási

fermentlére vonatkoztatva, 12 fermentálás átlagából számolva a következő táblázatban foglaltuk össze:

tisztitási lépés	fehérje tart. /mg/	aktivitás /EU/	aktivitás %	spec. akt. /EU/mg/	tisztulás
fermentlé + $CaCl_2$	22842	715	1oo	o,25	1
65% $/NH_4/_2SO_4$	233	689	96,4	2,96	11,7
Seph. G-25 kromatogr.	81,5	569	79,6	6,98	27,7
DEAE-cell. kromatogr.	1o,3	336	47,o	32,8	13o
Seph. G-5o kromatogr. I.	4,1	256	35,8	62,3	247
Seph. G-5o kromatogr. II.	1,6	1o4	14,5	64,6	256

Az enzim aktivitását µmol Tyr/perc értékben, a fehérjetartalmat a 28o nm-en mutatott fényelnyelés alapján adtuk meg. 1ooo ml fermentléből kitermelhető enzim mennyisége a liofilezett preparátum sulya alapján átlagosan 6o-65 mg.

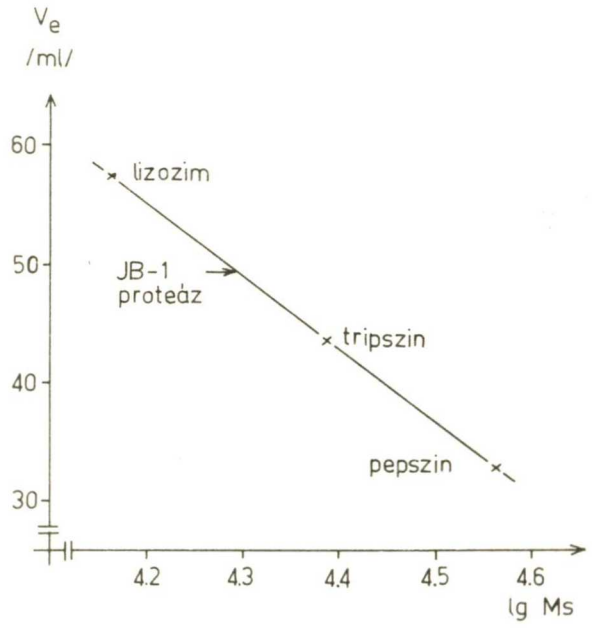
2. <u>A tisztitott enzim molekulasulyának meghatározását</u> Sephadex G-5o oszlopon végeztük, a Módszerek fejezetben leirt módon. Az eluciós térfogatokat ábrázolva a molekulasulyok logaritmusának függvényében /3. ábra/, az ismert molekulasulyu standardok segitségével elkészitett kalibráció alapján a JB-1 proteáz molekulasulyát 21ooo-nek határoztuk meg.



2. ábra

A JB-1 proteáz kromatográfiája /A/ és az aktiv csucs rekromatográfiája/B/ Sephadex G-5o oszlopon

Az eluciót o,1 M ammonium-formiát oldattal végeztük /pH 8,2/. 15 ml/óra konstans átfolyási sebesség mellett 2 ml-es frakciókat gyüjtöttünk. Az oszlop térfogata 9o cm³ /1,4 x 6o cm/ volt.



3. ábra

Kalibrációs egyenes a Sephadex G-5o oszlopon történő molekulasuly meghatározáshoz

82,5 cm³ oszlopra /1,4 x 55 cm/ 1 ml /2 mg/ fehérjeoldatot vittünk fel. A fehérjéket 1 mM $CaCl_2$ és o,15 M NaCl tartalmu 5o mM Tris/HCl pufferrel /pH 8,2/ eluáltuk. 11 ml/óra konstans átfolyási sebesség mellett 2 ml-es frakciókat gyüjtöttünk. A felhasznált standardok pepszin /36ooo/, tripszin /238oo/ és lizozim /144oo/ voltak.

3. Az enzimkatalizist befolyásoló tényezők vizsgálata

3/a. A pH hatása a reakciósebességre

Az enzimkatalizis optimális pH-jának meghatározásakor a szubsztrát pH-ját az aktivitásmérés hőmérsékletén, 5o °C-on állitottuk be a kivánt értékre és mértük az aktivtás kinetikáját 5,5-12 pH-tartományban. Ettől eltérő pH-értékeken a kazein kicsapódása miatt a mérések nem kivitelezhetőek. A vizsgálatok során felhasznált pufferrendszerek a következők voltak:

o,1 M KH_2PO_4/Na_2HPO_4 puffer /pH 5,5-8,5/

o,1 M Tris/HCl puffer /pH 7,5-8,7/

o,1 M glicin/NaOH puffer /pH 8,o-12,o/

Az enzimaktivitás változását a pH függvényében a 4. ábrán tüntettük fel. A mérések során a konstans ionerősséget / J=o,1/ NaCl hozzáadásával biztositottuk. Az átfedő pH-tartományokban a puffer ionösszetételétől függetlenül azonos enzimaktivitás mérhető, igy megállapithatjuk, hogy a vizsgált pufferrendszerek komponensei nincsenek hatással az enzim aktivitására.

A kazeinhidrolizis optimális pH-ja 8,7. A reakcióelegy savanyitására az enzim aktivitása gyorsan csökken, mig a lugos tartomány felé haladva a maximumgörbe enyhébb lefutásu. A kisérletekből megállapithatjuk, hogy az aktivitás pH-függése alapján a JB-1 proteáz az alkálikus proteázok közé sorolható.

3/b. A hőmérséklet hatása a reakciósebességre

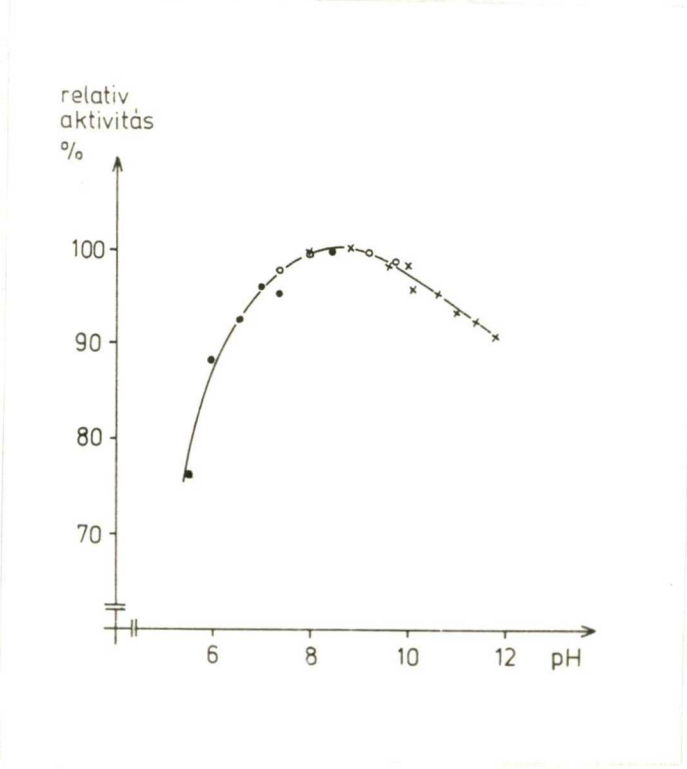
A kazeinhidrolizis hőmérsékletfüggését o,1 M Gly/NaOH pufferben pH 9,o értéken határoztuk meg. 25-8o °C között

5 fokonként emeltük a hőmérsékletet és mértük az enzim aktivitását. 15 perces reakcióidőt választva a hőmérséklet-függési görbe maximumpontja 7o °C környezetében mérhető /5/A. ábra/. Ennél magasabb hőmérsékleten az enzim denaturációja jelentősen felgyorsul, 8o °C-on a maximális aktivitásnak csak mintegy 5o%-a mérhető.

A hőmérsékletfüggés felszálló szakaszában a reakciósebesség logaritmusát ábrázolva az abszolut hőmérséklet reciproka függvényében /Arrhenius összefüggés/ olyan egyenest kapunk, amely 5o °C környezetében törésponttal rendelkezik /5/B. ábra/. A két egyenes szakaszból számolható aktiválási energia-értékek között jelentős a különbség. 5o °C felett a látszólagos aktiválási energia 7,55 kcal/mol /31,6 kJ/mol/, ez az érték csak kb. 1/3-a az 5o °C alatt számolható aktiválási energia értékének, amelyet 2o,4 kcal/mol /85,4 kJ/mol/ értéknek határoztunk meg. Mivel ezen a hőmérsékleten az enzim még 3 órán belül is stabil /lásd 4/a pont/, valószinü, hogy a hőközlés hatására az aktiv centrum környezetében olyan konformációváltozás játszódik le, melynek következtében az enzim katalitikus tulajdonságaiban előnyös változás következik be. Hasonló tranziciós hőmérsékletet tapasztalt H. Zuber /1/ a Bacillus stearothermophilusból izolált tejsav dehidrogenáz esetén, amelynél a konformációváltozás 45 °C környezetében következett be.

3/c. <u>Az EDTA hatása a proteáz müködésére</u>

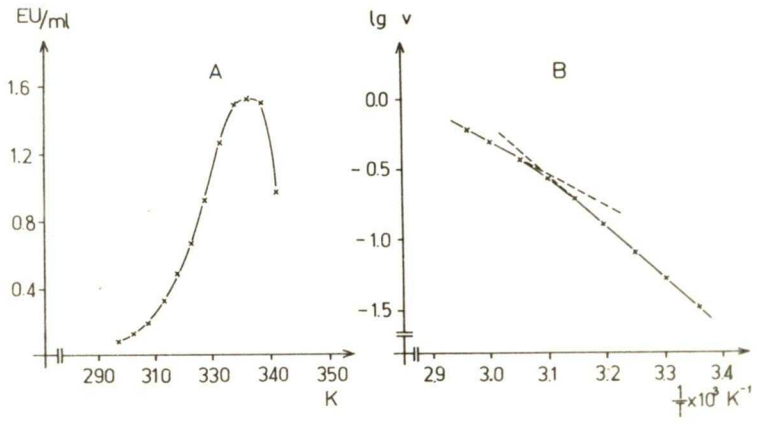
Irodalmi adatok alapján ismert, hogy nagyon sok termofil forrásból izolálható enzim egy-, de főleg kétértékü fémionokat igényel a müködéséhez. A fémion kétféle



4. ábra

A JB-1 proteáz aktivitásának pH-függése 5o °C-on

Az alkalmazott pufferrendszerek o,1 M foszfát /—●—/, Tris/HCl /—o—/ és Gly/NaOH /—x—/ voltak.



5. ábra

A hőmérséklet hatása a JB-1 proteáz aktivitására /A/ és a reakciósebesség hőmérsékletfüggésének Arrhenius szerinti ábrázolása /B/.

A kísérleteket o,1 M Gly/NaOH pufferben /pH 9,o/ végeztük, az inkubálási idő 15 perc volt.

módon fejtheti ki hatsát: vagy az enzim aktiv centrumában található és részt vesz a katalizisben, vagy az aktiv konformáció fenntartásában játszik szerepet. Mindkét esetben komplexképző vegyületekkel a fémionok - vagy egy részük, a kötés erősségétől függően - eltávolithatók.

Kisérleteinkben az EDTA hatását vizsgáltuk meg a proteáz aktivitására és stabilitására.

Az enzimet o,1 M EDTA-t tartalmazó o,1 M Gly/NaOH pufferrel szemben dializálva aktivitáscsökkenést tapasztaltunk az 5o °C-on standard körülmények között történt aktivitásvisszamérés során. Abban az esetben, ha az aktivitást EDTA-val történt kezelés után alacsony hőmérsékleten határozzuk meg, ahol a hődenaturációból származó aktivitáscsökkenéssel nem kell számolnunk, el tudjuk különiteni az EDTA aktivitásra és stabilitásra gyakorolt hatását.

- Az enzimet o,1 M EDTA-t tartalmazó o,1 M Gly/NaOH pufferben /pH 9,o/ o °C-on inkubálva, majd ugyanezen a hőmérsékleten meghatározva azaktivitását, az enzim még 24 órás kezelés után is az aktivitásának loo%-át megőrizte. Levonhatjuk tehát azt a következtetést, hogy az EDTA gátló hatása nem az aktiv centrumban lévő fémion eltávolitásában nyilvánul meg.

- Az EDTA-nak az enzim stabilitására gyakorolt hatását 5o °C hőmérsékleten mértük, az EDTA koncentrációját 10^{-5}-10^{-2} M tartományban változtatva. Az enzim koncentrációja az inkubációs elegyben loo µg/ml volt, a méréseket o,1 M Gly/NaOH pufferben pH 9,o értéken végeztük. Az enzimet EDTA jelenlétében 3 órán keresztül inkubáltuk 5o °C-on,

majd standard körülmények között meghatároztuk a maradék aktivitást. A kezeletlen enzim aktivitását loo%-nak véve, amint az a 6. ábrán látható, az EDTA már 10^{-4}M koncentrációban 5o%-kal csökkenti az enzim stabilitását. Az EDTA koncentrációjának emelésével a gátlás ilyen körülmények között nem fokozható. Figyelembe véve, hogy az enzim molekulasulya 21ooo, igy az inkubálás során az enzim 4,7 x 10^{-6}M koncentrációban van jelen, az EDTA gátló hatása mintegy 2o-szoros feleslegben nyilvánul meg.

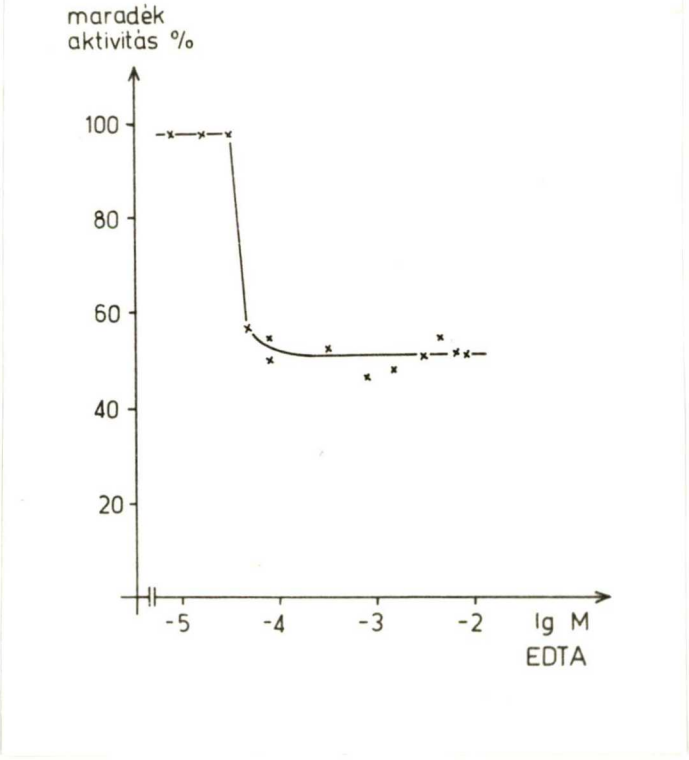
3/d. A kétértékü fémionok hatása a JB-1 proteázra

Az EDTA jelentős gátló hatását figyelembe véve megvizsgáltuk, hogy milyen kétértékü kationok játszanak szerepet az enzim müködésében. A kisérletet a következő fémionokkal végeztük el: Ca^{2+}, Cd^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+} és Mg^{2+}. Az anionhatás kiküszöbölésére a Cu és Zn kivételével a fémek klorid sóit használtuk.

A vizsgálatokhoz az enzimet egy 6 cm³-es Sephadex G-25 oszlopon /1,o x 7,6 cm/ kromatografáltuk 10^{-3}M fémsót tartalmazó o,1 M Gly/NaOH pufferben /pH 9,o/. Az enzimet tartalmazó frakciókat összeöntöttük, majd standard körülmények között /5o °C, pH 9,o/ mértük a proteolitikus aktivitást.

A kationmentes pufferben kromatografált enzim aktivitását tekintve loo%-nak, az egyes ionok enzimaktivitásra gyakorolt hatását a 7. ábrán tüntettük fel. Az oszlopdiagramról leolvasható, hogy a Mn és a Cd jelentős gátló hatást mutat, mig a Ca majdnem 4o%-kal növeli az aktivitást. A többi fémion nem befolyásolja az enzimaktivitást.

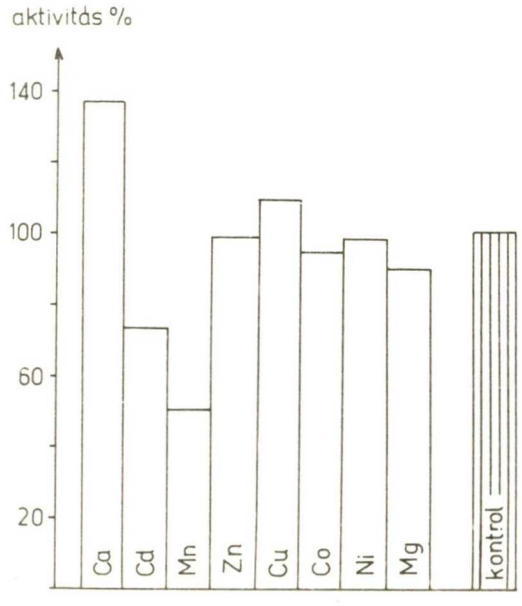
SZEGED



6. ábra

Az EDTA hatása a JB-1 proteáz stabilitására

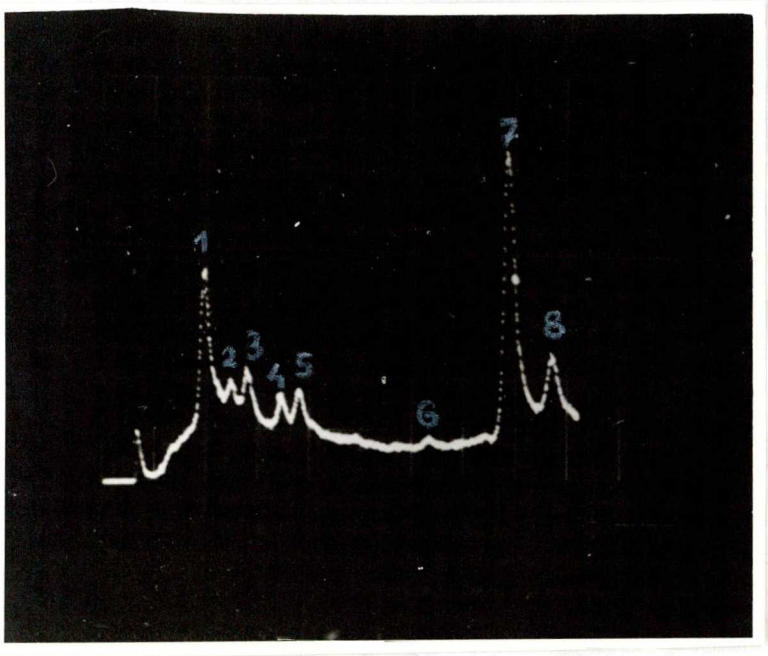
Az enzimet 3 óráig inkubáltuk 5o °C-on, EDTA-t tartalmazó o,1 M Gly/NaOH pufferben /pH 9,o/. Az enzimkoncentráció loo µg/ml.



7. ábra

Kétértékű fémionok hatása a JB-1 proteáz aktivitására

A kísérletekhez az enzimet 10^{-3} M fémiont tartalmazó o,1 M Gly/NaOH pufferben kromatografáltuk.



8. ábra

A tisztitott, liofilezett JB-1 proteáz elektron-gerjesztési spektruma o-1o keV tartományban

A csucsok energiaértékei alapján meghatározott atomok:

1: P, 2,o13 keV

2-3: Cl, 2,631 és 2,815 keV

4-5: Ca, 3,69o és 4,o1 keV

6: Fe, 6,389 keV

7-8: Cu, 8,o4o és 8,9o4 keV

Az enzimet rézhálóra vittük fel.

A Ca kötődését az enzimhez az elektronokkal való gerjeszthetősége alapján, EDAX készülékkel is ki tudtuk mutatni /8. ábra/. A kötődés viszonylag erős, mivel a megkötött ionok Ca-mentes közegben végzett gélszüréssel nem távolithatók el az enzim felületéről.

Kisérleteket végeztünk annak eldöntésére, hogy a Ca ionok az enzim aktivitásában, vagy a stabilitásában játszanak szerepet.

10^{-4}-10^{-2} M $CaCl_2$ jelenlétében o,1 M Gly/NaOH pufferben /pH 9,o/ 3o °C-on, 24 órán keresztül inkubáltuk az enzimet, majd standard körülmények között mértük az aktivitását. Mivel ezen a hőmérsékleten az enzim még 48 órán keresztül is stabil /lásd 4/a pont/, igy amennyiben aktivitásnövekedés tapasztalható, az csak annak a következménye lehet, hogy a Ca ionok az enzim katalitikus aktivitásában is szerepet játszanak. A kisérlet során, a Ca-mentes pufferben inkubált enzimhez képest azonban a $CaCl_2$ koncentrációjától függetlenül nem tapasztaltunk aktivitáscsökkenést. Ez arra utal, hogy a Ca ionok szerepe a stabil konformáció fenntartása magasabb hőmérsékleten. A Ca ionoknak a stabilitásra gyakorolt hatásával a későbbiekben még foglalkozunk.

3/e. Az aktiv centrum természete

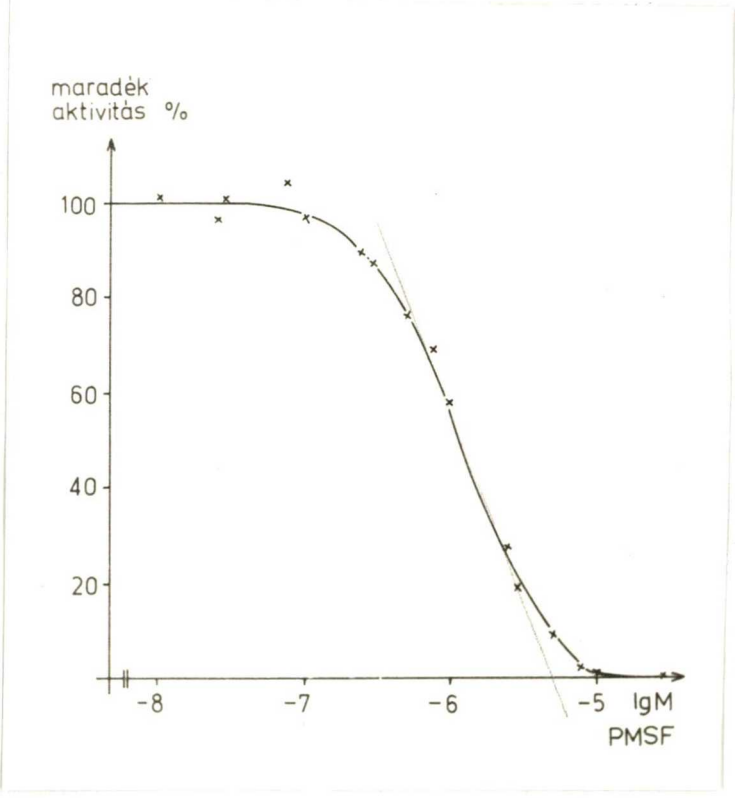
Az eddig ismert semleges, vagy lugos pH-tartományban pH-optimummal rendelkező proteolitikus enzimek aktiv centrumában ciszteil, vagy szeril oldallánc található. Ezeknek az aminosavaknak specifikus kémiai reagensekkel történő módositásakor az enzim elveszti aktivitását.

Kisérleteinkben az SH-reagensek közül a pCMB /10^{-6}-10^{-4}M/,

a jódacetamid /10^{-6}-10^{-3} M/ és az N-etilmaleimid/10^{-6}-10^{-3} M/ hatását, az OH-reagensek közül a PMSF /10^{-8}-10^{-4}M/ hatását vizsgáltuk az enzim aktivitására. Az enzimet 30 percig inkubáltuk a reagensek jelenlétében 0,1 M Gly/NaOH pufferben /pH 9,0/, majd standard körülmények között meghatároztuk a maradék aktivitásokat. Az enzim koncentrációja az inkubációs elegyben 100 µg/ml /4,7 x 10^{-6} M/ volt.

Mig a tiolreagensek esetében az alkalmazott legnagyobb koncentrációban sem tapasztaltunk aktivitáscsökkenést, a PMSF már igen alacsony reagenskoncentrációnál jelentős gátlást mutatott. A kezeletlen enzim aktivitását 100%-nak tekintve az enzim aktivitásának változását a PMSF koncentráció függvényében a 9. ábrán tüntettük fel. A görbéről a 100% gátlást okozó PMSF koncentrációt extrapolálással 4,3 x 10^{-6} M értéknek határoztuk meg. Ez az érték hibahatáro belül megegyezik az enzim koncentrációjával az inkubációs elegyben /4,7 x 10^{-6} M/, amely arra utal, hogy egy molekula enzimmel egy molekula PMSF képes reagálni, igy lehetőség nyilik az enzimkoncentráció pontos meghatározására részlegesen tiszta preparátum esetén is.

Mivel a PMSF csak az aktiv centrumban lévő reaktiv szerin oldalláncal képes reakcióba lépni /20/, megállapithatjuk, hogy a JB-1 extracelluláris fehérjebontó enzim a szerin tipusu alkálikus proteázok közé sorolható.



9. ábra

A fenilmetil-szulfonil fluorid hatása a JB-1 proteáz aktivitására

A méréseket o,1 M Gly/NaOH pufferben /pH 9,o/ végeztük, az enzimkoncentráció az inkubálási elegyben loo µg/ml /4,7 x 10^{-6} M/.

4. Az enzim stabilitását befolyásoló tényezők vizsgálata

4/a. A hőmérséklet hatása a stabilitásra

Az 5o °C-on tenyésztett JB-1 baktérium által termelt extracelluláris enzim viszonylagos belső stabilitással kell, hogy rendelkezzen, mivel a sejt strukturális elemei nem játszhatnak szerepet az aktiv konformáció fenntartásában.

Az enzim hőstabilitásának vizsgálatát o,1 M Gly/NaOH pufferben /pH 9,o/ végeztük. 7o °C-ig különböző hőmérsékleteken inkubáltuk az enzimet, majd standard körülmények között /pH 9,o, 5o °C/ visszamértük a maradék proteolitikus aktivitást. Az eredményeket a 1o. ábrán tüntettük fel.

A JB-1 proteáz a legtöbb mezofil forrásból izolált enzimnél nagyobb stabilitással rendelkezik. 3o °C-on 48 órán keresztül aktivitáscsökkenést nem tapasztaltunk. Az enzim denaturációja 55 °C feletti hőmérsékleteken felgyorsul és 7o °C-on már 2o perc alatt teljesen elveszti aktivitását. A maradék aktivitás %-nak logaritmusa lineárisan változik az inkubálási idővel 5o-7o °C között, tehát a denaturáció elsőrendü rekciót követ.

Kiszámoltuk az egyes hőmérsékleteken a denaturáció sebességi állandóit és az Arrhenius egyenlet alapján a hőinaktiválódás aktiválási energiáját 56,8 kcal/mol /237,8 kJ/mol/ értéknek határoztuk meg.

Összehasonlitásként megvizsgáltuk a tripszin stabilitását is a hőmérséklet függvényében. Az inkubálásokat ebben az esetben a tripszin számára optimális 7,5 pH-értéken

SZEGED

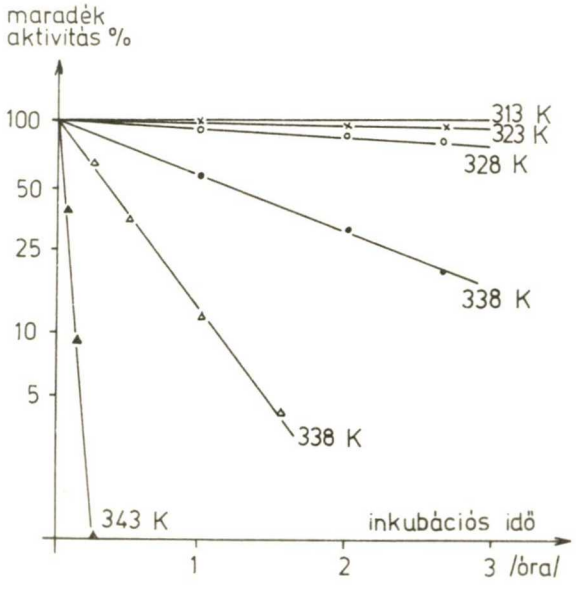
o,1 M foszfát pufferben végeztük, a maradék aktivitásokat 37 °C-on, pH 7,5 kazein szubsztráton határoztuk meg.

A tripszin /amely a mezofil enzimek között a viszonylag stabil fehérjék közé tartozik/ denaturációja lényegesen alacsonyabb hőmérsékleten következik be. A hőinaktiválódás aktiválási energiája 36,6 kcal/mol /266,3 kJ/mol/, amely csaknem fele a JB-1 proteáz aktiválási energiájának.

A kétértékü fémionokkal végzett vizsgálataink során megállapitottuk, hogy a Ca ionok szerepet játszanak a JB-1 proteáz aktiv konformációjának fenntartásában. A stabilitásvizsgálatokhoz használt 4o µg/ml enzimkoncentrációnál a stabilitáshoz szükséges Ca mennyiségének meghatározására az enzimet $1o^{-5}$-$1o^{-2}$ M $CaCl_2$ tartalmu o,1 M Gly/NaOH pufferben oldottuk és mértük a hődenaturáció kinetikáját 7o °C-on. Az enzim felezési idejének változását a Ca ion koncentráció függvényében a 11. ábrán mutatjuk be. Az enzim már 3 x $1o^{-3}$ M koncentrációnál telitődik Ca-mal, igy a továbbiakban 1o mM $CaCl_2$ jelenlétében dolgoztunk.

Az enzim denaturációja Ca jelenlétében is elsőrendü reakció szerint játszódik le, gyors inaktiválódás azonban csak 7o °C feletti hőmérsékleten következik be./12. ábra/. Az Arrhenius egyenlet segitségével meghatározott aktiválási energia értéke 118 kcal/mol /494 kJ/mol/, amely kb. kétszerese a Ca hiányában mérhető aktiválási energia értékének.

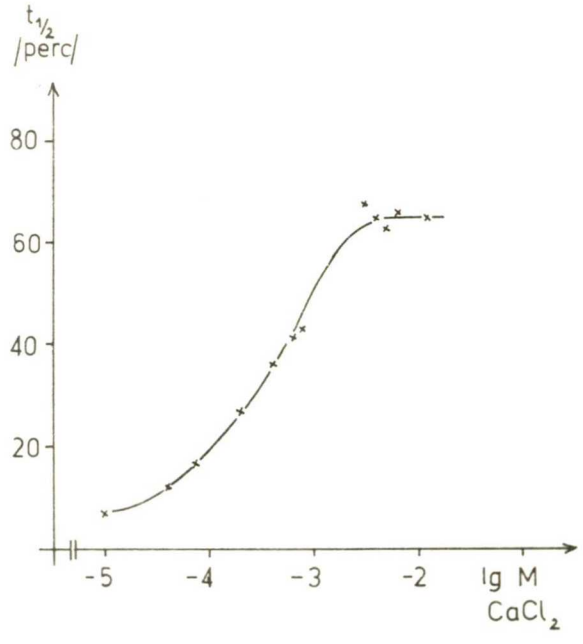
A JB-1 extracelluláris proteáz tehát a termostabilis enzimek közé tartozik. A termolizinre és a Bacillus subtilis neutrális proteáz A-ra Pangburn és mtsi /11/ által közölt



lo. ábra

A hőmérséklet hatása a JB-1 proteáz stabilitására

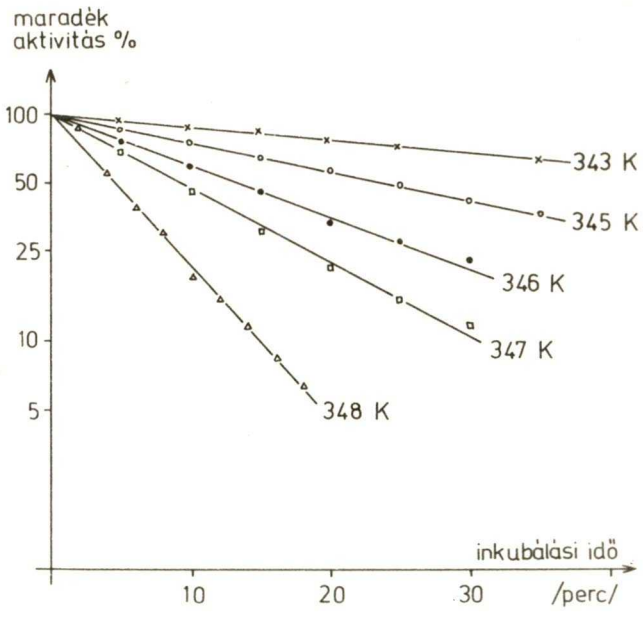
Az enzimet 4o-7o °C /313-343 K/ közötti hőmérsékleten o,1 M Gly/NaOH pufferben /pH 9,o/ inkubáltuk. Az enzimkoncentráció 4o µg/ml.



11. ábra

A Ca hatása a JB-1 proteáz hődenaturációjának sebességére 7o °C-on.

A méréseket o,1 M Gly/NaOH puffereben /pH 9,o/ végeztük, az enzimkoncentráció 4o µg/ml.



12. ábra

A JB-1 proteáz hőinaktiválódásának kinetikája 1o mM $CaCl_2$ jelenlétében 7o °C /343 K/ feletti hőmérsékleten

A méréseket o,1 M Gly/NaOH pufferben /pH 9,o/ végeztük, az enzimkoncentráció 4o µg/ml volt.

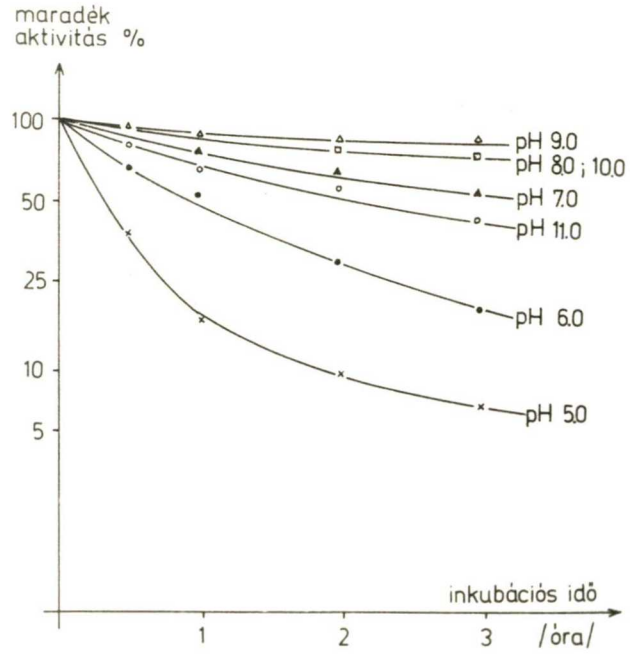
adatok, valamint a Nagarse bakteriális proteázzal és a marha tripszinnel végzett saját kisérleteink alapján a következő táblázatban hasonlitottuk össze az egyes proteázok stabilitását jellemző adatokat. A táblázatban feltüntetett $T_{1/2}$ érték annak a hőmérsékletnek felel meg, amelyen az enzim 15 perc alatt az aktivitásának 5o%-át elveszti.

enzim	$T_{1/2}$ /°C/
termolizin /pH 8,2/	84
neutrális proteáz A /pH7,5/	59
Nagarse proteáz /pH 8,5/	52
marha tripszin /pH 7,5/	57
JB-1 proteáz /pH 9,o/	73

4/b. A pH hatása a stabilitásra

A pH hatását a JB-1 proteáz stabilitására o,1 M foszfát, 5o mM Tris/HCl és o,1 M Gly/NaOH pufferekben vizsgáltuk. Az adott pH-ju pufferekben különböző ideig inkubáltuk az enzimet, majd standard körülmények között /5o °C, pH 9,o/ meghatároztuk a maradék proteolitikus aktivitásokat. Az eredményeket a o perces aktivitásérték %-ban adtuk meg.

A pH hatása erősen függ az inkubálás hőmérsékletétől. 3o °C-on a vizsgált pH-tartományban /5,5-11,o/ 8 órán keresztül nem tapasztaltunk aktivitáscsökkenést. 5o °C-on az enzim a 8-1o pH-tartományban mutatja a legnagyobb stabilitást /13. ábra/. A pH hatására bekövetkező denaturáció két lépésre bontható, egy kezdeti gyorsabb inaktiválódási

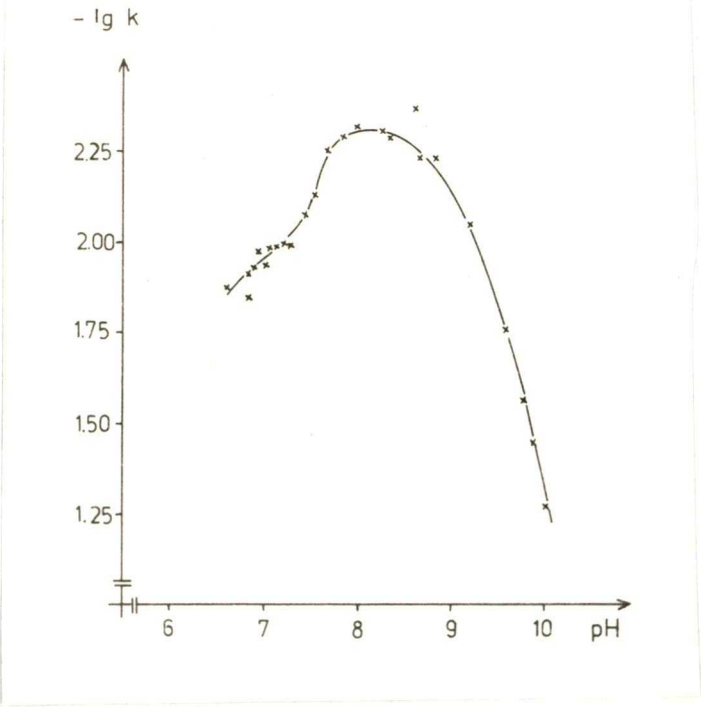


13. ábra

A pH hatása a JB-1 proteáz stabilitására 5o °C-on

A kisérletekben felhasznált pufferrendszerek: o,1 M foszfát, Tris/HCl és Gly/NaOH.

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED



14. ábra

A 7o °C-os hőinaktiválódás reakciósebességi állandóinak pH-függése 1o mM $CaCl_2$ jelenlétében

A méréseket 5o mM Tris/HCl és Gly/NaOH pufferekben végeztük, az enzimkoncentráció 4o µg/ml.

szakasz után a rekció lelassul. A kétlépcsős kinetika a savas pH-tartomány felé haladva egyre kifejezettebbé válik. A kétlépcsős hőinaktiválódási kinetika valószinüleg a denaturációval párhuzamosan növekvő önemésztésből adódó aktivitásveszteségből ered.

7o °C-on lo mM $CaCl_2$ jelenlétében 5o mM Tris/HCl és o,1 M Gly/NaOH pufferekben vizsgáltuk az enzim stabilitásának pH-függését. Ebben az esetben a hődenaturáció elsőrendü reakció szerint játszódik le. Az inaktiválódás sebességi állandóinak logaritmusát ábrázolva a pH függvényében /14. ábra/ megállapithatjuk, hogy a hőmérséklet emelésével az enzim stabilitása szempontjából a semleges, vagy enyhén lugos pH-tartomány /7,5-8,5/ kedvezőbb.

4/c. <u>Detergensek hatása a JB-1 proteáz stabilitására</u>

A biokémiában a fehérjék konformációjának vizsgálatára régóta használnak olyan vegyületeket, amelyek a nativ szerkezet megbomlását eredményezik. Az urea a fehérjén belüli hidrogénhidak mennyiségét csökkenti, az SDS apoláros kölcsönhatásba lépve a fehérjékkel a molekula kitekeredését okozza, a magas sókoncentráció hatására az ellentétes töltésü aminosavoldalláncok közötti sóhidak megszünnek, vagy másutt alakulnak ki, a szerves oldószerek csökkentik a közeg dielektromos állandóját, ezáltal az aminosavoldalláncok disszociációjának mértékét és gyakran koagulációt válthatnak ki.

Kisérleteinkben a reagensek hatását az enzim stabilitása szempontjából optimális pH 9,o o,1M Gly/NaOH pufferben vizsgáltuk.

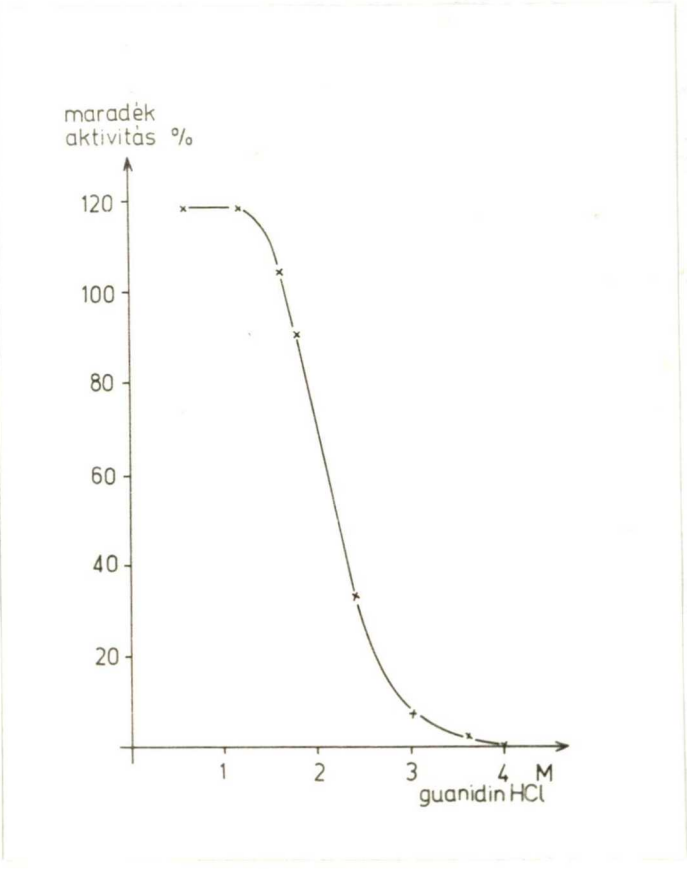
A JB-1 proteáz a detergensek hatásával szemben nagyon ellenálló. 3o °C-on 3o percig inkubálva az enzimet, gátló hatást csak a guanidin-HCl esetében tapasztaltunk, melynek koncentrációfüggését mutatja a 15. ábra. Az enzim aktivitása 3 M guanidin-HCl jelenlétében már teljesen megszünik.

Alacsony hőmérséklen a JB-1 proteáz 1% SDS és 8 M urea jelenlétében stabilnak bizonyult. Mivel a két detergens hatása erősen függ a hőmérséklettől, az enzimet a detergensek jelenlétében 15 percig inkubáltuk 2o-7o °C hőmérsékleten, majd mértük a maradék aktivitást. A 16. ábrán látható, hogy a reagens hatására az enzim stabilitása már 4o °C felett lecsökken és a teljes denaturáció 1% SDS jelenlétében már 55 °-on, 8 M urea jelenlétében 65 °C-on bekövetkezik. Megfigyelhetjük ugyanakkor azt is, hogy az urea mintegy 1o %-kal megnöveli az aktivitást alacsony hőmérsékleten.

o,5-2,o M NaCl hatására az enzim stabilitása magasabb hőmérsékleten /55-7o °C/ mintegy 2o%-kal nő, az aktivitása ugyanakkor nem változik. A KCl hasonló koncentrációban néhány %-kal kisebb stabilitásnövekedést okozott.

A JB-1 proteáz 2 mg/ml koncentrációban oldható metanolban is, és aktivitása 3o °C-on, 3o perces inkubálás után sem csökken.

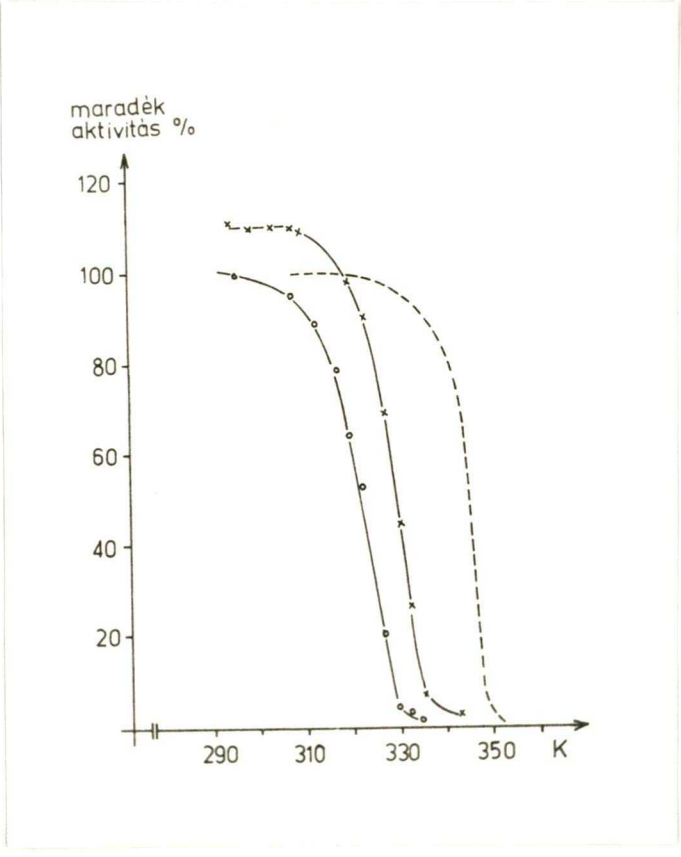
Az alkalmazott detergensek hatását összehasonlitva valószinünek látszik, hogy az enzim fokozott stabilitásában az aminosavoldalláncok között kialakulható belső sóhidaknak nincs, vagy csak igen kicsi a jelentősége. A magasabb hőmérsékleten kialakuló konformáció stabilizálásában a Ca ionokon kivül valószinüleg még a hőmérésklettel növekvő apoláros kölcsönhatások játszhatnak szerepet.



15. ábra

A guanidin-HCl hatása a JB-1 proteáz stabilitására

Az enzimet 3o °C-on 3o percig inkubáltuk a guanidin-HCl-t tartalmazó o,1 M Gly/NaOH pufferben /pH 9,o/.



16. ábra

A JB-1 proteáz stabilitásának hőmérséklet-függése 8 M urea és 1% SDS jelenlétében.

Az enzimet és a reagenseket 1o mM $CaCl_2$ tartalmu Gly/NaOH pufferben /pH 9,o/ oldottuk, az inkubációs idő 15 perc, az enzimkoncentráció 4o µg/ml volt.

—x— 8 M urea

—o— 1% SDS

—— kontrol

SZEGED

5. A JB-1 proteáz immobilizálása és az immobilizált enzim tulajdonságai

5/a. Immobilizálás BrCN-Sepharose 4B gélre

A fehérje kovalens kapcsolását a gélhez a III/5. pontban ismertettük.

Az eljárás során 1 g száraz gélhez 19,6 mg fehérje kötődött, amely a kiindulási fehérjemennyiség mintegy 8o %-a. A gélhez kovalensen kötött proteáz specifikus aktivitása kb. kétszerese az oldott enzimének. A nem kötött, kimosható fehérjék nem tartalmaztak aktiv enzimet. Az immobilizálás adatait az alábbi táblázatban foglaltuk össze:

	össz. feh. /mg/	%	össz. akt. /EU/	%	spec. akt. /EU/mg/
oldott enzim	23,8	1oo	41,8	1oo	1,76
nem kötődött enzim	4,4	17,6	o,48	1,2	-
gélhez kötött enzim	19,6	82,5	67,6	161,8	3,46

5/b. Az immobilizált proteáz tulajdonságai

A géhez kötött enzim aktivitásmérésének standard körülményei megegyeztek az oldott enzimre leirtakkal /5o °C, pH 9,o denaturált kazein szubsztrát/, azzal a különbséggel, hogy a gélszuszpenziót kevertetve időnként 1-1 ml mintát vettünk és azt 2 ml 1o%-os TCA-ba pipettázva állitottuk le a reakciót.

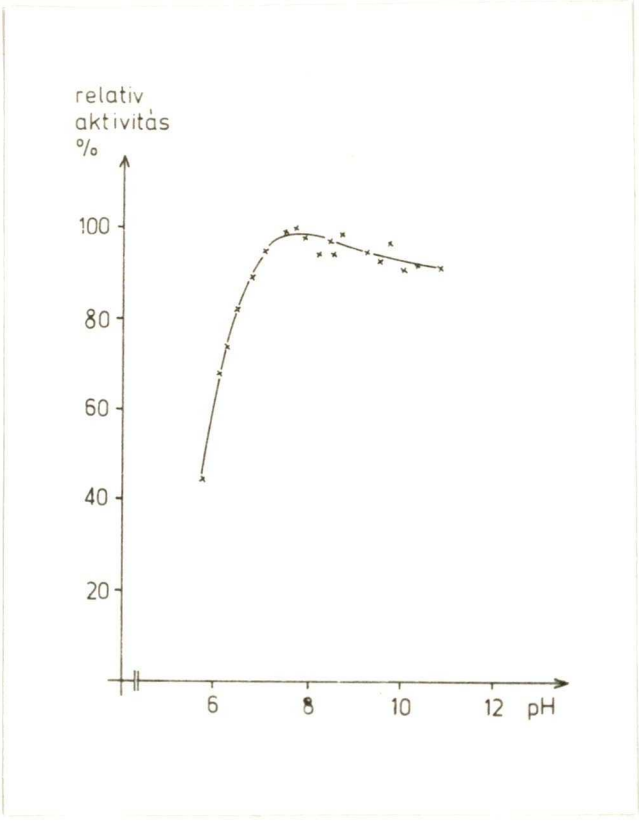
Az enzimaktivitás pH-függését vizsgálva o,1 M foszfát, Tris/HCl és Gly/NaOH pufferekben /pH 5,5-11,o/ megállapítottuk, hogy az aktivitás az oldott enzimhez hasonlóan változik a H-ion koncentráció függvényében. Az enzim az alkálikus pH-tartományban pH 8-11 között még a maximális aktivitás 9o%-val képes katalizálni a reakciót. A savas tartomány felé haladva az aktivitás gyorsabban csökken, mint oldott enzim esetén. A maximális aktivitás immobilizált proteázra pH 7,8 értéknél mérhető /17. ábra/.

Az oldott enzimhez hasonlóan, az immobilizált enzim maximális aktivitása pH 9,o értéken 15 perces reakcióidő alatt ugyancsak 7o °C környezetében mérhető /18/A. ábra/. Lényeges különbség mutatkozik azonban abban az esetben, ha a reakciósebességek logaritmusának változását az abszolut hőmérséklet reciproka függvényében vizsgáljuk /18/B. ábra/. Az oldott enzimtől eltérően egy olyan töréspont nélküli egyenest kapunk, amely csaknem párhuzamos az oldott enzimre kapott 5o °C feletti egyenes szakasszal. A töréspont eltünése valószinüleg annak következménye, hogy az immobilizáláskor az enzimmolekula konformációs motilitása lecsökken. Az alacsony aktiválási energia értékből /lo,1 kcal/mol, ill. 42,3 kJ/mol/ arra következtethetünk, hogy a kovalens kapcsolat kialakulásakor egy olyan konformáció rögzül, amely a kazein hidrolizise szempontjából kedvezőbb.

5/c. <u>Az immobilizált JB-1 proteáz alkalmazása katalizátor oszlopként</u>

Az immobilizált JB-1 proteázzal egy 2,3 cm³-es oszlopot /o,6 x 8,o cm/ töltöttünk és vizsgáltuk a kazein hidroli-

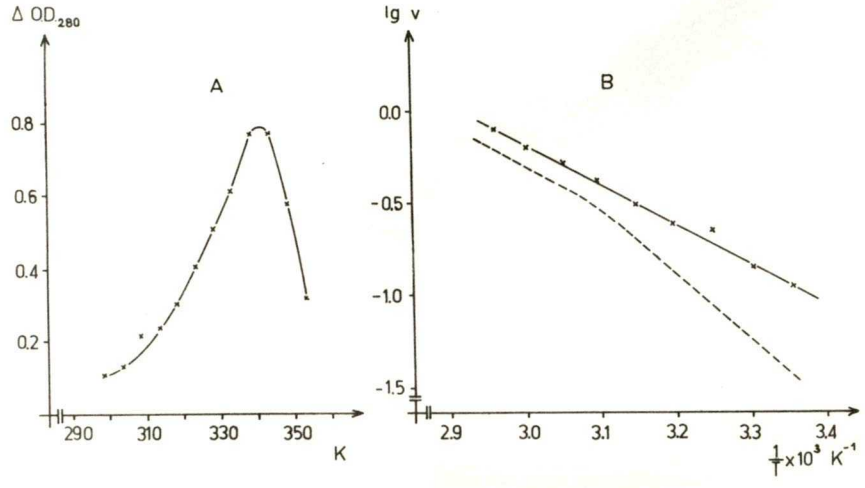
SZEGED



17. ábra

Az immobilizált JB-1 proteáz aktivitásának pH-függése

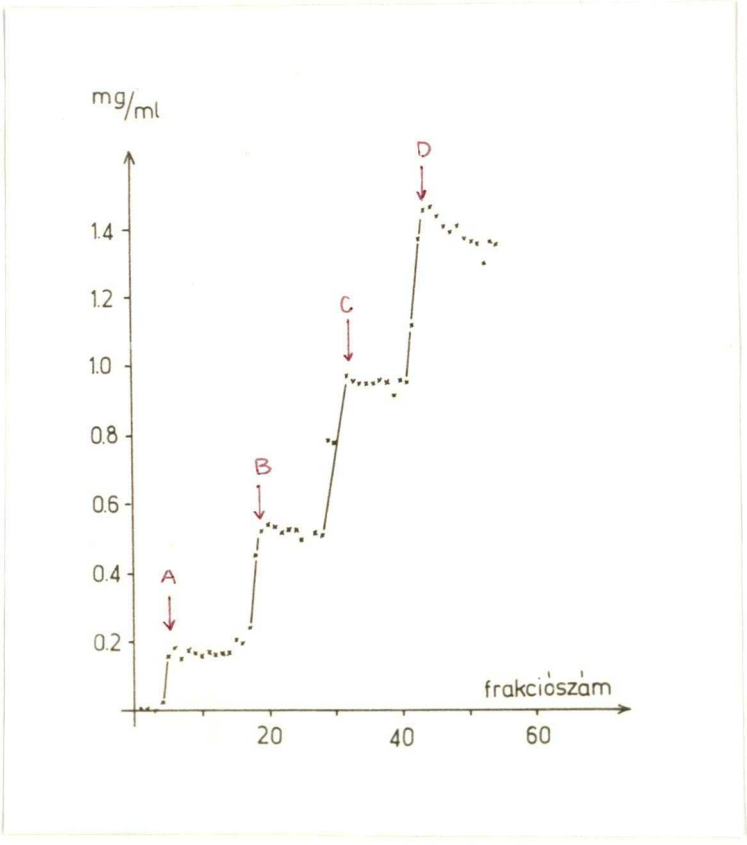
Az enzim aktivitását o,1 M foszfát, Tris/HCl és Gly/NaOH pufferekben, 5o °C-on mértük.



18. ábra

A hőmérséklet hatása a JB-1 proteáz aktivitására /A/ és a reakciósebesség hőmérsékletfüggésének Arrhenius szerinti ábrázolása /B/

A kisérleteket o,1 M Gly/NaOH pufferben /pH 9,o/ végeztük, az inkubálási idő 15 perc volt.



19. ábra

A kazeinkoncentráció hatása a fehérjehidrolizis hatékonyságára az immobilizált JB-1 proteáz katalizátor-oszlopként való alkalmazásakor

oszloptérfogat: 2,3 cm³ /o,6 x 8,o cm/

átfolyási sebesség: 18 ml/óra

Az oszlopra felvitt kazein oldat koncentrációja :

A: 1,o mg/ml

B: 2,5 mg/ml

C: 5,o mg/ml

D: 8,o mg/ml

zis sebességének az átfolyási sebességtől, valamint a fehérjekoncentrációtól való függését. A kisérletek során o,1 M Gly/NaOH pufferben /pH 9,o/ oldott denaturált kazeinnel dolgoztunk, az oszlopot és a szubsztrát oldatát 5o °C-on termosztáltuk. A kromatográfia során 1 ml-es frakciókat szedtünk, majd mindegyik mintához 2 ml lo%-os TCA oldatot pipettáztunk. A csapadék centrifugálása után mértük a felülúszó fényelnyelését 28o nm hullámhosszon.

1 mg/ml-es kazein oldatot átfolyatva az oszlopon megállapitottuk, hogy az átfolyási sebesség emelése 3 ml/óra értékről 3o ml/óra értékre nem változtatja meg a hidrolizis mértékét. Ennél nagyobb átfolyási sebességet a géloszlop áteresztőképessége nem tesz lehetővé.

18 ml/óra konstans átfolyási sebesség mellett ezután 1-8 mg/ml kazeinkoncentrációnál vizsgáltuk a hidrolizis mértékét /19. ábra/. Ha a kiindulási kazein oldat 28o nmen mért fehérjetartalmát tekintjük loo%-nak, a konverzió a fehérje koncentrációjától függetlenül csak mintegy 2o%-os. A limitált proteolizisből arra következtethetünk, hogy az enzim a peptidkötéseket nem azonos sebességgel hasitja, tehát bizonyos kötésekre specifikus.

V. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során egy uj, fakultativ termofil baktériumot izoláltunk /JB-1/, amely rendszertani besorolás alapján a Bacillus genusba tartozik, de a növekedés hőmérséklet-optimumában eltér azoktól. A baktérium kazeint tartalmazó tápoldatban tenyésztve termostabil extracelluláris proteolitikus enzimet termel.

Az enzimet a fermentléből ammonium-szulfátos frakcionálással, ioncserés kromatográfiával /DEAE-cellulóz/ és gélkromatográfiával /Sephadex G-5o/ tisztitottuk. A tisztitott enzim molekulasulya 21ooo.

A JB-1 proteáz a DIFP-szenzitiv alkálikus proteázok közé tartozik, pH-optimuma 8,7. Aktiv centrumában fémiont nem tartalmaz, az enzimkatalizisben egy szerin oldallác vesz részt, amely PMSF-el mol/mol arányban gátolható.

Az enzim a mezofil forrásból izolált proteázoknál /tripszin, Nagarse proteáz, Bacillus subtilis neutrális proteáz A/ nagyobb stabilitással rendelkezik, stabilitása azonban kisebb a Bacillus thermoproteoliticusból izolált termolizinnél.

Az enzim szorosan kötött Ca ion/oka/t tartalmaz, amely/ek/ gélkromatográfia során nem disszociálnak le a fehérjéről. Oldatból további Ca ionokat képes megkötni, melyek fokozzák a stabilitását magasabb hőmérsékleten /1o mM külső $CaCl_2$ koncentráció esetén a hőinaktiválódás aktiválási energiája kétszerese a Ca hiányában mért értéknek/. A Ca ionokat EDTA-val eltávolitva az enzim már 5o ^{o}C-on labilissá válik.

Alacsony hőmérsékleten a JB-1 proteáz nagyfoku stabilitást mutat a pH /5-11/ és a denaturálószerek /8 M urea, 1% SDS, metanol/ hatásával szemben, a denaturációcsak 4o °C feletti hőmérsékleten gyorsul fel.

Kisérleti eredményeink alapján a JB-1 proteáz hőmérséklet-hatásokkal szemben mutatott viselkedését a következőképpen magyarázzuk:

Alacsony hőmérsékleten a H-hidak jelentős szerepet játszhatnak a fehérje konformációjának stabilizálásában. A hőmérséklet emelésével közölt energia hatására a H-hidak egy része felbomlik és 5o ° környezetében egy uj, az aktivitás szempontjából előnyösebb konformáció alakul ki /Erre utal a töréspont az Arrhenius egyenesben, valamint hogy 5o °C felett kisebb az aktiválási energia/, amelyet, vagy egy ehhez nagyon hasonló konformációt immobilizálással rögziteni lehet. Ez a konformáció urea hatására alacsonyabb hőmérsékleten is kialakulhat /3o °C-on az urea növeli az aktivitást/. Az aktiv konformáció stabilizálásában magas hőmérsékleten valószinüleg apoláros kölcsönhatások /az enzim apoláros karakterü, metanolban oldható/ és a Ca ionok játszanak jelentős szerepet.

Szeged

VI. IRODALOMJEGYZÉK

1. H. Zuber, 1979. Structure and function of enzymes from thermophilic microorganisms. Strategies of life in extreme environments, ed. M. Shilo /393-415/. Berlin: Dahlem Konferenzen.

2. R.W. Castenholz, 1979. Evolution and ecology of thermophilic microorganisms. Strategies of life in extreme environments, ed. M. Shilo /373-392/. Berlin: Dahlem Konferenzen.

3. E. Degryse, 1976. Bacterial diversity at high temperature. Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms, ed. H. Zuber /4o1-41o/. Basel and Stuttgart: Birkhauser.

4. M.B. Allen, 1953. The thermophilic aerobic sporeforming bacteria. Bacteriol. Rev. 17, /125-173/.

5. B. Bubela, E.S. Holdsworth, 1966. Amino acid uptake, protein and nucleic acid synthesis and turnover in Bacillus stearothermophilus. Biochem. Biophys. Acta, 123, /364-375/.

6. T. Kenkel, J.M. Trela, 1979. Protein turnover in extreme thermophile Thermus aquaticus. J. Bacteriol. 14o, /543-546/.

7. T.D. Brock, 1967. Life at high temperature. Science 158, /1o12-1o19/.

8. R. Singleton, R.E. Amelunxen, 1973. Proteins from thermophilic microorganisms. Bacteriol. Rev. 37, /32o-342/.

9. T. Oshima, Y. Sakaki, N. Wakayama, K. Watanabe, Z. Ohashi, S. Nishimura, 1976. Biochemical studies on an extreme thermophile Thermus thermophilis: Thermal stabilities of cell constituens and bacteriophage. Symposium on Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms, ed. H. Zuber /317- 331/. Basel and Stuttgart: Birkhauser.

10. B.W. Matthews, L.H. Weaver, W.R. Kester, 1974. The conformation of thermolysin. J. Biol. Chem. 249, /8030-8044/.

11. M.K. Pangburn, P.L. Levy, K.A. Walsh, H. Neurath, 1976. Thermal stability of homologous neutral metalloendopeptidases in thermophilic and mesophilic bacteria: Structural consideration. Symposium on Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms, ed. H. Zuber, /19-30/. Basel and Stuttgart: Birkhauser.

12. W.E. O'Brien, J.M. Brewer, L.G. Ljungdahl; 1976. Chemical, physical and enzymatic comparisons of formyltetrahydrofolate synthetases from thermo- and mesophilic Clostridia. Symposium on Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms, ed. H. Zuber, /249-262/. Basel and Stuttgart: Birkhauser.

13. J.D. Hocking, J.I. Harris, 1976. Glyceraldehyde-3--phosphate dehydrogenase from an extreme thermophile, Thermus aquaticus. Symposium on Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms, ed. H. Zuber, /121-134/. Basel and Stuttgart: Birkhauser.

14. K. Watanabe, T. Oshima, M. Saneyoshi, S. Nishimura, 1974. Replacement of ribothymidine by 5-methyl-2-thiouridine in sequence GT4C in tRNA of an extreme thermophile. FEBS Lett. 43, /59-63/.

15. T. Oshima, 1979. Molecular basis for unusual thermostabilities of cell constituents from an extreme thermophile Thermus thermophilus. Strategies of life in extreme environments, ed. M. Shilo, /455-469/. Berlin: Dahlem konferenzen.

16. R.E. Amelunxen, A.L. Murdock, 1978. Mechanism of thermophily. CRC Critical Revs. Microbiol. /343-393/.

17. J.W. Crabb, A.L. Murdock, R.E. Amelunxen, 1975. A proposed mechanism of thermophily in facultative thermophiles. Biochem. Biophys Res. Commun. 62, /627- 633/.

18. E. Stellvagen, L.D. Barnes, 1976. Analysis of the thermostability of enolases. Symposium on Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms, ed. H. Zuber, /223-228/. Basel and Stuttgart: Birkhauser.

19. H. Matsubara, J. Feder, 1971. Other bacterial, mold and yeast proteases. "The Enzymes", ed. P.D. Boyer, vol. III. Acad. Press, New York /121/.

20. D.S. Sigman, G. Mooser, 1975. Chemical studies of enzyme active sites. Ann. Rev. Biochem. 44, 889-931.

21. J. Kraut, 1977. Serine proteases: Strzcture and mechanism of catalysis. Ann. Rev. Biochem. 46, 331-358.

22. S. Endo, 1962..Studies on protease produced by thermophilic microorganism. Hakko Kogaku Zasshi 40, 346-353. /Chemical Abstracts 62, /5504/, 1965.

23. J. Feder, L.R. Brougham, B.S. Wildi, 1974. Inhibition of thermolysin by dipeptides. Biochem. 13, /1186-1189/.

24. Y. Ohta, Y. Ogura, A. Wada, 1966. Thermostable protease from thermophilic bacteria. I. Thermostability, physicochemical properties and amino acid composition. J. Biol. Chem. 241, /5919-5925.

25. Y. Ohta, 1967. Thermostable protease from thermophilic bacteria. II. Studies on the heat stability of the protease. J. Biol. Chem. 242, /509-515/.

26. A. Fontana, E. Doccu, F.M. Veronese, 1975. Effect of EDTA on the conformational stability of thermolysin. Symposium on Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms, /229-236/. Zürich, 1975. Birkhauser Verlag, Basel, 1976.

27. K. Titani, M.A. Hermodson, L.H. Ericsson, K.A. Walsh, H. Neurath, 1972. Amino acid sequence of thermolysin. Nature /London/ 238,/35-41/.

28. P.M. Colman, J.N. Jansonius, B.W. Matthews, 1972. The structure of thermolysin: an electron density map at 2,3 Å resolution. J. Mol. Biol. 70, /701-724/.

29. B.W. Matthews, L.H. Weaver, W.R. Kester, 1974. The conformation of thermolysin. J. Biol. Chem. 249, /8o3o-8o44/.

3o. G. Woordouw, R.S. Roche, 1975. The role of bound calcium ions in thermostable proteolytic enzymes. II. Studies on thermolysin, the thermostable protease from Bacillus thermoproteolyticus. Biochem. 14, /4667-4673/.

31. G. Woordouw, C. Milo, R.S. Roche, 1976. Role of bound calcium ions in thermostable, proteolytic enzymes. Separation of intrinsic and calcium ion contribution to the kinetic thermal stability. Biochem. 15, /3716-3723/.

32. F.W. Dahlquist, J.W. Long, W.L. Bigbee, 1975. Role of calcium ions in the thermal stability of thermolysin. Biochem. 15, /11o3-1111/.

33. W. Sidler, G. Frank, H. Zuber, 1977. Production, large scale isolation procedure and N-terminal sequence studies of extracellular thermostable neutral proteases from B. stearothermophilus and B. Caldolyticus. Experientia, 33, /8oo/.

34. P.S. Ong, G.M. Gaucher, 1976. Production, purification and characterization of thermomicolase, the extracellular serine protease of the thermophilic fungus Malbranchea pulchella var. sulfurea. Canad. J. Biochem. 22, /165-176/.

35. G. Woordouw, G.M. Gaucher, R.S. Roche, 1974. Physicochemical properties of thermomicolase, the thermostable, extracellular serine protease of the fungus Malbranchea pulchella. Canad. J. Biochem. 52, /981-99o/.

36. G. Woordouw, R.S. Roche,1975. Biochem. 14, /4659-4666/. The role of bound calcium ions in thermostable proteolytic enzymes. I. Studies on thermomicolase, the thermostable protease from the fungus Malbranchea pulchella.

37. K. Mizusawa, F. Yoshida, 1976. Role of sulfhydryl group in the structure and function of alkaline proteases from thermophilic Actinomycete. Symposium on Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms, ed. H. Zuber, /61-66/. Basel and Stuttgart: Birkhauser.

38. A. Täufel, U. Behnke, H. Ruttloff, 1979. Gewinnung und charakterisierung von Proteasen aus Thermoactinomyces vulgaris. IV. Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie 19, /129-138/.

39. C. Frömmel, G. Hausdorf, W.E. Höhne, U. Behnke, H. Ruttloff, 1978. Charakterisierung einer Protease aus Thermoactinomyces vulgaris /thermitase/ 2. Acta Biol. Med. Germ. 37, /1193-1204/.

40. P. Bendzko, R. Hintsche, 1978. Untersuchungen zur Konformatiostabilität der Thermostabilen Alkalischen Serin-protease Thermitase. Studia Biophysica, Berlin, 72, /61-67/.

41. M.L. Anson, 1938. J. Gen. Physiol, 22,/79-89/.

RÖVIDITÉSEK

DEAE-cellulóz: dietil-amino-etil-cellulóz

DIFP: diizopropil-fluorofoszfát

EDTA: etiléndiamin-tetra-ecetsav Na_2 só

NEM : N-etil-maleimid

pCMB: p-klórmerkuri-benzoát

PMSF: fenilmetil-szulfonil fluorid

SDS : Natrium-dodecil-szulfát

Tris: Tris-hidroximetil-aminometán

Jósef Attila Tudományegyetem Könyvtár SZEGED

Ezuton szeretnék köszönetet mondani dr. Boross László nak, a Biokémiai Tanszék vezetőjének, hogy lehetőséget nyujtott számomra a kisérletek elvégzésére és szakmai tanácsaival hatékonyan segitette munkámat.

Köszönöm dr. Ferenczy Lajosnak, a Mikrobiológia Tanszék vezetőjének és munkatársainak, hogy a baktérium előzetes rendszertani besorolását elvégezték.