

B 3650

**A KARBOXIPEPTIDÁZ A JELLEMZÉSE, RÖGZÍTÉSE;  
SZINTETIKUS REAKCIÓK VIZSGÁLATA SZERVES  
OLDÓSZERES KÖZEGBEN**

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Készítette: Vértesi Adél**

**Témavezető: Dr. Lehoczki Endréné Dr. Simon Mária**  
**egyetemi docens**

**JÓZSEF ATTILA TUDOMÁNYEGYETEM**  
**BIOKÉMIAI TANSZÉK**

**SZEGED**

**1999**

# TARTALOMJEGYZÉK

## Oldalszám

<b>1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS</b>	1
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	3
2.1. <i>A karboxipeptidáz A (CPA) általános jellemzése</i>	3
2.1.1. A CPA másodlagos szerkezete	4
2.1.2. A fémek szerepe az enzim működésében	5
2.1.3. Vízmolekulák a CPA szerkezetében	6
2.1.4. Szubsztrátspecifitás, a peptidszubsztrát kötődése	6
2.1.5. A kötésben, és a katalízisben szerepet játszó oldalláncok	7
2.1.6. Katalízis elméletek	8
2.1.7. A CPA észteráz aktivitása	9
2.1.8. Az enzim gátlása, inhibitorok	10
2.2. <i>Rögzített enzimek, enzimrögzítési módszerek</i>	11
2.2.1. Adszorpció	12
2.2.2. Ionos kötés	13
2.2.3. Rögzítés keresztkötések létrehozásával	13
2.2.4. Gélbe polimerizálás	13
2.2.5. Bezárás szemipermeabilis membránnal	14
2.2.6. Bezárás szálak üregeibe	14
2.2.7. Rögzítés kovalens kötéssel	15
2.2.7.1. Rögzítés aldehid funkciós csoportot tartalmazó hordozóhoz	15
2.2.7.2. Kötés poliakrilamid gélekhez p-benzokinonos aktiválással	16
2.2.7.3. Rögzítés karboxil csoportot tartalmazó hordozóhoz	17
2.2.8. Rögzített karboxipeptidázok és felhasználásuk a gyakorlatban	17
2.2.9. Rögzített CPA előállítása	19
2.2.10. A CPA stabilizálásának új formái	20
2.3. <i>Biokatalitikus reakciók kevés vizet tartalmazó, nem hagyományos közegekben</i>	21
2.3.1. A szerves oldószerek fehérjeszerkezetre gyakorolt hatása	22
2.3.2. A szerves oldószeres rendszerek jellemzése (log P, a <sub>w</sub> értékek)	23
2.3.3. Az enzim stabilitásának, aktivitásának fokozása	26
2.3.4. Enzimekkel szerves oldószeres közegben végrehajtott szintetikus reakciók	26
2.3.4.1. N-acil aminosavak szintézise (aminosavak N-védelme)	27
2.3.4.2. Kémiai, és enzimatisz peptidszintézisek jellemzése	28
2.3.5. Enzimatisz peptidszintézisek	30
2.3.5.1. Peptidszintézis karboxipeptidázokkal	31
<b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	34
3.1. <i>Anyagok</i>	34
3.2. <i>Módszerek</i>	35
3.2.1. CPA preparálás	35
3.2.2. CPA aktivitásmérés	36

3.2.3. Minták fehérjetartalmának meghatározása	37
3.2.4. Rögzített CPA előállítása	37
3.2.4.1. Rögzítés polietilén-tereftalát (Sorsilen) hordozóra	37
3.2.4.2. Rögzítés Szilokróm aldehidhez	37
3.2.4.3. Rögzítés p-benzokinonnal aktivált Szilokrómhoz	38
3.2.4.4. Rögzítés p-benzokinonnal aktivált Akrilexhez	38
3.2.4.5. Rögzítés Akrilex C 100 hordozóhoz, az Akrilex C 100-CPA vizsgálata	38
3.2.5. C-terminális aminosav meghatározás, HPLC analízis	39
3.2.6. Vékonyrétegkromatográfia alkalmazása aminosavak, aminosav származékok, peptidek kimutatására	39
3.2.7. A CPA stabilitása szerves oldószerben	40
3.2.8. A reakcióelegyek víztartalmának meghatározása Karl Fischer szerint	40
3.2.9. A dipeptidszintézis	41
3.2.10. Átésztereszítési reakció	42
3.2.11. N-védett aminosavak szintézise, szintéziskörülmények vizsgálata CPA-val	42
<b>4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK</b>	<b>43</b>
4.1. CPA izolálás, tisztítás	43
4.2. Rögzített CPA előállítása	43
4.3. Az Akrilex C 100 hordozón történő kötődés körülményeinek optimalizálása	44
4.3.1. A rögzítés pH függése	44
4.3.2. A rögzítés enzim mennyiség függése	45
4.3.3. A vízdékony karbodiimidek szerepe	45
4.4. Az oldott, és a rögzített (Akrilex C 100-CPA) katalitikus tulajdonságainak összehasonlítása	47
4.4.1. Az enzimaktivitás pH függése	47
4.4.2. Az enzimaktivitás hőmérséklet függése	47
4.4.3. Kinetikai vizsgálatok	48
4.5. Stabilitásvizsgálatok	49
4.5.1. Hőstabilitás	49
4.5.2. A hőinaktiválódás pH függése, a "pH stabilitás"	50
4.5.3. Tárolási stabilitás	52
4.5.4. A rögzített enzim működési stabilitásának vizsgálata	52
4.5.5. Ureával szembeni stabilitás	53
4.6. C-terminális aminosav meghatározás	54
4.7. A karboxipeptidáz A stabilitása szerves oldószerben	55
4.7.1. Szerves oldószer hatása az oldott CPA aktivitására	55
4.7.2. Különböző 90 v/v %-os szerves oldószer hatása az oldott, és a rögzített, Akrilex C 100-CPA-ra	56
4.8. Dipeptidszintézis	59
4.8.1. A dipeptidszintézis szerves oldószer függése	59
4.8.2. Különböző dipeptidek szintézise	60

4.8.3. A Phe-Phe szintézis függése a reakcióelegy víztartalmától	61
4.8.4. A Phe-Phe szintézis hőmérséklet függése	62
4.8.5. A dipeptidszintézis pH függése	62
4.8.6. A szubsztrátkoncentráció hatása a dipeptidszintézisre	63
4.8.7. Az enzimkoncentráció hatása a dipeptidszintézisre	63
4.8.8. Dipeptidszintézis optimalizált körülmények között	65
4.8.9. Dipeptidszintézis rögzített CPA-val	65
4.9. <i>Átészteresítési, észteresítési reakció CPA-val</i>	67
4.10. <i>N-acil (N-védett) aminosavak szintézise CPA-val</i>	69
4.10.1. Aminosavak N-acilezése különböző szerves savakkal	69
4.10.2. Az N-benzoil-L-Phe szintézis szerves oldószer függése	70
4.10.3. Az N-benzoil-L-Phe szintézis pH, víztartalom, és hőmérséklet függése	71
4.10.4. A szubsztrát koncentrációk (benzoészav, L-Phe) hatása a szintézisre	73
4.10.5. Az enzimkoncentráció hatása az N-benzoil-L-Phe szintézisre	74
4.10.6. N-benzoil-L-Phe szintézise CPA-val optimalizált körülmények között	75
<b>5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE</b>	76
5.1. <i>Rögzített CPA előállítása</i>	76
5.2. <i>A CPA stabilitása szerves oldószerekben</i>	79
5.3. <i>CPA-val megvalósított szintetikus reakciók</i>	
<i>szerves oldószert tartalmazó közegekben</i>	81
5.3.1. Dipeptidszintézis	82
5.3.2. Átészteresítés	85
5.3.3. N-acil aminosavak szintézise	85
<b>6. ÖSSZEFOGLALÁS</b>	88
<b>7. IRODALOMJEGYZÉK</b>	92
<b>ABSTRACT</b>	101

## RÖVIDÍTÉSEK

A dolgozatban gyakran használt rövidítések jegyzéke:

$\alpha$ -Abu-	- $\alpha$ -Amino-butánsav
Ac-	- Acetil-
ATEB	- N-acetil-L-tirozil butil észter
ATEE	- N-acetil-L-tirozil etil észter
Boc-	- terc-Butiloxi-karbonil
Bz-	- Benzoil-
Cbz-	- Karbobenzoxi-
CMC	- N-ciklohexil-N'-(2-morfolinoetil)-karbodiimid-metil-p-toluolszulfonát
CMEC	- N-ciklohexil-N'-[ $\beta$ -(N-metilmorfolino)-etil]-karbodiimid-p-toluolszulfonát
CPA	- Karboxipeptidáz A
CPB	- Karboxipeptidáz B
CPY	- Karboxipeptidáz Y
DAPEC	- N-(dimetil-amino-propil)-N'-etil-karbodiimid-hidroklorid
DEAE-	- Dietil-amino-etil-
DMSO	- Dimetil-szulfoxid
Fmoc-	- 9-Fluorenil-metiloxikarbonil
Fua-	- Futilakriloil-
Nle-	- Norleucin
Nva-	- Norvalin
Phg-	- Fenilglicin
Suc-	- Szukcinil-
TAPP	- Tyr-D-Ala-Phe-Phe
Tic	- Tetrahydro-3-izokinolin-karbonsav
TIPP	- Tyr-Tic-Phe-Phe
Tris-	- Trisz-(hidroximetil)-amino-metán
Z-	- Karbobenzoxi-
-pNA	- para-Nitro-anilin

## 1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Környezetünk, igényeink fejlődése, s ezek kapcsán a folyamatosan felmerülő környezeti problémák egyre nagyobb követelményeket támasztanak a biológiai, biotechnológiai kutatásokkal szemben. Napjainkban a „mesterséget”, egyre több területen váltja fel a kevésbé káros, és hatékonyabb „természetes”. Ez utóbbi kicsi, de kulcsfontosságú részét képezik az enzimek, melyek mint biokatalizátorok igen sokoldalúan vizsgált objektumai az elméleti, és gyakorlati kutatásoknak.

Az enzimek nagy specifitással (kemo-, enantio-, és sztereospecifitás) katalizálnak kémiai átalakulásokat, enyhe reakciókörülményeket igényelnek (pH, hőmérséklet, nyomás) és a keletkezett termékek optikailag aktívak. A biokatalízisben rejlő lehetőségek még napjainkban sincsenek kiaknázva és a gyakorlatban felhasználva.

Az elmúlt évtizedek két nagy biotechnológiai áttöréseként értékelhetjük a szilárdfázisú, és a nem hagyományos közegű biokatalízis enzimológián belüli kialakulását.

Az enzimrögzítési eljárások kidolgozásának, a rögzített enzimek tanulmányozásának fő hajtóereje, hogy a rögzített enzimformák számos előnnyel rendelkeznek az oldotthoz képest. A hordozóhoz kötött enzim stabil, könnyen eltávolítható az oldatból, s mivel katalitikus aktivitását megtartja, többször felhasználható, s akár folyamatos üzemmódban is működtethető. Így esetenként jelentős költségmegtakarítás érhető el. Többek között e tulajdonságok teszik lehetővé a rögzített enzimes rendszerek egyre szélesebb körű ipari felhasználását is.

Az enzimek a nem hagyományos közegű biokatalízis kutatások tárgyaként is igen ígéretesek, jelentős aktivitásuk, és nagy szubsztrátspecifitásuk révén. A szerves oldószeres közeg alkalmazásával a vizes közeghez képest megváltozhat a reakció kinetikája, illetve eltolódhat a termodinamikai egyensúly. Így hidrolitikus enzimek képesek szintetikus reakciókat (észteresítés, átészteresítés, peptidszintézis stb.) katalizálni. A vizes oldatban esetleg fellépő mellékreakciók, a nem hagyományos szerves közegben visszaszorulnak, s nő az apoláros szubsztrátok, és termékek oldékonysága. Alacsony forráspontú oldószerek alkalmazása pedig viszonylag egyszerű termékkinyerést tesz lehetővé. A biokatalizátor szerves közegben várható viselkedésének becslése azonban a reakció rendszer növekvő komplexitása következtében meglehetősen bonyolult.

Kutatásaink a szilárdfázisú és a nem hagyományos közegű biokatalízis területére esnek. Kísérleteinket a szerkezeti felépítésében, működésében jól ismert szarvasmarha pankréász karboxipeptidáz A-val végeztük.

Célul tűztük ki a karboxipeptidáz A rögzített enzimformák előállítását különböző hordozók felhasználásával. A legnagyobb katalitikus aktivitással rendelkező rögzített enzim katalitikus tulajdonságait és stabilitását összehasonlítottuk az oldott enzim megfelelő paramétereivel. Arra kerestük a választ, hogy a rögzítés után megváltozik-e az enzim hasítási specifitása.

Célunk volt továbbá a CPA stabilitásának, gyakorlati alkalmazhatóságának vizsgálata szerves oldószert tartalmazó közegekben. Ennek részeként tanulmányoztuk az oldott, és a rögzített enzimforma stabilitását különböző szerves oldószerek jelenlétében. Gyakorlati alkalmazhatóság szempontjából vizsgáltuk a CPA enzimformákkal megvalósítható szintetikus reakciókat, így a dipeptidszintézist, az N-védett aminosavak előállítását és az átészteresítési reakciót. Meghatároztuk azokat a reakciókörülményeket, amelyek mellett maximális konverzió érhető el.

Eredményeink alapul szolgálnak az enzimek szélesebbkörű gyakorlati alkalmazásához, és alternatív lehetőséget kínálnak a kémiai szintézisekhez.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Különleges hálával tartozom témavezetőmnek Dr. Lehoczki Endréné Dr. Simon Máriának a Biokémiai Tanszék docensének, aki munkámat irányította, s elméleti gyakorlati tanácsokkal mindvégig messzemenően támogatta.

Köszönöm Ábrahámné Dr. Gulyás Magdolnának a Biokémiai Tanszék tanszékvezető docensének, valamint dr. Nemcsók Jánosnak a Biokémiai Tanszék professzorának, hogy lehetővé tették számomra, hogy a tanszéken dolgozzak, támogatásuk hozzájárult munkám sikeres elvégzéséhez.

Hálával tartozom Varankáné László Kingának, és Brulichné Balázs Ágnesnek szakmai, és baráti támogatásukért, s a Biokémiai Tanszéken dolgozó valamennyi kollégámnak, kutatóknak, asszisztenseknek.

Köszönöm segítségét Kiss Istvánnak a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézet munkatársának.

Köszönöm szüleimnek, barátaimnak, s mindazoknak, akik valamilyen formában hozzájárultak a dolgozat elkészítéséhez.



## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A karboxipeptidáz A (CPA) általános jellemzése

A karboxipeptidáz A (EC 3.4.17.1; peptidil-aminosav-hidroláz) cinktartalmú proteolitikus enzim (Vallee és mtsai, 1956). A proteolitikus enzimek fontos szerepet töltenek be az élő szervezetekben. Feladatuk sokrétű: a viszonylag „egyszerű” fehérje emésztéstől, olyan magas szinten szabályozott folyamatokig, mint például a zimogénaktiválás, véralvadás, a fibrincomók lízise, a hormon-felszabadítás, a farmakológiailag aktív peptidek felszabadítása prekursor proteinekből, szekréción proteinek membrántranszportjában való részvétel. Ezek az enzimek az aminosav szekvencia, a háromdimenziós szerkezet, a katalizált reakció mechanizmusa, valamint az aktív centrum felépítése alapján osztályozhatók (Neurath, 1984).

Az aktív centrum felépítése alapján elvégzett osztályozás szerint a CPA enzim cinktartalmánál fogva a metalloproteázok (Rawlings és Barrett, 1993), míg a hasított peptidkötés helye szerint a karboxipeptidázok csoportjába tartozik. Az enzim aktív centrumában elhelyezkedő cinket hisztidin, és glutaminsav oldalláncok rögzítik. A CPA C-terminális aminosavakat hasít le a polipeptid láncról, amennyiben a C-terminális aminosav karboxil csoportja szabad. A hidrolízis könnyen megy végbe, amennyiben a szubsztrát karboxil láncvége L-konfigurációjú hidrofób oldalláncot tartalmaz (Hartsuck és Lipscomb, 1971).

Az 1935-ben szarvasmarha hasnyálmirigyből kristályosított CPA ( $M_r$ :32.000-34.000) mint zimogén prokarboxipeptidáz A ( $M_r$ : 96.000) szintetizálódik, és proteolitikus hasítás révén éri el aktív formáját (Keller és mtsai, 1956). Négy aktív CPA forma ismert, melyek a prokarboxipeptidáz A enzimátikus hasítása útján keletkeznek. Ezek az  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , és a  $\delta$  formák. A négy forma legfőbb eltérése az N-terminális aminosavakban nyilvánul meg.

További, a kutatási gyakorlatban széleskörben használt, a katalitikus centrumában cinket nem tartalmazó, ún szerin karboxipeptidázokat izoláltak *Aspergillus niger*ből (Dal Degan és mtsai, 1992), élesztőből, valamint különböző növényekből (Kuhn és mtsai, 1974).

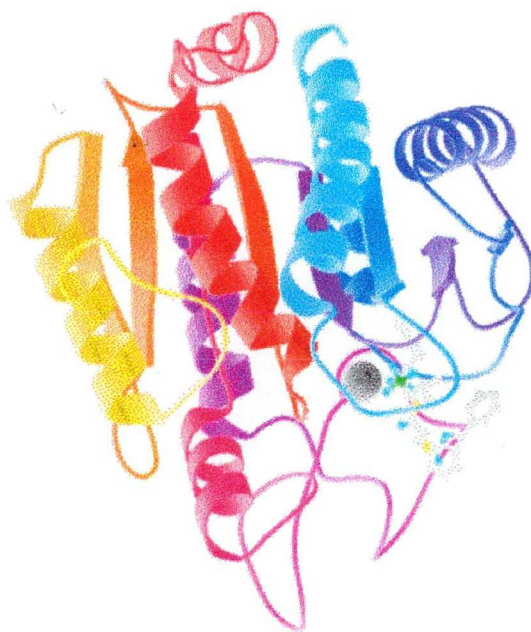
A CPA izoelektromos pontja pH 6.0, 0.2-es ionerősségnél. A CPA molekula teljes aminosav szekvenciája ismert. Egyetlen polipeptidlánc, amely 307 aminosavat, és egy Zn atomot tartalmaz. Szekvenciájában feltűnően nagy számban szerepelnek az

aromás aminosavak: 8 hisztidin, 16 fenilalanin, 19 tirozin, és 7 triptofán. A molekula szekvenciájában említésre méltó továbbá két, egymással diszulfidkötést képző cisztein oldallánc (Hartsuck és Lipscomb, 1971).

### 2.1.1. A CPA másodlagos-, és harmadlagos szerkezete

A CPA másodlagos szerkezetének, ill. kristályszerkezetének megállapítására a molekula nehézfém származékainak röntgendiffrakciós méréseit, molekuláris dinamikai vizsgálatokat, valamint matematikai modellépítő programot alkalmaztak.

A molekula ellipsoid, hozzávetőleges méretei 50x42x38 Å. 115 aminosav oldallánc a molekula 37.5 %-a, helikális konformációban, 14-14.6 %-a (45 oldallánc)  $\beta$  szerkezetbe (parallel, és antiparallel) rendezett, 47.9 %-a pedig (147 oldallánc) rendezetlen. A CPA 3 dimenziós szerkezete, az  $\alpha$  hélixek,  $\beta$  lemezek, és a „rendezetlen” szakaszok elrendeződése az 1. ábrán látható.



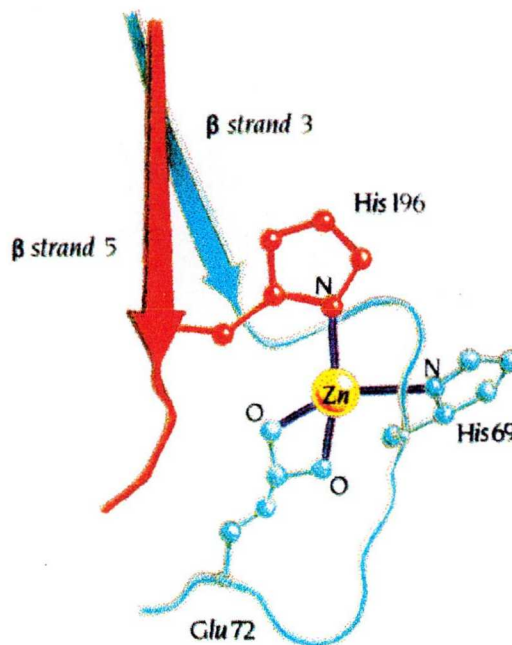
**1. ábra:** A CPA molekula 3 dimenziós szerkezeti felépítése. (Az ábrán az enzim molekula Bz-Phe-Val<sup>P</sup>(O)-Phe szubsztráttal képezett komplexe látható.)

A molekula rendezetlen régiója kevés kötést (kb. tíz hidrogénhidat, valamint egy diszulfid-kötést) tartalmaz, így az  $\alpha$ -, és  $\beta$ -konformációjú részekhez képest nagyon flexibilis. A szubsztrátmolekula enzimhez kapcsolódásakor bekövetkező konformációs

változások leginkább a molekulának ezt a szegmensét érintik (Rees és munkatársai (1983); Makinen és mtsai, 1989).

### 2.1.2. A fémek szerepe az enzim működésében

Röntgenkristallográfias adatok egyértelműen bebizonyították, hogy a CPA enzim aktív centrumában elhelyezkedő  $Zn^{2+}$  megkötésében három aminosav oldallánc, a His 69, a His 196 és a Glu 72 vesz részt, 2. ábra (Zhang és mtsai, 1992).



2. ábra: A CPA aktív centrumának felépítése

Egyenes arányosság van a  $Zn^{2+}$  tartalom valamint az enzimaktivitás változása között. Fémkomplex képző (kelátképző) vegyületek alkalmazásával az enzim aktív centrumából a  $Zn^{2+}$  eltávolítható. Az így kapott apo-CPA közel inaktív, eredeti aktivitásának mintegy 4-5 %-val rendelkezik (Makinen és mtsai, 1989). A  $Zn^{2+}$  más fémionnal való helyettesítése jelentősen befolyásolja a peptidok hidrolízisének sebesség-meghatározó lépését (a  $k_{cat}$   $Co > Zn > Mn > Cd$  sorrendben változik), de nem befolyásolja a kötődésüket, ezzel szemben hat az észterek kötődésére (a  $K_M^{-1}$   $Co > Zn > Mn > Cd$  szerint alakul), változatlan  $k_{cat}$  értékek mellett Hg, Cd, és Pb helyettesítés esetén az enzim elveszti peptidáz aktivitását, viszont továbbra is megőrzi

észteráz aktivitását. A Cu-CPA sem peptidáz, sem pedig észteráz aktivitással nem rendelkezik (Auld és Holmquist, 1974).

Bukrinsky és munkatársai (1998) anomáliás viselkedésű röntgenkristallográfiai szóródási adatok alapján beazonosítottak egy kihasználatlan kötőkapacitással rendelkező „inhibitor  $Zn^{2+}$ -oldalláncot”, amely a katalitikus  $Zn^{2+}$  közelében helyezkedik el. A két  $Zn^{2+}$ -t hidrogénhid kapcsolja össze mintegy 3.48 Å távolsággal. Az ún. inhibitor  $Zn^{2+}$  oldalláncot a Glu-270 köti.

### 2.1.3. Vízmolekulák a CPA szerkezetében

Röntgenkristallográfiai vizsgálatok bizonyítják, hogy a CPA molekula kristályában 192 vízmolekula szerepel nagy rendezettséggel, legtöbbjük a kristály felszínén helyezkedik el, azonban mintegy a 24 ún. fedett vízmolekula (korábbi adatok szerint 10) szerepel a struktúrában (Hartsuck és Lipscomb, 1971). Ezek a fedett vízmolekulák hidrogénkötéseket létesítenek aminosav oldalláncokkal, illetve egymással is. A leghosszabb, fedett vízmolekulákból álló lánc öttagú (Rees és mtsai, 1983).

### 2.1.4. Szubsztrátspecifitás, a peptidszubsztrát kötődése

A CPA enzim működését, szubsztrátkötődés jellegzetességeit sokféle technikával vizsgálták. A „hagyományos” röntgenkristallográfiai, (Rees és mtsai, 1983) spektroszkópiai kinetikai módszerek mellett igen elterjedtek a molekuláris biológiai módszerek (Galdes és mtsai, 1983, 1986; Gardell és mtsai, 1985). Ahhoz, hogy a CPA a szubsztrátot bontani tudja, több feltételnek kell teljesülnie. Így az enzim csak a szabad karboxil csoport melletti peptidkötést tudja bontani, s a hidrolízis sebessége nő, ha a C-terminális aminosav aromás, vagy elágazó alifás. A dipeptidek hidrolízise lassú, ha az aminocsoport szabad, gyorsabb, ha az  $NH_2$ - csoport blokkolt (Riordan és Holmquist, 1984). A reakciósebességet karboxil láncvég L-konfigurációja, a D-konfigurációval szemben ugyancsak jelentősen megnöveli. A bontandó peptidkötés  $-NH-$  csoportjának, metil- (szarkozin) vagy metiléncsoporttal (prolin) szubsztituált származékainál a hidrolízis jelentősen, vagy teljesen gátolt.

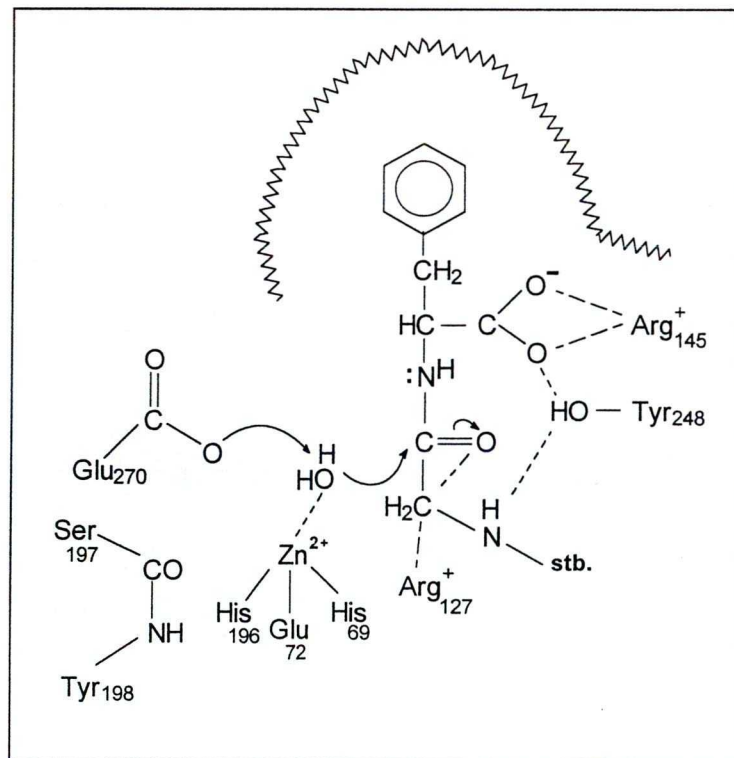
Hosszabb peptidekkel végzett kísérletek azt mutatják, hogy legalább öt aminosav oldallánc milyensége befolyásolja a  $K_M$ , és a  $k_{cat}$  érték alakulását. Ha az  $R_2$  pozícióban aromás aminosav van, az jelentős mértékben lecsökkenti a  $K_M$  értéket. Az

aromás aminosav  $R_1$ ,  $R_3$ , és  $R_4$  pozíciókban kisebb hatást gyakorol a  $K_M$ -re. Abramowitz és Schechter (1974) szerint 5 aminosav oldalláncnak felel meg az aktív centrum  $\sim 18 \text{ \AA}$  átmérője. Amennyiben a szubsztrát szerkezetében ezen 5 aminosav oldalláncot érintő változás következik be, az a katalízisben érezteti hatását.

A peptidáz aktivitás általában alkalmazott mesterséges szubsztrátjai: a benzoxiglicil-L-fenilalanin, és a hippuril-L-fenilalanin (Folk és Schirmer, 1963).

### 2.1.5. A kötésben, és a katalízisben szerepet játszó oldalláncok

A CPA enzimnél 5 szubsztrátkötő oldalláncot ( $S1'$ ,  $S1$ ,  $S2$ ,  $S3$ ,  $S4$ ) állapítottak meg (Sebastian és mtsai, 1996). A CPA aktív helye megköti a C-terminális származék oldalláncát a kötőhely apoláros részében, valamint a karboxilát csoportját két hidrogénkötéssel az Arg 145-on. (Lipscomb, 1980). A szubsztrátmolekula terminális karboxilcsoportjának rögzítéséért az Asn 144, valamint a Tyr 248-as oldallánc is felelős. A katalízisben szerepet játszó további csoportok pedig a Glu 270, az Arg 127, valamint a  $Zn^{2+}$ . A Glu 270 a katalízisben bázisként szerepel, a protont távolítja el a cinkhez kötődő vízmolekuláról (3. ábra).



3. ábra: A szubsztrát kötődése a CPA aktív centrumában (Christianson és mtsai, 1987)

A Tyr 198-as oldallánc a hidroxil csoportjával az átmeneti állapot stabilizálásában játszik fontos szerepet, illetve a Tyr 198, valamint a Phe 279 aminosavak sajátos perem-felszín elrendeződése alakítja vélhetőleg a kötőhely szubsztrátnak megfelelő változását, és lehetővé teszi a kötést a viszonylag nagyobb méretű szubsztrátok számára is (Christianson és mtsai, 1987; Sebastian és mtsai, 1996).

A molekula dinamikai vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az oldalláncok észlelt mozgási fluktuációjának a szubsztrát felismerésében van fontos szerepe az aktív helyen, így azok az oldalláncok, amelyek a szubsztrát megkötésében erősebben disztális fekvésűek, lényegesen nagyobb fluktuációs szabadsággal rendelkeznek, (Lipscomb, 1980) szerint tulajdonképpen felismerő helyként szerepelnek, és megindítják a szubsztrát kötőzsebbe való bekerülését) mint az aktív centrum belsejében elhelyezkedő, szubsztrátkötésben, ill. kötéshasításban résztvevő aminosavak. Ennek a dinamikus mozgásbeli különbségnek nagy szerepe van a szubsztráthidrolízis strukturális feltételeinek megteremtésében (Makinen és mtsai, 1989).

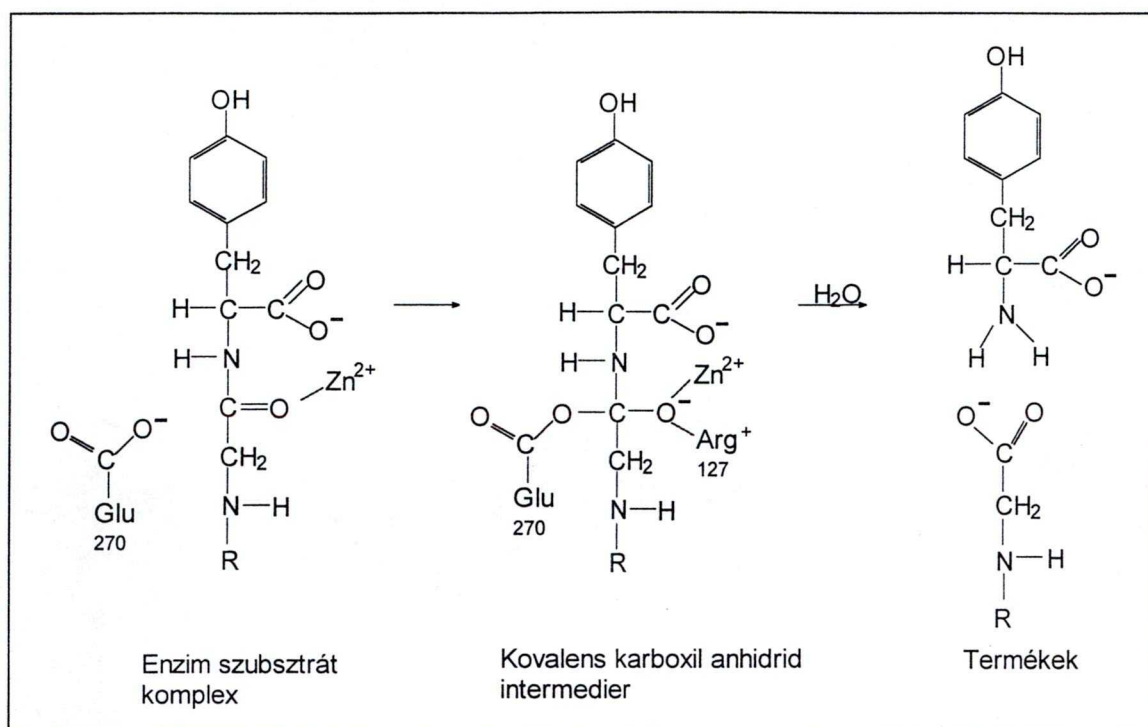
A szubsztrátok, valamint bizonyos inhibitorok bekötődése konformáció változással jár. E változás legizgalmasabb része az, ahogy az enzim eredetileg „vízzel töltött” régiója hidrofóbbá válik. Legalább négy vízmolekula szorul ki a szubsztrátkötő zsebből a szubsztrát C-terminális láncvégének bekötődésekor, egy további pedig a kialakuló szubsztrát-Zn<sup>2+</sup> kapcsolat révén válik feleslegessé. Az Arg 145-ös is semlegesítődik a szubsztrát karboxil csoportjával, végül a Tyr 248 olyan konformációs változást végez, amellyel elzárja az enzim „árkot” a külső közegtől (Hartsuck és Lipscomb, 1971).

#### **2.1.6. Katalízis elméletek**

Molekula dinamikai vizsgálatokat folytattak tetrapeptid szubsztráttal a katalízis tényleges mechanizmusának feltárásához és két elméletet állítottak fel. A víz mechanizmus vagy ún. általános bázis mechanizmus szerint egy olyan nukleofil támadás játsza a főszerepet, amikor a szubsztrát nem helyettesíti a Zn-kel koordinált vízmolekulát, s így a Zn-H<sub>2</sub>O intéz nukleofil támadást a Phe-Phe peptidkötésre (Banci és mtsai, 1994; Lee és Kim, 1998).

A másik feltételezés szerint a szubsztrát, és a Glu 270 karboxilátcsoportja úgy orientálódik, hogy a peptidkötés felbomlását megelőzően (4. ábra) egy anhidrid

intermedier keletkezik (anhidrid mechanizmus) (Banci és mtsai, 1994), illetve ez utóbbi Makinen-nél, és Lee-nél mint az észterek hidrolízisére jellemző mechanizmus szerepel (Makinen és mtsai, 1976; Lee és Kim, 1998).



4. ábra: A CPA katalízis anhidrid intermediert feltételező mechanizmusa

#### 2.1.7. A CPA észteráz aktivitása

A CPA a peptidáz aktivitása mellett észteráz aktivitással is rendelkezik. Különböző észter szubsztrátok hidrolízisének vizsgálata során megállapították, hogy a C-terminális oldallánc L-konfigurációja, valamint az enzim fémtartalma valamennyi esetben fontos volt. Általánosan megállapítható, hogy a  $k_{cat}$  érték analóg származékokra (pl. Bz-Gly-L-OPhe, és Bz-Gly-L-Phe) ötös faktorialt tér el egymástól, míg a peptidok  $K_M$  értéke 20-110-szor nagyobb, mint az észtereké (Hartsuck és Lipscomb, 1971).

Enzim-szubsztrát komplexek vizsgálatával kimutatták, hogy a peptidszubsztrátok aktív helyhez kötődése eltér a megfelelő észterek kötődésétől, így a peptidhidrolízis nemkompetitív inhibitorai az észterhidrolízisnek kompetitív inhibitorai lesznek (Auld és Holmquist, 1974). Lásd még: A fémek szerepe az enzim működésében című fejezetet.

Feltételezhető, hogy mialatt a peptidok C-terminálisának karboxil csoportja a

pozitívan töltött Arg 145-höz kötődik, addig az észterek esetében ez a kötés közvetlenül a fémionnal jön létre. Ezt az elképzelést támasztja alá az a tény is, hogy a karboxilát inhibitorok, mint pl. a fenil-acetát, vagy a  $\beta$ -fenil-propionát, amelyek a fémionhoz való kötődés útján gátolnak, kompetitív inhibitorai az észtereknek, de nem a peptideknek (Navon és mtsai, 1970).

Az észter, és a peptidszubsztrátokra vonatkozó specifikások nem teszik szükségessé két, egymástól teljesen eltérő katalitikus hely feltételezését, hanem a röntgenkristallográfiai vizsgálatok alapján különböző sebesség-meghatározó lépések megjelölése látszik elfogadhatóbbnak (Lipscomb, 1980). A natív enzimszerkezetben a  $Zn^{2+}$  közeli, a szubsztrátkötésre alkalmas régió kis mérete is kizárja két, egymástól lényegesen eltérő kötőhely létezését (Hartsuck és Lipscomb, 1971).

A CPA specifikus észter szubsztrátja az O-(trans-p-klór-cinnamoil)-L- $\beta$ -fenillaktát, valamint a hippuril-L- $\beta$ -fenillaktát (Makinen és mtsai, 1976).

### **2.1.8. Az enzim gátlása, inhibitorok**

A CPA gátlói négy csoportba oszthatók: a szubsztrát analógok (pszeudoszubsztrátok), a fémkomplex képző vegyületek, termékek, és a fémek.

A pszeudoszubsztrátok, az aktív helyhez való irreverzibilis kötődésükkel módosítják az enzimet (Neurath, 1984; Hass és Ryan, 1980).

A fémkomplex képző vegyületek közül a cisztein, a 1,10-fenantrolin, a Zn eltávolítása révén gátolja mind a peptidáz, mind pedig az észteráz aktivitást. A legérdekesebb, s általánosan használt inhibitor a  $\beta$ -fenilpropionát, mely a pH függvényében gátol (Hartsuck és Lipscomb, 1971).

A enzim működését a heterociklikus imidazol is gátolja. Mock és Wang (1999) megállapították, hogy a  $Zn^{2+}$  ionokat tartalmazó oldat ezt a gátló hatást egy hármas komplex kialakulása következtében jelentősen megemeli. A rendszer érdekessége, hogy az oldat  $Zn^{2+}$  ionjai az imidazzal külön is képeznek komplexet, amely viszont a gátláscsökkenés irányába hat. Ez az imidazolkoncentráció függvényében a katalitikus sebesség anomáliás viselkedését okozza.

A hidrolízis termékek közül kompetitív inhibitorai az enzimnek az észter szubsztrátok C-terminálisáról lehasított  $\alpha$ -hidroxi savak. Például az L- $\beta$ -fenillaktát, és az L-mandelát.



A fémionok hatását a 2.1.2. fejezetben mutattuk be.

A átmeneti állapot analógok is szerepelhetnek inhibitorokként. Ilyen típusú molekulák a foszfonát származékok. Ezek a molekulák képesek arra, hogy mind elektronrendszer, mind pedig a geometriai elrendeződés tekintetében a katalízis átmeneti termékét tükrözzék (Phillips és mtsai, 1992). A szulfonát származékok a peptidhidrolízis aktivátorai, ugyanakkor gátolják az észteráz aktivitást (Frye és Sebastian, 1990; Sebastian és mtsai, 1987).

## **2.2. Rögzített enzimek, enzimrögzítési módszerek**

A rögzített enzimek fizikai kölcsönhatással, vagy kémiai kötéssel hordozóhoz kapcsolt, ill. a hordozó által körülzárt enzimek, melyek megőrzik katalitikus aktivitásukat (Chibata, 1978).

A rögzített enzimek sok előnnyel rendelkeznek az oldott enzimformával szemben. Ezek az alábbiakban foglalhatók össze:

- a katalitikus aktivitás megtartása mellett jelentős mértékben megnő az enzim stabilitása
- a hordozóhoz kapcsolt enzim könnyen eltávolítható az oldatból, anélkül hogy a reakcióelegy enzimet tartalmazna,
- a rögzített enzimek hosszú ideig tárolhatóak, nagy a tárolási stabilitásuk,
- többször felhasználhatóak,
- a viszonylag egyszerű előállítás melletti többszöri felhasználással jelentős mértékű költségmegtakarítás érhető el.

(Weetall, 1970; Hofstee és Otilio, 1973; Carr és Bowers, 1980)

Az enzimrögzítési vizsgálatoknál, a hordozó megfelelő kiválasztása során figyelembe kell venni a mátrix kémiai tulajdonságait, és mechanikai viselkedését, a létrehozott rendszer stabilitását, a létrehozott rendszer gyakorlati, és potenciális használhatóságát, valamint a rögzítési eljárás gazdaságosságát (Dua és mtsai, 1985).

A rögzített enzimek felhasználhatóak különböző típusú reaktor rendszerekben, melyek megtervezése, működési körülményeinek optimalizálása, mindig újabb, és újabb feladatokat jelent az elméleti, és a gyakorlati kutatások területén is. A rögzített enzimek fő gyakorlati alkalmazási területei az ipar, a gyógyászat, és a laboratóriumi analitika (Simon és mtsai, 1992, 1994; Kotormán és mtsai, 1986, 1994; Vértesi és mtsai,

1995/1996).

Az enzimrögzítésre kidolgozott, általánosan használt eljárások:

- Az enzim vízoldhatatlan hordozóhoz kapcsolása fizikai adszorpció, ionos vagy kovalens kötés révén,
- intermolekuláris keresztkötések létrehozása az enzimmolekulák között bi-, vagy polifunkciós reagensekkel,
- az enzim szemipermeábilis gélrácsba, vagy üreges szálba zárása, szemipermeábilis membránnal való körülvétele.

### 2.2.1. Adszorpció

A fizikai adszorpció a legkorábban alkalmazott módszer az enzimek rögzítésére. Előnye, hogy egyszerű, nem igényel erőteljes kémiai behatásokat. Az adszorpció látszólagos egyszerűsége ellenére komplex folyamat. Független a hordozó-felület kémiai természetétől, továbbá a kötési körülmények: a pH, a hőmérséklet, az ionerősség, az enzimkoncentráció, valamint az adszorbens koncentrációja is befolyásolja. A megfelelő adszorbens kiválasztásánál több tényezőt kell figyelembe venni, így az alkalmazandó adszorbensnek az enzimhez megfelelően magas affinitással kell rendelkeznie, viszont nem kötheti a szubsztrátot, és a reakció termékét. Fontos elvárás ezenkívül, hogy az enzimnek viszonylag magas aktivitást kell megőriznie kötött állapotában (Carr és Bowers, 1980).

Adszorbensek lehetnek pl. aktív szén, porózus üveg, kerámia, kaolinit,  $Al_2O_3$ , szilika-gélek, keményítő, cellulóz. Hátránya a módszernek, hogy a pH, a hőmérséklet, és az ionerősség változtatása az enzim gyors leoldódását eredményezheti.

E „szabály” alól képez kivételt Cashion rendszere. Cashion és munkatársai (1982) nem-kovalens hidrofób jellegű kötésekkel rögzítették az enzimeket tritilált agaróz, valamint Sepharóz hordozókhoz. A módszer jelentősége, hogy viszonylag „enyhe”, egyszerű behatásokkal 100 %-os kötési kitermelés érhető el, a kötött enzimek stabilitása, a kötések erőssége pedig a kovalens rögzítésekéhez mérhető. Ez a rendszer jó modellje az *in vivo* hidrofób kölcsönhatásokkal membránkötött enzimeknek, ugyanis homológiák állapíthatók meg a tritilagaróz, valamint a membránkötött foszfátázok viselkedése között. A szerzők, a gyakorlatban szélesebb körben elterjedt proteázokon kívül nukleinsav módosításokban szerepet játszó enzimeket is rögzítettek.

### 2.2.2. Ionos kötés

Legtöbbször az enzim, és a hordozó között kialakult ionos kötés általában nem "tisztán" jelenik meg, hanem az adszorpció is szerepet játszik. Elsőként Mitz (1956) alkalmazta ezt a módszert rögzített enzim előállítására. Az ionos kötés kialakítása egyszerű, nem igényel erélyes behatásokat, így általában nagy aktivitással köthetők az enzimek (Chibata, 1978). Hátrányt jelent azonban, hogy a pH és az ionerősség megváltoztatása az enzim leoldódását eredményezi, mivel az ionos kötés viszonylag gyenge. Hordozóként poliszacharid származékok (DEAE-cellulóz, CM-cellulóz, DEAE-Sephadex stb.), és ioncserélő csoportokkal rendelkező szintetikus polimerek (Amberlite származékok, Dowex gyanták) alkalmazhatóak.

### 2.2.3. Rögzítés keresztkötések létrehozásával

Bi- vagy multifunkciós reagensekkel (diazó-benzidin és származékai, N,N'-hexametilén-bisz-jódacetamid, hexametilén izocianát stb.) keresztkötések alakíthatók ki az enzim molekulák között. Leggyakrabban glutáraldehidet alkalmaznak. A módszer hátránya, hogy gyakran nehezen kezelhető puha, zselatinszerű polimer keletkezik (Brown, 1976; Zaborsky, 1974). Ez a hátrány kiküszöbölhető hordozón adszorbeálódott enzimek keresztkötésével. Az enzimaktivitás veszteség inert fehérje (pl. szérum albumin) hozzáadásával csökkenthető (Brown és mtsai, 1973).

Ez utóbbira példa a Rybak és Coupek (1980) által Separon E hordozón kivitelezett rögzítés. A hordozó hexametilén diaminnal, valamint glutáraldehiddel aktivált formájához rögzítettek tripszin,  $\alpha$ -kimo tripszin, alkohol-dehidrogenáz, karboxipeptidáz N, és B-t valamint a trombin, és plazmin enzimeket. Az ily módon létrehozott rögzített enzimek kiváló tárolási stabilitással rendelkeztek (3 hónap után is csak átlagosan 20 %-os enzimaktivitás csökkenés volt tapasztalható). E rendszer fontos szerepet tölthet be a gyógyászati gyakorlatban, hiszen valamennyi felhasznált enzim fontos élettani funkcióval rendelkezik.

### 2.2.4. Gélbe polimerizálás

Az enzimet a polimerizáció megindulása előtt a monomer oldatába keverve, a képződő polimer magába zárja az enzimet. A gél pórusai a kis méretű szubsztrátok, és

termékek diffúzióját lehetővé teszik, de az enzimet visszatartják. A módszer előnye, hogy egyszerű és különböző gélfarmák kialakítására is lehetőség van, viszont a polimerizációkor képződött szabad gyökök, és a reakcióhő inaktívalhatják az enzimet (Wheatley és Phillips, 1983). Másrészt ez a módszer csak olyan enzimek rögzítésére alkalmazható, amelyek kis méretű szubsztrátokra hatnak. Problémát jelenthet egy viszonylag homogén pórusméret előállítása is. Rögzítésre leggyakrabban poliakrilamidot alkalmaznak (Hicks és Updike, 1966; Bauman és mtsai, 1965, 1967). A poliakrilamid képződését akrilamidból valamint N,N'-metilén-bis-akrilamidból Chrambach és Rodbard (1971) foglalták össze. Markvicheva és munkatársai (1994) poli-N-vinil-kaprolaktám gélbe zártak sikeresen tripszin, és karboxipeptidáz B enzimeket. A rögzítés után mindkét enzim rendelkezett eredeti aktivitásának 80-90 %-val, és aktivitásukat széles pH, és hőmérsékleti tartományban jól megőrizték. Az enzimeket tartalmazó granulátumokat sikeresen alkalmazták rekombináns proinzulinból humán inzulin előállítására.

### **2.2.5. Bezárás szemipermeábilis membránnal**

Az enzimek szemipermeábilis kapszulába zárására cellulóz-nitrátot, polisztirol és poliamin származékokat használnak. Előnyt jelent, hogy így módon magas enzimkoncentráció érhető el, és az így rögzített enzimek felhasználhatóak pl. aminosavak nagy mennyiségben való előállítására, kofaktor ciklizálására (Yu és Chang, 1982), enzimhiányos betegségek gyógyítására (Chang és Poznansky, 1968; Chang, 1976; Hallé és mtsai, 1993).

### **2.2.6. Bezárás szálak üregeibe**

Rony (1971) használt először szemipermeábilis szálakat enzimek rögzítésére. A cellulóz triacetát szálakba számos enzimet zárt be. A szálakat úgy készítették el, hogy a glicerint is tartalmazó vizes enzimoldatot metilén kloridban oldott cellulóz triacetátba csepegtették. Keveréssel emulziót készítettek, melyet toluolt tartalmazó koagulátó fürdőbe engedtek bele. A szálak nagy felületűek, folyamatos működést tettek lehetővé. A módszer előnye, hogy az enzimet nem kell semmivel reagáltatni a rögzítéshez és nagy molekulatömegű szubsztrátoknál is alkalmazható, ha a termék molekulatömege kicsi (Zaborsky, 1974).

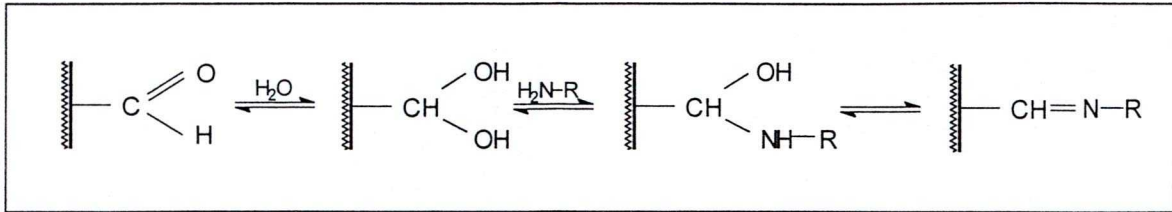
### 2.2.7. Rögzítés kovalens kötéssel

Az enzimrögzítésre alkalmazott leggyakoribb módszer az enzimek kovalens kötéssel való rögzítése. Elsőként immunológusok használták, azóta számos új kovalens rögzítési eljárást dolgoztak ki (Landsteiner és van der Scheer, 1936). A módszer előnye, hogy a hordozó és az enzim között erős kémiai kötés jön létre, így a környezeti feltételek (hőmérséklet, ionerősség, pH) megváltoztatására sem következik be leoldódás. Hátránya, hogy viszonylag bonyolult, s általában a rögzítés során az enzim jelentős része inaktiválódik, mivel a kötésben az aktív centrum aminosav oldalláncai is részt vehetnek. A kémiai módosítás eredményeként számolni kell az enzim térszerkezetének, a szubsztrát hozzáférhetőségének megváltozásával is. A kovalensen kötött enzimek katalitikus és stabilitási tulajdonságai lényegesen eltérhetnek az oldott enzimétől. Célszerű olyan hordozókat (dextránt, szintetikus polimereket, fénoxidokat) választani, melyek az aktivitás szempontjából fontos aminosav oldalláncokkal nem reagálnak. Ha az aktív centrumban lévő csoportokat kémiaileg reverzibilisen módosítjuk, ill. szubsztrát, vagy koenzim van jelen, csökkenthető az aktivitásvesztés (Wheeler és mtsai, 1969; Mansson és mtsai, 1983).

A kovalens kötésre leggyakrabban használt reakciók: az acilálás, az arilezés és alkilálás, a brómcianos reakció, a karbamoilálás és tiokarbamoilálás, a glutáraldehides kapcsolás, különböző diazotálási reakciók, tiol-diszulfid átalakulással együttjártó reakciók, a polimer aldehidekkel való reakciója, valamint a kondenzációs reakciók. A sokféle rögzítési eljárás közül csak azokat ismertetjük részletesen, amelyeket a CPA rögzítésére felhasználtunk.

#### 2.2.7.1. Rögzítés aldehid funkciós csoportot tartalmazó hordozóhoz

Aldehid funkciós csoportot tartalmazó hordozók kialakítására számos próbálkozás történt. Epton és munkatársai (1976) poliakril-amino-acetaldehidet állítottak elő. Brown és Racois (1974) allil alkohol, és vanillin kopolimerizációjával, mások (Flemming és mtsai, 1973; Weakley és Mehlretter, 1973) poliszacharidok dimetil szulfoxidos, ill. perjodátos oxidációjával próbálkoztak. Az 5. ábrán látható, hogy az aldehidek a fehérjék aminocsoportjaival aminol, vagy Schiff-bázis (azometin, aldimin) képzéssel reagálnak (Goldstein és Manecke, 1976).

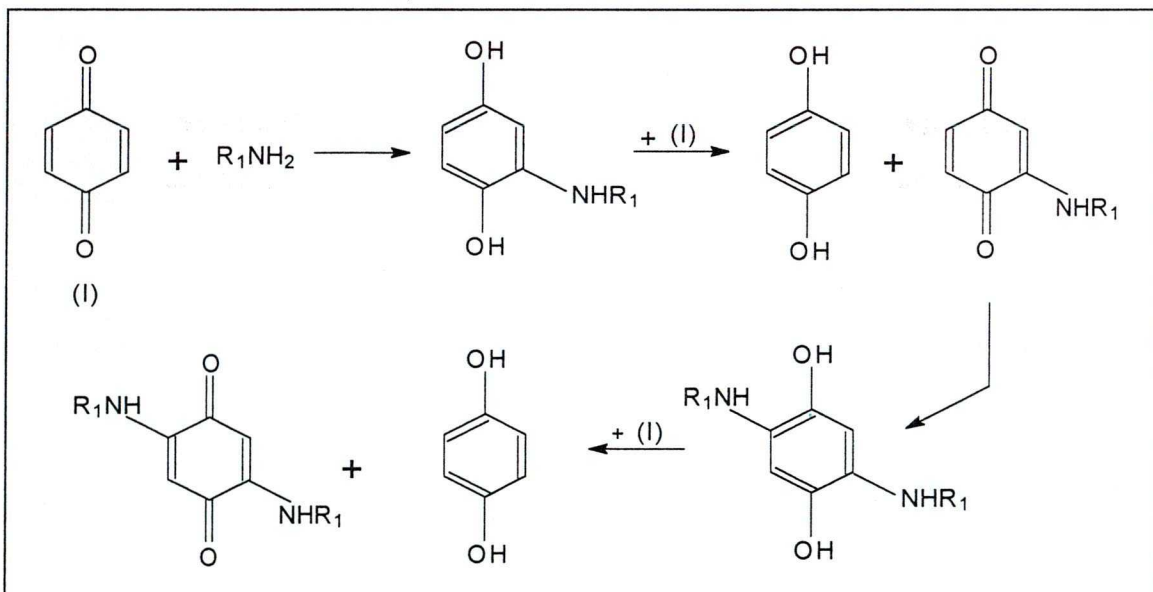


**5. ábra:** Az enzim kötődése az aldehid funkciós csoportot tartalmazó hordozón

Az enzim molekulák szulfhidril, és imidazolcsoportjai is reakcióba léphetnek, ami enzimaktivitás csökkenéssel járhat. A módszer hátránya, hogy bizonytalan a képződött kötések stabilitása. A kötés utólagos redukcióval stabilizálható, de közben csökkenhet az enzim aktivitása (Royer és mtsai, 1975).

### 2.2.7.2. Kötés poliakrilamid gélekhez p-benzokinonos aktiválással

Az amid-csoport aktiválására számos eljárást dolgoztak ki (Weston és Avrameas, 1971; Inman, 1974). Brandt és munkatársai (1975), valamint Stambolieva és Turkova (1980) Sepharóz 4B és hidroxialkil-metakrilát géleket aktiváltak p-benzokinonnal. Poliakrilamid típusú gélek is aktiválhatók p-benzokinonnal (Kálmán és mtsai, 1983). A p-benzokinon aminokkal végbemenő reakcióját mutatja a 6. ábra.



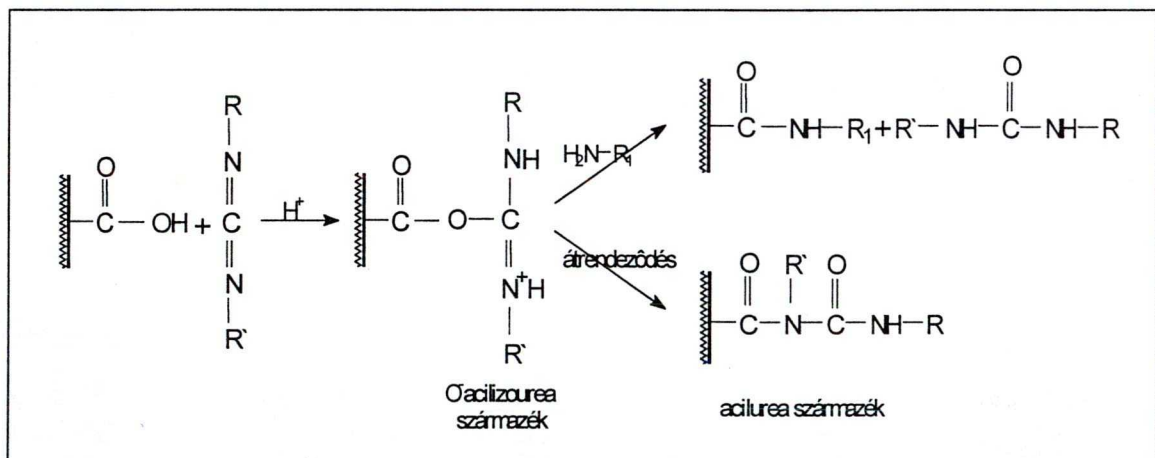
**6. ábra:** A p-benzokinon reakciója aminokkal

A reakció hidrokinon köztes termék keletkezésével járó 1,4 addíció, amelyhez oxidációs lépés kapcsolódik (Krishna és mtsai, 1985).

### 2.2.7.3. Rögzítés karboxil-csoportot tartalmazó hordozóhoz

Mattiasson, és Mosbach (1971) használtak először karboxil-csoportot tartalmazó gélek aktiválására vízdékony karbodiimideket. Az aktiválás folyamatát mutatja a 7. ábra. Savas pH-n (pH 4.75-5.0) először O-acil-izourea átmeneti termék keletkezik, mely rendkívül reaktív, és az aktivált karboxil-csoport aminos, vagy más nukleofil csoportokkal (-OH, -SH) is reakcióba léphet, vagy belső molekuláris átrendeződéssel acil-urea származékká alakul.

A karboxil-csoportok aktiválására leggyakrabban az 1-ciklohexil-3/2/4-N-metilmorfolinoetil-karbodiimid tozilátot, és az 1-etil-3/3-dimetilaminopropil-karbodiimidet használják (Wiseman, 1975).



7. ábra: Karboxil funkciós csoportot tartalmazó gélek aktiválása vízdékony karbodiimiddel, és az enzim rögzítése

### 2.2.8. Rögzített karboxipeptidázok és felhasználásuk a gyakorlatban

Pronázt, proteináz K-t, karboxipeptidáz A-t, és B-t, aminopeptidáz M-t, intestinális mucosa exopeptidázokat, valamint prolidázt rögzítettek meghatározott pórusméretű üvegyöngyre, s az így létrehozott rendszerrel fehérjék teljes enzimatis hidrolízisét vizsgálták Church és munkatársai (1984). A fehérjemolekulák savas hidrolízisekor a triptofántartalom teljesen elveszik, jelentős csökkenés következik be a szerin a treonin tartalomban is, elhasadnak továbbá az amidok a glutamin, és az

aszparagin. A fehérjék bázikus hidrolízise gyakran alkalmazott, a triptofán tartalom mérésére, azonban még erőteljesebben veszi igénybe a fehérjemolekulát. A fehérjék enzimatis emésztése megoldani látszik a savas, ill. bázikus hidrolízis esetén fellépő problémákat. A szerzőknek a megfelelő, összeegyeztethető pH, és hőmérsékleti optimummal rendelkező enzimek kiválasztásával sikerült kiküszöbölnie a pH, és hőmérsékleti kezelésekorábban gondot jelentő problémáját is. (Chin és Wold, 1974; Royer és mtsai, 1977). A rögzített enzim, valamint a savas hidrolízis kombinált alkalmazásával sokkal pontosabb kémiai kép kapható a fehérjék minőségéről, mint a savas hidrolízis egyedüli alkalmazásával. Két natív protein szubsztráton ( $\beta$ -laktoglobulin, és inzulin) elvégzett vizsgálatok alapján egyértelműen bizonyítható a rögzített enzim hidrolízis savas felülmúló hatékonysága.

A rögzített fehérjebontó enzimekkel megvalósított emésztés, majd a hasítási termékek ezt követő HPLC, tömegspektrometriás stb. analízise jól alkalmazható, felhasználásával aminosav összetétel megállapítás, fehérje szekvenálás oldható meg (Stachowiak és mtsai, 1988; Voyksner és mtsai, 1990).

Dua és munkatársai (1985) cellulóz alapú hordozóhoz kötött CPA-val, illetve az ezt kiegészítő, a bontás kimutatására szolgáló papírkromatográfiával tetrapeptid aminosav analízisét valósították meg sikerrel.

Brómciánnal aktivált agarózhoz rögzített, citrustermes maghéjából izolált karboxipeptidáz C széles szubsztrátspecifitásánál fogva a különböző jellegű fehérjék (angiotenzin, bradikinin, insulin  $\beta$  lánc, bovine serum albumin) C terminális aminosavának lehasítását végezte el (Funakoshi és mtsai, 1983).

Az exopeptidázok gyakorlati felhasználásának igen gyakran jelenti akadályát az enzimek tisztításának magas költsége. Ezt a problémát látszik sikeresen áthidalni a Ge és Zhang (1996) által kifejlesztett rendszer. Ők sertés hasnyálmirigy exopeptidázokat tartalmazó, egyszerű ammónium-szulfátos tisztítással létrehozott keveréket rögzítettek glutáraldehiddel vékony kitin hordozón. Ez a rögzített enzim rendszer aminosavakat hasított a peptidmolekulákról. A felszabadult aminosav tartalom alapján egyértelműen beazonosították, hogy az exopeptidáz elegy karboxipeptidáz A, B, és aminopeptidáz enzimeket tartalmazott. A rendszer érdekessége, hogy az eddigiekben felvázoltaknak mintegy „megfordításaként” működik, vagyis az aminosav analízis után következtek az alkalmazott enzimekre.



### 2.2.9. Rögzített CPA előállítás

A CPA különböző hordozókhoz való rögzítése, a rögzítés körülményeinek vizsgálata, a rögzített CPA katalitikus jellemzőinek meghatározására több próbálkozás történt az irodalomban. Epoxicsoportokat tartalmazó 2-hidroxiethyl-metakrilát, és etiléndimetakrilát (Separon HEMA) kopolimeren rögzítették a CPA-t kovalens kötéssel Smalla és munkatársai (1988), s vizsgálták a különböző sók (mennyiségi, és minőségi) hatását a kovalens kötés létrejöttére. A különböző alkalmazott sókoncentrációk elősegítik a fehérje-mátrix hidrofób kölcsönhatások létrejöttét, amelyek előfeltételei a kovalens kötés kialakulásának.

CPA-t rögzítettek Enzakril AH hordozón Ksycinska és Grezgorzewska (1980), s vizsgálták a rendszer stabilitását. A rögzített CPA borát pufferben (50 mM, pH 9) 40°C-on 48 órás inkubálás után nem veszített kiindulási hidrolitikus aktivitásából. Szubsztrátként klóracetil-L-triptofánt alkalmaztak.

Oxidált neutrális szénhidrátok alkilált származékaihoz kötöttek CPA-t Royer és munkatársai (1975). Az alkalmazott kötés az enzim molekula  $\epsilon$ -aminocsoportjai, és a hordozó alkilcsoportjai között kialakuló Schiff-bázis kötés.

Ugyanez a laboratórium fejlesztette ki a perjodátos aktiválás módszerét. A BrCN-os aktiválással szemben a perjodát alkalmazása kíméletesebb, enyhébb megoldást jelent. Dextránnal bevont porózus üveg, Sepharóz, és gliceril szilánnal bevont porózus üveg hordozókat aktiváltak  $\text{NaIO}_4$ -tal, majd  $\text{NaBH}_4$ -es kezeléssel CPA-t, CPB-t, és tripszint rögzítettek a fenti hordozókhoz. Valamennyi esetben stabil rendszert hoztak létre, amelyekben az enzim működés pH optimuma nem tért el az oldott enzimétől, és a rögzített enzimeknél gyakran komoly problémát jelentő diffúziós korlát fellépését is elkerülték.

Dua és munkatársai (1985) a CPA-t sztiren-maleinsavanhidrid (SMA) kopolimer hordozóhoz rögzítették. Az enzim a rögzítés során aktivitásának mintegy 30-40 %-át elveszítette, viszont a rögzített enzimforma az oldotténál nagyobb hőmérsékleti, és kémiai stabilitással rendelkezett. 60°C-on az oldott forma 30 perc alatt inaktiválódott, míg a rögzített 3 óra múlva is megtartotta kiindulási aktivitásának 40 %-át. További fontos előnye, az SMA-CPA rögzített enzimnek, hogy többször felhasználható, 50-szer ismételt mérés után még mindig csak felére csökkent az eredeti aktivitása.

A fenti szerzők rögzítettek kecske hasnyálmirigy karboxipeptidáz A-t oxidált cellulóz, majd oxidált cellulóz savas kloridszármazékának felhasználásával (Dua és

mtsai, 1984; Kumar és mtsai, 1986). Az enzimműködés optimális pH-ja mindkét enzimformánál pH 7.5, az aktivitás hőmérsékleti optimuma pedig 50°C volt. Az 50°C-on végzett hőinaktiválódási kísérletek pedig azt mutatják, hogy az oldott enzim 20 perces fél-életideje 2 óra 48 percre növekedett, a rögzítés tehát jelentősen stabilizálta az enzimet. Oldott CPA-nál 4°C-on 6 hónap alatt mintegy 8 %-os autolízis miatt bekövetkező aktivitás veszteséggel lehet számolni. Az enzim autolízisét a rögzítés jelentős mértékben csökkentette.

Solomon és munkatársai (1984) a karboxipeptidáz A-t monoklonális antitestek közvetítésével kötötték EUPERGIT C-hez. Ebben a rendszerben a CPA gyakorlatilag aktivitásvesztés nélkül rögzül, s megkötődött aktivitása 4°C-on való tárolás során egy hónap elteltével sem változott.

Solomon és Goldstein (1996) perjodáttal oxidált polivinil-alkohol (PVA) származékokhoz rögzítették a CPA-t. Az oxidált PVA láncok eltérő mennyiségű acetyl-, és szabad hidroxilcsoportot tartalmaztak. A kötés e csoportokon keresztül valósult meg. A natív enzimet, valamint rögzített enzimet arzanilsavval (p-amino-fenil arzonsav) kezelték, és vizsgálták a keletkezett arzanil-azo-CPA-PVA katalitikus aktivitásának változását. Az észteráz-aktivitást nem, viszont a peptidáz aktivitást a Tyr 248-as oldallánc módosulása következtében jelentősen befolyásolták (csökkentették) ezek a kémiai módosító lépések. Feltehetőleg már a PVA-kal való kapcsolódás megváltoztatta a Tyr oldallánc konformációs állapotát, és rotációs szabadságát.

#### **2.2.10. A CPA stabilizálásának új formái**

Az enzim hőstabilizálásának egy sajátos, és előremutató formáját képviseli a monoklonális antitestekkel történő reagáltatás, immár hordozó nélkül. Olyan komplexpárokat hoztak létre, amelyekben a natív enzimhez képest megemelkedett 90 %-kal a peptidáz-aktivitás, 60 %-kal pedig az észteráz-aktivitás hőstabilitása. A megfelelő immuno-komplexek képződése stabilizálta az aktív enzimkonformációt a hődenaturációval szemben, anélkül, hogy ezáltal csökkentette volna az enzim katalitikus aktivitását. Ez a tanulmány ugyanakkor jó bizonyíték, a peptid-, és az észterhidrolízis mechanizmusának különbözőségére (Solomon és Balas, 1991).

A monoklonális antitestekkel képezett komplexpárokkal is stabilizálták a CPA-t Solomon és munkatársai (1998). A monoklonális antitestek egy meghatározott helyen kötődnek az antigént jelentő CPA-hoz. Ez a kötődés jelentős konformációs stabilitást

kölcsönöz az enzimnek, megvédi a letekeredéstől, az aggregációtól, valamint bizonyítottan chaperon hatása révén elősegíti a molekula aktív térszerkezetének helyreállítását, illetve fenntartását denaturáló körülmények (magas hőmérséklet, magas koncentrációjú  $Zn^{2+}$ -oldat) között.

### **2.3. Biokatalitikus reakciók kevés vizet tartalmazó, nem hagyományos közegekben**

A vizes oldat fiziológiás környezetként értelmezhető a legtöbb biokatalitikus reakció számára. Sok enzim képes működni azonban az ún. nem hagyományos közegek számtalan variációjában. Nem hagyományos közegű reakcióknak tekinthetők azok a biokatalitikus reakciók, ahol a közeg szuperkritikus folyadék gázfázisú, vagy magas részarányban tartalmaz szerves oldószereket (Dordick, 1988; Halling, 1994).

A nem vizes közegű biokatalízis egyre nagyobb jelentőségre tesz szert mind a tudományos, mind pedig az ipari kutatási gyakorlatban. A biokatalizátorok egyre szélesebb skáláját, enzimeket, multienzim rendszereket, valamint egész sejteket alkalmaznak kis víztartalmú, vagy vizet nem tartalmazó, nem hagyományos közegekben. Egyre nagyobb mértékben terjeszthető ki a lehetséges szintézisek köre, az egyszerű királis molekuláktól, a nagyobb, komplexebb molekulákig, oligoszacharidok, polipeptidek, nukleotidok, stb. előállításáig (Wong, 1990). Ezeknél a szintéziseknél leggyakrabban alkalmazott rendszerek meghatározott százalékban szerves oldószert (vízzel elegyedő, vagy vízzel nem elegyedő) tartalmaznak. Sajátos, egyre növekvő jelentőségű csoportot képviselnek ezen belül a minimális mennyiségű vizet tartalmazó, közel „víz nélküli” közegek (Zaks és Klibanov, 1985, 1988; Halling, 1994). Egyes esetekben a reakcióközeg csak ún. mikro víztartalommal rendelkezik, amelyről kristályvizes só hozzáadásával, vagy nedves levegőárammal gondoskodnak. Ilyen rendszer alkalmazásával találkozhatunk a Kuhl és munkatársai (1995) által kidolgozott peptidszintézis esetében, s bár a folyamatot oldószer jelenlét nélkül végezték, az eljárás újszerűsége feltétlen figyelmet érdemel (ld.: Enzimatiszus peptidszintézisek c. fejezet).

A nem hagyományos, szerves oldószeres közeg alkalmazásának számos előnyét a következőkben foglaljuk össze. Az apoláros szubsztrátok, és termékek megnövekedett oldékonysága magasabb oldott koncentrációt tesz lehetővé a reakcióelegyben. A szerves oldószeres közegben megváltozik a szolvatáció, s ennek következtében megváltozhat a reakció kinetikája, illetve eltolódhat a termodinamikai egyensúly, így sok esetben hidrolitikus enzimek szintézisre lesznek képesek, s vagy „transz” jellegű reakciók, vagy

teljes mértékben fordított reakciók játszódhatnak le. A víztartalom minimálisra szorításával esetenként az egyensúly szinte teljes mértékben eltolódhat a szintézis irányába.

A nem poláros jellegű szubsztrátok, illetve termékek enzimre gyakorolt gátló hatása jelentős mértékben redukálódik, a számukra kedvező solvatációs feltételek mellett. A közeg természetétől függően megváltoznak a biokatalizátor tulajdonságai is. Így a proteázok esetében például megváltozhat a szubsztrátspecifitás, illetve az enzim enantioszelektivitása. Az oldószer enantioszelektivitást befolyásoló hatása olyan D-aminosav származékok átalakítását teszi lehetővé, amely vizes közegben nem lehetséges. Az enzimek a közegben nem oldódnak, s ezzel kiküszöbölhető a reaktor fizikai vesztesége. A vizes oldatban esetleg fellépő mellékreakciók, a nem hagyományos közegben visszaszorulnak, s a biokatalitikus lépés sokkal könnyebben integrálódik abba a szintézis sorozatba, amely olyan kémiai állapotsorokon vezet keresztül, amelyekben a szerves oldószer jelenléte fontos. Az alacsony forráspontú oldószerek a termék kinyerést jelentősen megkönnyítik, és alkalmazásukkal a mikrobiális szennyeződés jelentős mértékben visszaszorul (Brink és mtsai, 1988; Fitzpatrick és Klivanov, 1991; Kawashiro és mtsai, 1997).

A számtalan előnyös tulajdonság mellett ezeknek a rendszereknek is vannak hátrányai. Ezek között kell említünk a biokatalizátor lehetséges denaturációját, a szerves oldószer inaktiváló hatását, a reakció rendszer növekvő komplexitását, az oldószer toxicitását, illetve az oldószer költségeket. (Brink és mtsai, 1988).

### **2.3.1. A szerves oldószerek fehérjeszerkezetre gyakorolt hatása**

Az enzimek aktív konformációjának fenntartásáért a molekulák körüli solvatációs burok, ill. a molekulán belüli hidrofób kölcsönhatások felelősek (Tanford, 1978). A fehérjemolekulák vizes oldatban a hidrátburokkal vannak körülvéve. A hidrátburok vízmolekulái a fehérje felületéhez kötődnek, főként hidrogénhidakkal és nélkülözhetetlenek a natív konformáció fenntartásában. A szerves oldószer molekulái arra törekcsenek, hogy a hidratációs vízmolekulákat elmozdítsák, s ezáltal az enzim, és a hidrátburok között kialakult rendkívül finoman kiépített kölcsönhatásrendszert szétrombolják. Az általánosan elfogadott nézet szerint a fehérjemolekula szerves oldószerekben bekövetkező denaturációjának oka a hidrátburok sérülése.

A vízzel elegyedő szerves oldószerek képesek arra, hogy a molekula

hidrátburkát egy szerves molekulából felépülő solvatációs burokra cserélik a hidrofób kölcsönhatások megbontása nélkül. Ezeknél az oldószereknél esetenként aktiváló hatással is számolni lehet, amely egyrészt az enzimmolekula belsejében lejátszódó kedvező konformációs változásoknak, másrészt a hidrolitikus enzimek esetében annak is köszönhető, hogy a szerves oldószer, mint hozzáadott nukleofil komponens közvetlenül is részt vesz a katalizált reakcióban.

A vízzel elegyedő szerves oldószer, mint reakcióközeg különösen jól alkalmazható észter-, aminosav-, karbonsav-szintéziseknél, valamint peptidkötések létrehozására.

A szerves oldószeres biokatalízis hatékony megvalósításához célszerű az oldószer okozta hatásokat valamilyen módszerrel kivédeni. Ez elvileg több úton lehetséges. Így például a megfelelő oldószer kiválasztásával elérhető, hogy az oldószer molekulák az aktív konformáció fenntartásához szükséges kölcsönhatásokat nem bontják meg jelentős mértékben. Az enzim rögzítése, stabilitásának, aktivitásának növelése ugyancsak jó módszernek bizonyult. E folyamat során a natív enzimkonformáció mesterségesen fixált, így fennmaradhat, annak ellenére, hogy a szerves oldószer a hidrátburkot tönkreteszi. Az enzim katalitikus tulajdonságai akkor is megmaradnak, ha a hidratált enzim, és a szerves oldószer egymástól valamilyen módon elszigetelve, térben elkülönítve vannak.

Végül a megfelelő enzim kiválasztásával is eredményessé tehető a szerves oldószeres biokatalízis, hiszen csak azok az enzimek használhatóak e folyamat során, amelyek ebben a közegben működésképesek (Khmelnitsky és mtsai, 1991).

### **2.3.2. A szerves oldószeres rendszerek jellemzése (log P, $a_w$ értékek)**

A szerves oldószeres rendszerek jellemzésekor elsőként el kell választani egymástól a vízzel nem elegyedő szerves oldószer–víz rendszert, (a vizes fázisban az oldott enzimmel) melyben a fent említett előnyös tulajdonságok látványosan érvényesülnek, s a hátrányok (pl. az oldószer enzimet denaturáló, ill. inaktiváló hatása) csak a folyadék-folyadék fázishatáron mutatkoznak meg, és a vízzel elegyedő szerves oldószer-víz rendszert, melyekben az enzim szubsztrát/termék gátlása kifejezettebb, a termék kinyerés bonyolultabb lehet, mint a kétfázisú rendszerekben (Brink és mtsai, 1988).

A szerves oldószeres rendszereket két jellemző értékkel, a szerves oldószer

hidrofobicitásának mértékével ( $\log P$ ), és a termodinamikai vízaktivitással ( $a_w$ ) jellemezhetjük.

Az oldószer hidrofobicitásának mértékét tükröző  $\log P$  nem más, mint az adott oldószer víz-oktanol rendszerben mért megoszlási hányadosának logaritmus. A  $\log P$  értékével kapcsolatos általános megállapítások a következők:

- $\log P < 2$ : ezek az oldószer poláros jellegűek, ezért megbonthatják az esszenciális víz-biokatalizátor kölcsönhatásokat, ezáltal könnyen inaktívalhatják, és/vagy denaturálják az enzimet.
- $2 < \log P < 4$ : ezek az oldószer átmeneti típust képviselnek, kevésbé hatnak a hidrátburokra, ill. a katalitikus aktivitásra.
- $4 < \log P$ : ezek az oldószer apolárosak, nem zavarják a hidrátburkot, ezért sok esetben előnyös lehet a felhasználásuk.

Kétkomponensű rendszerekben a  $\log P$  érték kiszámításának szabálya a következő:

$$\log P_{\text{elegy}} = X_1 \log P_1 + X_2 \log P_2,$$

ahol  $X_1$ , és  $X_2$  a komponensek molarányai.

A  $\log P$  érték jó indikátora a szerves oldószeres rendszereknek, mivel közvetlenül mérhető, ill. egyszerűen kiszámolható, és sokkal hatékonyabban jellemzi a szerves biokatalízis gyakorlatában elterjedt oldószeret, mint bármely más érték ( $\alpha$ : polarizálhatóság;  $\epsilon$ : dielektromos konstans;  $\gamma$ : hidrogénkötési képesség;  $\mu$ : dipólus momentum). Így például az alkalmazott oldószer  $\log P$  értéke és a rögzített sejt-aktivitás között szignifikáns összefüggést találtak, ugyanez nem mondható el a dielektromos állandó esetében (Laane és mtsai, 1987).

A biokatalizátor nem hagyományos közegekben mutatott viselkedését lényegesen nehezebb „megjósolni”, ill. jellemezni, mint azt az egyszerű vizes oldatokban végbemenő reakciók esetén. E bonyolult rendszerek leginkább használható jellemzését a termodinamikai tulajdonságok (különös tekintettel a részecske megoszlásra, egyensúlyi viszonyokra stb.) fiziko-kémiai elemzése szolgáltatja. Ezek közül kiemelt jelentőségű a termodinamikai vízaktivitás ( $a_w$ ), mely a legalkalmasabb paraméter a szerves oldószeres közeg vízzel kapcsolatos tulajdonságainak jellemzésére. E paraméterrel lényegében nem mást, mint a „szabad” víz koncentrációját jellemezzük, amely mind az enzim stabilitásának fenntartásában, mind pedig a hidrolitikus aktivitásának befolyásolásában kulcsszerepet játszik. A nem hagyományos közegekben az aktív enzim molekuláris környezetében a víz mennyisége kritikus faktornak

tekinthető. Az enzim katalitikus tulajdonságai ugyanis szerves oldószer rendszerben szigorúan függenek attól a vízmennyiségtől, amely rendelkezésre áll az aktív konformáció fenntartásához (Lozano és mtsai, 1997). A biokatalitikus rendszer változásai gyakran indirekt módon, az aktív molekulák számára hozzáférhető víz mennyiségén keresztül nyilvánulnak meg. A vízért versengés folyik a katalizátor, a hordozó, a szubsztrátok, és egyéb rendszeralkotók (pl. különböző sók) között. E versengés bonyolult összefüggései az  $a_w$  érték változásán keresztül fejezhetők ki.

A szerves oldószeres közeg kiválasztásának gyakran fontos motívuma a hidrolitikus reakció egyensúlyának elmozdítása, mely által lehetőség nyílik szintetikus reakciók katalizálására hidroláz enzimek közreműködésével. Cél lehet a hidrolízis direkt megfordítása vizet, mint sztöchiometrikus terméket eredményező (pl: savak, alkoholok észteresítése) reakciókban, ill. olyan csoporttranszfer (pl: átészteresítések) reakciók kivitelezése, melyekben a hidrolitikus mellékreakciót, az acil donor egyszerű hidrolízisét kell minimálisra visszazorítani. A víz hidrolitikus egyensúlyra gyakorolt hatásának figyelembe vétele mindkét esetben fontos (Halling, 1994). A szerves oldószeres rendszerekben ugyanis az oldat, és a biokatalizátor (adott esetben a hordozóhoz rögzített biokatalizátor rendszer) mikrokörnyezetének víztartalma egyensúlyi eloszlásra, kiegyenlített  $a_w$  értékre törekszik. Magas víztartalmú hordozókhoz rögzített enzimek esetében különösen szembeűnő, hogy a szerves közegben a hordozó víztartalmának jelentős részét leadja, csökkentve ezáltal saját vízáktivitását, megváltoztatva a rögzített enzim mikrokörnyezetét, ill. enzimaktivitását. Ez a csökkenés azonban oldott enzimformához képest elenyésző lehet, hiszen a hordozó pórusaiban az aktív konformáció fenntartásához még így is elegendő mennyiségű víz maradhat (Blanco és mtsai, 1992).

A rendszer vízáktivitása, és az alkalmazott oldószer hidrofobicitása közötti összefüggés vizsgálatára kiotorfin származék (Bz-Tyr-Arg-Oet) szintézisét alkalmazták sikeresen Lozano és munkatársai (1997) kimotripszin felhasználásával különböző szerves oldószerekben. A közeg oldószertartalmának növekedésével csökkent a rendszer vízáktivitása. A legnagyobb csökkenés a leginkább hidrofil jellegű oldószer (DMSO) alkalmazása esetén volt tapasztalható. A kimotripszin valamennyi oldószer esetében akkor mutatta a legnagyobb szintetikus aktivitását, amikor a vízáktivitása magasabb volt, mint 0.8. Feltételezhetően ez egy kritikus érték, amely a kimotripszin esetében fontos az enzim aktív konformációjának fenntartásában, ám független az alkalmazott oldószer minőségétől. A várható  $a_w$ , és  $\log P$  értékek kiválóan

alkalmazhatók az enzimátikus peptidszintézis rendszer összetételének megtervezésére.

### **2.3.3. Az enzim stabilitásának, aktivitásának fokozása**

Több módszert dolgoztak ki az enzimek stabilitásának, és aktivitásának fokozására szerves oldószeres rendszerekben. Ilyen például az enzim oldhatóvá tétele ionpárt képezve, s enzim-felületaktív anyag komplexet létrehozva (pl.  $\alpha$ -kimotripszin), az enzimek együtt liofilizálása szénhidrátokkal, sókkal, valamint polimerekkel, (Triantafyllou és mtsai, 1997) alacsony hőmérsékleten megvalósított katalízis (Lee és mtsai, 1998).

Az enzimek stabilizálására az enzim rögzítése hatékony módszer lehet. Rögzítéskor jelentős mértékben megnövekedhet a hőstabilitás, gátlódhatnak a nemkívánatos fehérje-fehérje kölcsönhatások (Triantafyllou és mtsai, 1997). Az enzimrögzítés előnyösen tudja befolyásolni a biokatalizátor visszanyerését, megoldást kínál az enzim védelmére a környezet hatásaival szemben, csökkenti az enzim szubsztrát gátlását is, valamint gátol olyan fizikai jelenségeket, mint például a fehérjemolekulák aggregációja (van Sonsbeek és mtsai, 1993).

A szerves oldószeres médiumban működő biokatalizátor katalitikus aktivitása additívek hozzáadásával jelentős mértékben megemelhető. Ezek az additívek lehetnek különböző sók (pl. KCl), polimerek, valamint egyéb szerves vegyületek (poliolok, ill. különböző szacharidok stb.) (Blanco és mtsai, 1992; Adlercreutz, 1993). Az additívek enzimekre gyakorolt kedvező hatása magyarázható azzal, hogy a fehérjemolekula körül optimálisabb vízeloszlást eredményeznek, ami pedig nagymértékben hozzájárul az aktív konformáció fenntartásához, (Triantafyllou és mtsai, 1997) megnövelik a szintetikus enzimaktivitást, illetve vízáktivitást csökkentő hatásuk révén az egyensúlyt a szintézis irányába tolják el. A poliolk esetében a koszolvens-molekulák hidroxil csoportjai felelősek a mikrokörnyezet megváltoztatásáért, ugyanis megváltoztatják a szolvens/víz szerkezetet. A poliolk megvédhetik az enzim-molekulát a hődenaturációtól (Lozano és mtsai, 1993).

### **2.3.4. Enzimekkel szerves oldószeres közegben végrehajtott szintetikus reakciók**

Az utóbbi időben egyre nagyobb figyelmet szentelnek a szerves közegű szintéziseknek, elsősorban az aminosavak, aminosav származékok (aminosav-észterek,



N-acil aminosavak), peptidek nem hagyományos, enzimatiszintézisének. Az enzimek szintézisékre való alkalmazása rendkívül előnyös, mert a komplex, polifunkciós molekulák szintézisénel felmerülhetnek olyan problémák, amelyek a klasszikus eljárásokkal nem, vagy nem elég hatékonyan oldhatóak meg (racemizáció, kémiai szelektivitás stb.). Megfelelő enzimek alkalmazása kemo-, és régió-, és enantioszelektív átalakulást tesz lehetővé, enyhe reakciókörülmények alkalmazása mellett (Pathak és Waldmann, 1998). Ezenkívül használatukkal megelőzhető a mérgező aktiválószer alkalmazása, és gazdaságosabbá tehető a folyamat. E folyamatokhoz célszerű rögzített enzimforma alkalmazása, hiszen így magas katalitikus aktivitás, stabilitás elérésére van lehetőség.

#### **2.3.4.1. N-acil aminosavak szintézise (aminosavak N-védelme)**

Az ún. enzimatiszintézis védőcsoport technikák egyre növekvő figyelmet kapnak a szintetikus szerves kémiában. A védőcsoportok megfelelő kialakítása, majd szintézis utáni eltávolítása egyaránt fontos kérdés. Számátalan kémiai eljárás áll rendelkezésünkre e folyamatokkal kapcsolatban (Schelhaas és Waldmann, 1996). A védőcsoport kémiának érdekes fejezetét jelenti az aminosavak, és egyéb molekulák aktív aminocsoportjainak enzimatiszintézis acilálása, blokkolása. Aminok, ill. aminocsoportok enantioszelektív védelmére olcsó eljárást a homokarbonátok szerves közegű enzimatiszintézis alkalmazása jelenti (Orsat és mtsai, 1996).

N-védett aminosavak enzimatiszintézisét hajtották végre szerves oldószeres közegben Kosáry és munkatársai (1994). Kovalensen rögzített, stabilizált sertésvese amino-aciláz enzimmal végezték kísérleteiket. L-Met, és ecetsav szubsztrátok alkalmazása esetén DMSO-ban, valamint 1,4-dioxánban és eredményes átalakulást értek el. Ugyancsak ezzel az enzimmal dolgoztak Ferjancic-Biagini és munkatársai (1997), s vizsgálták az L-Met N-acilálásának optimális körülményeit. Változtatták a közeg pH-ját, vízzel elgyedő szerves oldószer tartalmát, valamint  $Zn^{2+}$  ion koncentrációját. Az általuk vizsgált acil-donorok lánchosszúsága 1-6 szénatomig terjedt. Az alkalmazott körülményektől, és az acil donoroktól függően 20-30 %-os kitermelést értek el.

Az N-acil aminosavak alkalmazhatóak peptid-, ill. észterszintézis prekurzorokként, de önálló biológiai szereppel is rendelkeznek. Sajadi és munkatársai (1979) megállapították, hogy az N-védett aminosavak cianometil-észterei tumorsejt

szaporodásgátló, valamint gyulladásgátló hatásúak. Az N-Cbz-, és az N-Bz-L-Phe cyanometil-észtereit találták a leginkább hatékonyak a karragén kiváltotta gyulladási folyamat megfékezésében. Schlitzer és munkatársai (1999) N-acil aszparaginsav származékok dimetil-észtereiről (melyek a farnezil-pirofoszfónatok strukturális analógjai) mutattak ki tumorsejt gátlást. Benzoosav származékkal, az N-benzoil-tetrazollal enyhe körülmények között megoldható az adenin, és citozin bázisok exociklikus aminos csoportjának ún. benzoilálása, melynek fontos szerepe van a nukleinsav kémiában.

Az N-védett aminosavak, aminosav származékok észteresítési reakciói elterjedtek a szerves közegű bioszintézisek körében. Kise és Shirato (1988)  $\alpha$ -kimotripsinnel hajtották végre N-acetyl-L-triptofán, és N-acetil-L-tirozin szubsztrátok sikeres észteresítését különböző hidrofil jellegű ( $\log P < 2$ ) oldószerek felhasználásával. Az észterkitermelés erősen függött az oldószer minőségétől, és a közeg víztartalmától. 48 órás inkubálás után 80-85 %-os kitermelést értek el acetone, acetonitril, és etanol alkalmazásával. N-védett aminosavak észteresítését oldották meg Shih és munkatársai (1997) is. N-Cbz-L-aminosavak észteresítését végezték Celit hordozóra rögzített proteázokkal és szekunder alkoholokkal, különböző szerves oldószerekben. Mitin és munkatársai (1997) papaint használtak N-védett aminosavak, illetve peptidek gliceril észtereinek szintéziséhez. Ezek a szintetizált aminosav-, ill. peptid-észterek nagyon jó szubsztrátjai a tripszin által katalizált peptidszintézisnek. A Boc-, ill. a Z-védőcsoportokkal rendelkező aminosavak, és peptidek glicerilésztereinek szintézise 40-50°C-on, 10 % víz jelenlétében, pH 3.2-3.4-nél érte el a maximális kitermelését (50-70 %).

#### **2.3.4.2. Kémiai, és enzimatis peptidek szintézisek jellemzése**

A századfordulóig az aminosavak összekapcsolásának módját illetően semmilyen határozott nézet nem alakult ki. Az első kémiai peptidek szintézise Emil Fischer nevéhez fűződik, aki  $\alpha$ -aminosavakat acilezett  $\alpha$ -aminosavakkal, s az első dipeptidet, a glicil-glicint 1901-ben állította elő. A kémiai peptidek szintézise két alapvető feltétele a megfelelő, szelektíven eltávolítható védőcsoport kombinációk, és az egyértelműen, simán lefolyó reakciót biztosító aktiválásos módszer kidolgozása (Merrifield, 1986; Kent, 1988).

A hagyományos szilárd fázisú, valamint kondenzációs peptidek szintézisek

esetében gondot jelenthet a racemizáció, a szintetizálódó peptidok alacsony kitermelése, és az alacsony oldhatósága, valamint a védőcsoportok eltávolítása. A proteázokon alapuló enzimikus peptidszintézis módszerek alternatívát jelentenek, mert az enzimreakció régió-, és sztereoszelektív, racemizációtól mentes, a nyert termék optikailag tiszta, és minimális az mellékreakciók gyakorisága. A szintetizálódott peptidok oldékonyságát jelentős mértékben megnövelik a szerves oldószerek (Steinke és mtsai, 1991, Gill és Vulfson, 1993). Hosszabb polipeptidláncok mesterséges szintézisére rekombináns DNS-ek alkalmazása jelent látványos, újszerű molekuláris biológiai megoldást.

A peptidok különösen fontos biológiai szerepüként fogva (hormonok, neurotranszmitterek, antibiotikumok, immun-modulációban betöltött szerep, szenzoros tulajdonságok stb.) széleskörű kutatási témát jelentenek, és mesterséges szintézisük vizsgálatán túlmenően nem elhanyagolható a szerkezet-funkció összefüggések tanulmányozása sem (Wolfe és mtsai, 1984; Geisow, 1991; Lozano és mtsai, 1993).

A proteázok-katalizálta peptidszintézisek két lehetséges stratégiai megközelítése: a peptidhidrolízis direkt megfordítása a (termodinamikai megközelítés), és az N-védett aminosavak, vagy peptid-észterek aminolízise (kinetikai megközelítés).

Mindkét megközelítésnél a reakciókörülmények manipulációjával elérhető a kitermelés növekedése. A kinetikai megközelítés lényegében a szeril, és a tiolproteázok katalitikus mechanizmusán alapszik. A katalitikus folyamat során keletkezik egy acil-köztes termék, amely azután vagy egy vízmolekula (hidrolízis), vagy egy aminosav, vagy peptidszármazék közvetítésével hasad (aminolízis) (Steinke és Kula, 1990). A kinetikailag kontrollált peptidszintézisnél az enzimaktivitás a vízkoncentráció csökkenésével jelentős mértékben megemelkedhet (Lozano és mtsai, 1995).

Az enzim katalizálta peptidszintézist befolyásoló legfontosabb tényezők (amelyek befolyásolják a szelektivitást a hidrolízis, és az aminolízis között): a pH, az N-, és C-terminális védőcsoportok típusai, az ionerősség, és a reakció hőmérséklete (Schwarz és mtsai, 1990; Lozano és mtsai, 1993).

A hőmérséklet pozitív hatása, hogy megnövelve az enzimaktivitást előtérbe kerül a peptidkötés kialakulásának endoterm folyamata, másrészt viszont csökkenti a reakcióközeg viszkozitását, így könnyíti a transzfer jelenségeket. A hőmérséklet negatív hatása pedig az enzim inaktiválódásában jelenik meg (Lozano és mtsai, 1993).

### 2.3.5. Enzimikus peptidszintézisek

Az enzimikus peptidszintéziseket igen gyakran megelőzi valamilyen kémiai eljárás. Ez a kémiai eljárás általában (már az előzőekben említett) az aminosavak „N” védelme, (Steinke és mtsai, 1991; Rival és mtsai, 1999) vagy egy kémiaailag módosított, hatékonyabb enzimforma létrehozása (Murphy és Fagain, 1998).

Rival és munkatársai (1999) a *Pseudomonas aeruginosa* elasztáz enzimével szintetizáltak különböző N-védett dipeptid-amidokat. Ez az enzim hidrolitikus működése során hidrofób aminosavakat részesít előnyben. Specifitása a peptidszintézis során sem változott meg. A szintézis során különösen a Fmoc-, a Boc-, és a Z-védőcsoportokkal rendelkező szubsztrátok alkalmazása tűnt előnyösnek. Ők eredményesen végeztek olyan jellegű dipeptidszintéziseket is, amelyekben nem természetes aminosavak ( $\alpha$ -Abu, Nle, Nva, és Phg) szerepeltek szubsztrátként.

A szarvasmarha hasnyálmirigy tripszint módosították kémiaailag etilén-glikollal (Murphy és Fagain (1998)). A módosított enzimforma autolízise lecsökkent, katalitikus aktivitása viszont a különböző oldószerek vizes oldataiban mind az amidokra, mind pedig az észter szubsztrátokra megemelkedett. A benzoyl-arginyl-leucinamid kitermelés lényegesen megemelkedett acetonitrilben, és 1-butanolban. A legmagasabb kitermelést 95 %-os acetonitrilben érték el, ahol a szubsztrátok 90 %-a lett terméké alakítva. Egyik enzimforma sem végzett dipeptidszintézist 95 %-os dimetil-formamidban.

A proteázok peptidszintézisekre való alkalmazása sikeresnek tekinthető. Egyedüli hiányossága ennek a módszernek, hogy nem minden aminosav, vagy peptidil-részlet közötti kötés valósítható meg hatékonyan az általánosan elérhető proteázokkal. Az alternatív proteolitikus enzimek utáni kutatás nyithat perspektívát ennek a problémának a leküzdésére. Célszerű olyan enzimeket kiválasztani erre a célra, amelyek olcsóak, és ipari szinten való felhasználásuk nem ütközik akadályokba. Ilyen enzim például az alkaláz, és a neutráz. Clapés és munkatársai (1997) két fontos aspektusra figyeltek: melyek azok a reakciókörülmények, amelyek magas enzimaktivitást, (hogyan befolyásolja a dipeptidszintézist a hordozó típusa, a hordozó enzimtöltöttsége, a puffertartalom a reakcióközegben, a poliolo, egyszerű szacharidok, mint additívek jelenléte az immobilizálás során), valamint a legkülönbözőbb N-védett aminosav származékok, és a H-Leu-NH<sub>2</sub> között létrejövő magas peptidkitermelést eredményeznek. A kísérleti eredmények azt mutatják, hogy ebben a rendszerben javasolt a poliamid jellegű hordozó alkalmazása szorbitol, mint additív ko-

immobilizálásával, a szerves oldószerek közül az acetonitril tűnt a leghatékonyabbnak, 4 %-os pufferkoncentráció mellett. Ilyen körülmények alkalmazásával kevés kivételtől eltekintve mintegy 95-99 %-os kitermelést értek el.

Kuhl és munkatársai (1995) termolizinnel, és kimotripsinnel végeztek enzimatisztikus peptidszintézist, alacsony víztartalommal (mikrovíztartalommal), oldószer nélkül, ultrahangos, és fluidizációs technikával. Az alacsony víztartalomról a víz közvetlen, ill. kristályvizes só formájában történő hozzáadásával, vagy nedves levegőárammal gondoskodtak. Termolizin alkalmazásával Z-Phe-OH, és Leu-NH<sub>2</sub> szubsztrátok felhasználásával 87 %-os Z-Phe-Leu-NH<sub>2</sub> kitermelést értek el. Tripeptid származékokat ugyancsak meglehetősen jó kitermeléssel tudtak előállítani (79, ill. 71 %). A folyamat során nem volt kimutatható hidrolitikus mellékreakció.

Lozano és munkatársai (1993) poliolok jelenlétében papainnal katalizált Gly-Gly-Phe-NH<sub>2</sub> szintézist hajtottak végre, Gly-Gly-OH, és Phe-NH<sub>2</sub> alkalmazásával. A reakciót 60°C-on hajtották végre, kihasználva a poliolok papain hőstabilitására gyakorolt stabilizáló hatását.

### **2.3.5.1. Peptidszintézis karboxipeptidázokkal**

A peptidszintézisekben leginkább használatos karboxipeptidáz enzim a CPY. Találkozhatunk az irodalomban olyan esettel is, amikor a fenti enzim csak a vizes közegben lejátszódó kémiai peptidszintézis „szereplője”. Vízdékony karbodiimidet, és aminosav-etil-észtereket használtak a peptidlánc elongációjához abban a rendszerben amelyben a CPY feladata az aminosavakról, rövid peptidekről a védőcsoportok eltávolítása volt. Az enzim Sepharose oszlopon való rögzítése nem változtatta meg az enzimműködés pH optimumát, így ez az enziforma is alkalmas az észterhidrolízisre. Amennyiben a C-terminálison, vagy az utolsó előtti pozícióban D-aminosav van, akkor a CPY által katalizált hidrolízis gátolt. Ez a jellemvonás a szintetizálódó termék optikai tisztaságához járult hozzá (Royer és Anantharmaiah, 1979).

Az enzimek gyakran dolgoznak anizotróp mikroheterogén rendszerekben. Ilyen rendszernek tekintendők például a biomembránok. A természetet modellezni kívánó mesterséges rendszerek megalkotásánál ügyelni kell a rendkívül magasfokú szervezetségre. Kunugi és munkatársai (1996) a karboxipeptidáz Y által katalizált hidrolízist, ill. peptidszintézist vizsgálták oktil-β-D-glükopiranozid (β-OG), mint felületaktív anyag, víz, és oktanol terner rendszerben.

A kísérletsorozat a következő fontosabb lépésekből épült fel:

- $\beta$ -OG/víz kétfázisú rendszerben vizsgálták a felületaktív anyag hatását az enzim hidrolitikus aktivitására, és megállapították, hogy ez a különböző szubsztrátok esetében teljesen eltérő. Bz-Tyr-pNA peptid esetében aktivitásnövekedést tapasztaltak, amely független volt az alkalmazott  $\beta$ -OG koncentrációjától, míg Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA-nál szubsztrátgátlás volt mérhető.
- $\beta$ -OG/víz/oktanol terner rendszerben vizsgálták az enzim hidrolitikus (Bz-Tyr-pNA, és Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA szubsztrátokra), és aminolízis aktivitását (Fua-Phe-OMe, és Gly-NH<sub>2</sub> szubsztrátok alkalmazásával).

A fenti rendszerek vizsgálatánál arra a megállapításra jutottak, hogy a CPY mindkét irányú aktivitását erősen befolyásolja az egyes fázisok mikrostruktúrájának mérete, és formája.

Kunugi és munkatársai (1997) a CPY által katalizált sikeres peptidkondenzációt hajtottak végre Cbz-Phe, és Gly-NH<sub>2</sub> szubsztrátok felhasználásával különböző szerves oldószerekben. A rendszer optimális működése mellett 50 %-os maximális kitermelést értek el. Az alkalmazott oldószerek az N,N-dimetil-formamid (DMF), az acetonitril, az 1,4-dioxán, és a DMSO voltak.

Cramer és Horváth (1989) CPY által katalizált reakciókban N-védett peptid-alkil-észterek aminosavakkal, aminosav-alkil-észterekkel, vagy aminosav-amidokkal képzett származékait állították elő. Az aminosav-amidokkal végzett kísérleteknél mintegy 60-95 %-os kitermeléssel keletkezett peptid-amidokat viszont a többlépéses peptidszintézis során minden újabb lépés előtt dezaminálni kell egy észterszubsztrát előállításának érdekében. Cramer és Horváth (1989) a CPY-t rögzítették szilika gélen, valamint poliamino funkciós csoportokkal rendelkező szilánon, majd elvégezték a rögzített formák kémiai módosítását higany sókkal, és fenacil-bromiddal, és elemezték a kémiai módosítások dezaminálási aktivitásra, valamint a peptidszintézisre gyakorolt hatásait. A rögzített enzim higany származékai jóllehet magas kitermelést eredményeztek, eredeti aktivitásuknak azonban 66, ill. 25 %-át veszítették el, 4 órás inkubálás alatt 25°C-on. Így az immobilizált enzim higany származékai nem töltötték be a rögzített enzimformával szemben támasztott egyik legfontosabb követelményt, az oldott formához képest megnövekedett aktivitást. A fenacil-bromiddal kémiai módosított immobilizált CPY viszont stabil volt az alkalmazott reakciókörülmények között (10 mM-os borát puffer, pH 9.0, 10°C), és magasabb kitermeléssel végezte el a

peptidszármazékok (Bz-Arg-Met-NH<sub>2</sub>, Bz-Arg-Met-Leu-NH<sub>2</sub>, Bz-Arg-Met-Leu-Phe-NH<sub>2</sub>) dezaminálását, ill. az ezt követő peptidszintézist, mint az oldott enzimforma.

Steinke és munkatársai (1990, 1991) citrusfélék terméséből preparált karboxipeptidáz C-vel végeztek peptidszintézist foszfátpufferben, annyi etanol (10-40 %) jelenlétében, amennyi az aminosav-észterek feloldásához szükséges. Viszonylag magas kitermeléssel (80-95 %) állítottak elő dipeptideket. A karboxil-komponens a Bz-Tyr-OEt volt, és különböző aminosav-alkilészterek szerepeltek a reakcióban, mint nukleofilek. A reakció kitermelését a pH, a nukleofil koncentrációja, a puffer molaritása mellett az N-terminális védőcsoportja, valamint az alkalmazott aminosav-alkilészter oldallánc is erősen befolyásolta. A szintetizálódó peptidek másodlagos hidrolízisét nem tapasztalták. Érdekes, hogy eltérőek a katalitikus tulajdonságai a citrusfélék terméséből, és leveleiből preparált karboxipeptidáz C enzimeknek. A levélből preparált enzimek sokkal szélesebb szubsztrátspecifitással rendelkeztek.

Aasmul-Olsen és munkatársai (1990) nem N-védett aminosav szubsztrátokkal egy lépésben dipeptideket szintetizáltak a CPY katalizálta reakcióban. Leu-MetOH-t 35, míg D-Leu-MetOH-t 70 %-os kitermeléssel állítottak elő. Különböző proteolitikus enzimek, (kimotripszin, tripszin, szubtilizin) ill. lipázok felhasználásával több, változatos dipeptidet szintetizáltak.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Anyagok

##### **Az enzimrögztítéshez használt hordozók:**

Akrilex típusú hordozók: Akrilex P 100, p-benzokinonnal aktivált gyöngypolimer (részecskeméret: 100-320  $\mu\text{m}$ ), és Akrilex C 100, karboxil funkciós csoportokkal rendelkező poliakrilamid gyöngypolimer (karboxiltartalom: 6.4 mmol/g; részecskeméret: 100-320  $\mu\text{m}$ ). [*Reanal*]

Szilokróm alapú hordozók: Szilokróm aldehid (aldehidtartalom: 27  $\mu\text{mol/g}$ , részecskeméret: 300-500  $\mu\text{m}$ ; átlagos pórusméret: 40-60 nm; specifikus felület: 80  $\text{m}^2/\text{g}$ ), és Szilokróm, p-benzokinonnal aktivált (kinontartalom: 37  $\mu\text{mol/g}$ , részecskeméret: 300-500  $\mu\text{m}$ ; átlagos pórusméret: 40-60 nm; specifikus felület: 80  $\text{m}^2/\text{g}$ ) [*NPO Biolar, Riga-Olaine, Lettország*]

Polietilén tereftalát (Sorsilen) (pórusméret: 2-3  $\text{cm}^3/\text{g}$ ; specifikus felület: 80-100  $\text{m}^2/\text{g}$ ).

[*A Szlovák Tudományos Akadémia Pozsonyi Kémiai Intézetétől kaptuk.*]

##### **Az alkalmazott karbodiimid-származékok:**

N-ciklohexil-N'-[ $\beta$ -(N-metilmorfolino)-etil]-karbodiimid-p-toluolszulfonát (CMEC) [*Merck*]; N-(dimetil-amino-propil)-N'-etil-karbodiimid-hidroklorid (DAPEC) [*Fluka*]; N-ciklohexil-N'-(2-morfolinoetil)-karbodiimid-metil-p-toluolszulfonát (CMC) [*Fluka*]; 1-ciklohexil-3-(2-morfolinoetil)-karbodiimid-metil-p-toluolszulfonát (CMC) [*Sigma-Aldrich*]

##### **A C terminális aminosav meghatározáshoz használt peptidek:**

Gly-Phe; Tyr-Tic-Phe-Phe (TIPP) [Tic=tetrahydro-3-izokinolin-karbonsav]; Tyr-D-Ala-Phe-Phe (TAPP); Tyr-Gly-Gly-Phe-Met (metionin-enkefalin); Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (leucin-enkefalin); Tyr-DAla-Gly-Phe-Nle-Arg-Phe (P7);

[*MTA SzBK Biokémiai Intézetének munkatársa Dr. Tóth G. bocsátotta őket rendelkezésünkre.*]



Az enzimtisztításhoz használt ioncserelő (DEAE-cellulóz (átlagos részecske átmérő: 25 µm; névl. kapacitás: 0.6-0.8 meq/g; duzzadás: 9.0 ml/g), a rögzítéseknél, működés vizsgálatoknál alkalmazott pufferek, az aminosavak N-acilezéséhez használt hangyasav, és benzoésav, valamint a szerves oldószerek a *Reanal Finomvegyszergyár* termékei voltak.

Az általunk alkalmazott szerves oldószerek log P értékei a következők: DMSO: -1.3; 1,4-dioxán: -1.1; metanol: -0.76; acetonitril: -0.33; etanol: -0.24; aceton: -0.23; etil-acetát: -0.68; 1-butanol: 0.8; és a toluol: 2.5.

Az enzimaktiváláshoz használt tripszin, a Folin-Ciocalteu reagens, a CPA szintetikus szubsztrátja a hippuril-L-fenilalanin, valamint a vékonyrétegekromatográfiánál alkalmazott vékonyrétegek: DC-Alufolien 20 x 20 cm Kieselgel 60, és DC-Alufolien 20 x 20 cm Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (specifikus felület: 480-540 m<sup>2</sup>/g; rétegvastagság: 175-225 µm) a *Merck [Darmstadt, Németország]* cég termékei voltak.

A kísérletekben használt aminosavak (L-Ile, L-Leu, L-Phe, L-Tyr, és az L-Trp), valamint az aminosavak N-védelméhez használt szerves savak (propionsav, vajsav, és valeriánsav), az N-védett aminosavak (N-acetil-L-tirozin, N-benzoil-L-fenilalanin), ill. aminosav észter (N-acetil-L-tirozin etil észter) a *Sigma-Aldrich [St. Louis, USA]* termékei voltak.

A szintetikus reakciókhoz használt karboxipeptidáz A-t (70-73 U/mg) a *Fluka [Buchs, Svájc]* cégtől vásároltuk. A reakcióelegyek víztartalmát Karl Fischer reagenssel (*Carlo Erba [Rodano, Olaszország]*) mértük.

## 3.2. Módszerek

### 3.2.1. Karboxipeptidáz A preparálás

Az enzimrögzítési kísérletekhez a CPA-t a Keller és munkatársai (1956, 1958) által kidolgozott módszer szerint preparáltuk. A preparálás négy fontos részfolyamatra bontható: az acetonpor készítés, majd feltárás acetonporból, DEAE-cellulóz oszlopkromatográfia, és a tripszinnel végzett aktiválás.

Friss szarvasmarha hasnyálmirigyből (5000 g) folyékony nitrogénnel történt fagyasztás után szerves oldószeres extrakcióval acetonport állítottunk elő.

Az acetonport (60 g) desztillált vízzel (1200 ml), és toluollal (1 ml), mint

stabilizálóval egy éjszakán keresztül 4°C-on extraháltunk, majd centrifugálást követően a felülúszó pH-jának folyamatos ellenőrzése mellett (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-tal (60 %-os telítésig) kisértük, a kapott csapadékot 5 mM-os pH 8-as kálium-foszfát pufferben feloldottuk, és ugyanezen pufferrel szemben dializáltuk egy éjszakán át.

A dializált enzimoldat 15 ml-ét aktivált DEAE-cellulóz oszlopra (45x1 cm) vittük fel, majd 40 ml/h átfolyási sebességgel 3 ml-es frakciókat szedtünk, s a nemkötődő fehérjék eltávolítása után foszfát puffer lineáris koncentrációgrádiensével (5 mM, pH 8; ill. 320 mM, pH 8) eluáltuk az enzimet az oszlopról.

A kapott prokarboxipeptidáz A oldatot tripszinnel aktiváltuk (3.82 U) pH 7.8-nál 37°C-on, és folyamatosan mértük a próbák CPA aktivitását a teljes aktiválódásig.

### 3.2.2. Karboxipeptidáz A aktivitásmérés

A CPA aktivitás mérését a Folk és Schirmer (1963) által kidolgozott módszer szerint végeztük el. Az aktivitásmérő elegy (3 ml) a következő komponensekből állt: 55 mM Tris/HCl puffer (pH 7.5); 550 mM NaCl; és 0.5 mM hippuril-L-fenilalanin. A reakciót 100 µl enzimoldat (~5 U) hozzáadásával indítottuk. A hippuril-L-fenilalanin hidrolízisét, a 254 nm-nél bekövetkező abszorpció növekedést 25°C-on spektrofotométerrel követtük.

A rögzített CPA aktivitásmérését a következőképpen végeztük el. 20-100 mg rögzített enzimet szuszpendáltunk 4 ml Tris/HCl pufferben (100 mM, pH 7.5), amely 550 mM NaCl-ot, és 0.5 mM hippuril-L-fenilalanint tartalmazott. A szuszpenziót 1-10 percig 25°C-on kevertettük. Az inkubáció után az enzimet hirtelen szűrtük, és meghatároztuk a szűrlet abszorpció változását 254 nm-nél. A minta 1 ml-ében lévő aktivitásegységek számát az alábbi összefüggéssel számoltuk:

$$\text{Térfogati aktivitás (U/ml)} = \Delta E / \text{perc} \times V_r / \epsilon_{254} \times V_m \times l$$

$V_r$  : a reakcióelegy térfogata

$V_m$  : a bemért enzimoldat térfogata

$\epsilon_{254}$  : a hippuril-L-fenilalanin extinkciós koefficiense, értéke: 0.36 ml /µmol

$l$  : a fényút hossza a küvetében

Egy enzimegység azzal az enzimmennyiséggel definiálható, amely 1 µmol hippuril-L-fenilalanint hidrolizál el percenként pH 7.5-ön, és 25°C-on.

### 3.2.3. A minták fehérjetartalmának meghatározása

A fehérjetartalom közelítő jellegű gyors megállapítását, melyre a DEAE-cellulóz kromatográfiánál volt szükség a 280 nm-nél, a pontos meghatározást Lowry és munkatársai által kidolgozott módszer (1951) szerint végeztük el. Ez utóbbinál alkalmazott Folin-Ciocalteu reagens lúgos közegben kék színreakciót ad a fehérjékkel, amely 750 nm hullámhossznál mérhető. Az oldatok fehérjetartalmát marha szérumból készített kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg. A Lowry által leírt módszerhez szükséges oldatok:

- a) 2 %-os  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 100 mM NaOH-ban
- b) 0.5 %-os  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 %-os Na-citrátban
- c) 50 ml a) + 1 ml b), közvetlenül a meghatározás előtt készítjük
- d) 2 N Folin- Ciocalteu reagens

10-100  $\mu\text{g}$  fehérjéhez 2.5 ml c) oldatot adunk, majd 25°C-on 10 percig inkubáljuk. Hozzáadunk 0.25 ml d) oldatot, összekeverjük, és 40 perc múlva fotometráljuk.

### 3.2.4. Rögzített CPA előállítása

#### 3.2.4.1. Rögzítés polietilén-tereftalát (Sorsilen) hordozóra

A karboxipeptidáz A adszorpciós rögzítése Sorsilen hordozón a következőképpen történt: 100 mg Sorsilen-t átmostunk 10 ml kálium-foszfát pufferrel (50 mM, pH 6.0), majd az enzimet (40 mg, ~2000 U) feloldottuk ugyanezen puffer 10 ml-ében, és hozzáadtuk a hordozóhoz. A szuszpenziót 24 órán át kevertettük 4°C-on. A felülúszó leszűrése után 3 x 10 ml kálium-foszfát pufferrel (50 mM, pH 6), majd 3 x 10 ml 50 mM, pH 7-es kálium-foszfát pufferrel mostuk a Sorsilent a nem kötődött fehérjék eltávolítása érdekében.

#### 3.2.4.2. Rögzítés Szilokróm-aldehidhez

A Szilokróm aldehidhez, valamint a p-benzoquinonnal aktivált Szilokrómhoz történő enzimrögzítéshez Simon és munkatársai (1992) módszerét vettük alapul.

A Szilokróm aldehidhez történő enzimrögzítésnél 1g hordozót átmostunk 10 ml kálium-foszfát pufferrel (50 mM, pH 8), majd hozzáadtunk 10 ml enzimotozatot (20 mg, ~1000 U aktivitás). Az enzimet kálium-foszfát pufferben (50 mM, pH 8) oldottuk fel. A

szuszpenziót 3 órát 4°C-on kevertettük, majd a felülúszó leszűrése után 3 x 10 ml kálium-foszfát pufferrel (50 mM, pH 8), 3 x 10 ml 500 mM NaCl-ot tartalmazó kálium-foszfát pufferrel (50 mM, pH 8), végül 3 x 10 ml Tris/HCl pufferrel (50 mM, pH 8) mostuk. A rögzített enzimet ugyanebben a pufferben tároltuk felhasználásig.

#### **3.2.4.3. Rögzítés p-benzokinonnal aktivált Szilokrómhoz**

1 g aktivált hordozót átmostunk kálium-foszfát pufferrel (50 mM, pH 7.5), majd hozzáadtunk 10 ml enzimoldatot (20 mg, 1000 U aktivitás). Az enzimet kálium-foszfát pufferben (50 mM, pH 7.5) oldottuk fel. A szuszpenziót 24 órán át 4°C-on kevertettük, majd a felülúszó leszűrése után 3 x 10 ml kálium-foszfát pufferrel (50 mM, pH 7.5), 3 x 10 ml 0.5 M NaCl-ot tartalmazó kálium-foszfát pufferrel (50 mM, pH 7.5), végül 3 x 10 ml Tris/HCl pufferrel (50 mM, pH 7.5) mostuk. Az enzimet 4°C-on tároltuk felhasználásig.

#### **3.2.4.4. Rögzítés p-benzokinonnal aktivált Akrilexhez**

100 mg aktivált gél 4 ml kálium-foszfát pufferben (100 mM, pH 8) szuszpendáltunk, majd hozzáadtuk az enzimet (8-10 mg, 400-500 U aktivitás). 4°C-on 24 órán át kevertettük, majd a felülúszó leszűrése után kimostuk a gél: 3 x 10 ml acetát pufferrel (100 mM, pH 5.5); 3 x 10 ml 0.5 M NaCl-ot tartalmazó acetát pufferrel (100 mM, pH 5.5); végül 3 x 10 ml kálium-foszfát pufferrel (100 mM, pH 8) (Kálmán és mtsai. 1983).

#### **3.2.4.5. Rögzítés Akrilex C 100 hordozóhoz, az Akrilex C 100-CPA vizsgálata**

A karboxipeptidáz A kovalens rögzítését Akrilex C 100 hordozóhoz a Kotormán és munkatársai (1986) által leírt módszerrel végeztük el. A karboxil funkciós csoportok aktiválásához különböző vízdékony karbodiimid származékokat használtunk. 100 mg xerogélt szuszpendáltunk, és duzzasztottunk 10 ml kálium-foszfát pufferben (50 mM, pH 6). Az aktiválandó karboxilcsoportok számának megfelelően, sztöchiometrikus mennyiségű, a rögzítéshez leginkább optimális CMEC-t oldottunk 1 ml, 0°C-os kálium-foszfát pufferben (50 mM, pH 6), majd folyamatos kevertetés, és hűtés mellett hozzáadtuk a gélhez. 10 perces aktiválási idő elteltével 2 ml enzimoldatot (8-10 mg,

400-500 U, 50 mM, pH 6-os foszfát pufferben oldott) adtunk a rendszerhez, és a szuszpenziót 24 órán át 4°C-on kevertettük. Az inkubálás után leszűrtük a felülúszót, majd a következő pufferekkel mostuk a gél a nem kötődött fehérjék eltávolítása érdekében: 3 x 10 ml kálium-foszfát puffer (50 mM, pH 6); 3 x 10 ml 1M NaCl-ot tartalmazó kálium-foszfát puffer (50 mM, pH 6); végül 3 x 10 ml kálium-foszfát puffer (50 mM, pH 6). A rögzített enzimet 4°C-on ugyanebben a pufferben tároltuk felhasználásig.

### **3.2.5. C-terminális aminosav meghatározás, HPLC analízis**

A mintákat a peptidhasításhoz a következőképpen készítettük elő: 5 mg peptidet oldottunk 5 ml desztillált vízben, melynek pH-ját Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> -tal pH 7.5-re állítottuk. A mintákat 30°C-on megfelelő keverés mellett 2 U enzimaktivitás jelenlétében inkubáltuk. Óránként 500 µl mintákat vettünk. A rögzített enzimet a mintákból mérés előtt szűrővel távolítottuk el.

A peptidhidrolízis folyamata során felszabaduló aminosavak minőségi, mennyiségi azonosítását vékonyrétegekromatográfia mellett HPLC-vel végeztük. A művelethez egy SP 4290 integrátorral, Inores ioncserélő oszloppal felszerelt LKB HPLC rendszert használtunk. Eluensként 50 mM kénsavat alkalmaztunk. A minták futtatása 45°C-on, 0.8 ml/perc áramlási sebességgel történt. A detektálás hullámhossza 210 nm. Az injektálási térfogat 50 µl volt. A kapott adatok kiértékelése GynkoSoft programmal történt.

### **3.2.6. Vékonyrétegekromatográfia alkalmazása aminosavak, aminosav származékok, peptidek kimutatására**

A peptidhasítás során felszabaduló aminosavak, a dipeptidszintézis termékek, az átészteresítési reakció termékek, valamint az előállított N-védett aminosavak kimutatására, minőségi, és mennyiségi meghatározására vékonyrétegekromatográfiát alkalmaztunk. A kromatográfiához alumíniumlemezre készített szilikagél rétegeket (Merck) használtunk fel. Futatóelegyként 1-butanol-jégecet-víz 4:1:1 (v/v) arányú elegyét alkalmaztuk. Az L-aminosavak kimutatását ninhidrin előhívóval végeztük a Dévényi és munkatársai (1971) által kidolgozott módszer szerint. A ninhidrin előhívó A komponense: 2.0 g ninhidrin 100 ml acetonban oldva, a B komponens készítése során 1.5 g Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>

x5 H<sub>2</sub>O-t oldottunk 245 ml desztillált vízben, 5 ml jégecetet adtunk hozzá, és az elegyet acetonnal 500 ml-re egészítettük ki. A komponenseket közvetlenül felhasználás előtt a következő arányban elegyítettük össze:

50 ml A komponens + 48 ml B komponens + 2 ml 2'4'6'-trimetil-piridin.

A lemezeket, a lefűjást követően meleg légáramba helyeztük. 65-70°C-on ~15 perc alatt a ninhidrinnel megfestett foltok láthatóvá váltak.

Az N-védett aminosav észterek, ill. N-védett aminosavak kimutatását a 254 nm-en mutatott fluoreszcenciájuk alapján megfelelő fluoreszcens festékekkel kezelt alumíniumlemezre vitt szilika-rétegen végeztük (Merck). Futtatóelegyként 1-butanol-jégecet-víz 4:1:1 v/v arányú elegyét alkalmaztuk. A lemezt 254 nm hullámhosszúságú fényel megvilágítva az észterfoltok, ill. az N-védett aminosavak láthatóvá váltak.

A vékonyrétegekromatográfiánál kapott foltok kiértékelésére a GelBase/GelBlot Pro (UVP, U.K.) computer programot alkalmaztuk, ismert koncentrációjú standardok felhasználásával.

### **3.2.7. Stabilitásvizsgálatok szerves oldószerekben**

A CPA szerves oldószerekkel szemben mutatott stabilitását Tris/HCl pufferben (100 mM, pH 7.0) a szerves oldószer megfelelő mennyiségének jelenlétében (20-90 %) tanulmányoztuk. A mintákat 25°C-on, megfelelő ideig (0-120 perc) inkubáltuk, intenzív keverés mellett, majd aliquotok vételével a standard aktivitásmérő módszer alapján meghatároztuk a maradék aktivitásukat. 100 %-nak tekintettük a 0 perces minta aktivitását (kiindulási aktivitás).

### **3.2.8. Reakcióelegyek víztartalmának meghatározása Karl Fischer szerint**

A Karl Fischer reagens szerves oldószerek víztartalmának, szilárd anyagokból, kristályokból, pl. metanollal kioldható (extrahálható) víznek, valamint szerves funkciós csoportok által szabaddá tehető víznek a meghatározására alkalmas. A titrálást az alábbiak szerint végeztük el (Mázor, 1971).

A meghatározást két szakaszból állt: a reagens hatóértékének (vízértékének) meghatározása, majd az ismert vízértékű reagenssel a minta víztartalmának meghatározása.

A reagens vízértékén (B) azt a számot értjük, amely megmutatja, hogy az oldat 1

ml-e hány mg H<sub>2</sub>O-t mér. Meghatározását metil-alkohollal végeztük. Metanol 10-10 ml-es részletének víztartalmára eső reagens fogyást (a) meghatároztuk. Elkészítettük a következő ún. beállító oldatot: metanollal kiöblített 500 ml-es mérőlombikba bemértünk A=2.000-2.500 g vizet, majd metanollal jelig töltöttük. Az oldat 10-10 ml-ét megtráltuk a reagenssel, s ha a fogyás értékét b-vel jelöljük, a vízérték a következőképpen alakul:

$$B = A \times 20 / b - a$$

A minta 100 µl reakcióelegyet absz. etanollal 10 ml-re egészítettünk ki, majd tráltuk az ismert vízértékű reagenssel. A reagens fogyásból kiszámítható a 100 µl mintában lévő víz mennyisége.

Szerves oldószer alkalmazása esetén a rendszer puffertartalmát egyrészt, mint a rendszer víztartalmát (vízkoncentrációját) említjük, másrészt a puffereelt szerves oldószer kifejezést használjuk.

### 3.2.9. A dipeptidszintézis

A dipeptidszintézishez használt reakcióelegy 2.4 ml-es térfogata tartalmazott egy kiválasztott aminosavat (2.5 mM), és a puffereelt (50 mM-os, pH 5.5-ös kálium-foszfát puffer) szerves oldószer, ami esetünkben általában acetonitril volt. A reakciót 0.15 ml enzimsuszpenzió (~19 U) hozzáadásával indítottuk, és az elegyet 450 rpm-en 6 h-t kevertettük 30°C-on. A megfelelő inkubációs periódusok után mintákat vettünk, és vékonyrétegekromatográfiával azonosítottuk a terméket.

A dipeptidszintézis körülményeit (a szintézis szerves oldószer, víztartalom, hőmérséklet, valamint pH-függése) optimalizáltuk, s meghatároztuk a dipeptidszintézis szubsztrát, és enzimkoncentráció függését.

A dipeptidszintézist az oldott enzimmél optimalizált körülmények alkalmazásával, rögzített enzimformák (Akrilex C100-CPA, liofilizált Akrilex C 100-CPA, p-benzokinonnal aktivált Akrilex P 100-CPA, Szilokróm aldehyd-CPA, és p-benzokinonnal aktivált Szilokróm-CPA) felhasználásával is elvégeztük. Puffereelt szerves oldószer közegként acetonitrilt használtunk. A szilárd hordozó-enzim rendszereket a reakcióelegyhez történő hozzáadás előtt a vízmentesítés érdekében acetonitrillel mostuk. A reakciót ~20 U enzimaktivitás hozzáadásával indítottuk el. A reakcióelegyeket 30°C-on, intenzív keverés mellett (450 rpm) 96 h-t inkubáltuk.

A liofilizált Akrilex C 100-CPA-val végrehajtott specifitás vizsgálatokhoz

L-Phe-n kívül L-Trp-t, L-Tyr-t, L-Leu-t, és L-Ile-t használtunk fel. Ugyanezen enzimforma szintetikus aktivitását 1-butanol, etil-acetát, acetón, etanol, acetonitril, metanol, és 1,4-dioxán oldószerekben is vizsgáltuk.

### 3.2.10. Átészterelési reakció

Az átészterelési reakcióban használt reakcióelegy (1.2 ml) közege, és egyben az átészterelési reakció szubsztrátja az 1-butanol volt. A másik szubsztrátot, az N-védett aromás aminosav-észter származékot esetünkben az ATEE-t 2 mg/ml koncentrációban alkalmaztuk. A kiindulási reakcióelegy 10 % víztartalommal (puffer) rendelkezett. A reakciót 72  $\mu$ l enzim (~ 20 U) hozzáadásával indítottuk, majd intenzív keverés (450 rpm) mellett 30°C-on az elegyeket 48 órán keresztül inkubáltuk.

### 3.2.11. N-védett aminosavak szintézise, reakciókörülmények vizsgálata CPA-val

Mind a kémiai, mind pedig az enzimátikus peptidszintéziseknél, átésztereléseknél, észtereléseknél fontos szerepet játszik az N-védett aminosavak létrehozása. Az utóbbi években egyre nagyobb jelentőségre szert tevő, proteolitikus enzimekkel kivitelezett szintézisekhez általában kémiai eljárás alkalmazásával készítik a szükséges szubsztrátokat, az N-védett aminosav származékokat (Steinke és mtsai. 1991; Rival és mtsai. 1999).

Az N-védett aminosavak előállításához használt reakcióelegy (1.2 ml) 5 mM koncentrációban tartalmazott egy aminosavat (általában L-Phe-t), és az acilezéshez használt valamely, alifás, vagy aromás szerves savat (10 mM). Közegként pufferelt (kálium-foszfát puffer; 100 mM, pH 7.5) szerves oldószert (acetonitrilt) használtunk, melynek víztartalma 10 % volt. A reakciókat 72  $\mu$ l enzimszuszpenzió (~ 19 U) hozzáadásával indítottuk el, majd 30°C-on intenzív keverés (450 rpm) mellett 48 órán keresztül inkubáltuk. Meghatározott inkubációs idő elteltével mintákat vettünk, és ezeket vékonyrétegkromatográfia segítségével analizáltuk. Kísérleteket végeztünk különböző szerves oldószerek közegként való alkalmazásával, valamint többféle szubsztrát felhasználásával is.



## 4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

### 4.1. CPA izolálás, tisztítás

A karboxipeptidáz A enzim marha pankreászból történő kinyeréséhez és tisztításához a Keller és munkatársai (1956, 1958) által kidolgozott módszert vettük alapul. A többször végrehajtott preparálás egymást követő lépéseiben meghatároztuk a kapott oldatok fehérjetartalmát, térfogati-, és specifikus aktivitását. A folyamat során átlagban mintegy 368-szoros tisztulást értünk el. Preparálásaink kitermelése 50-51 % volt. A tisztítás egyik legeredményesebb lépése, a DEAE-cellulóz kromatográfia, amely mintegy 16-szoros specifikus aktivitásnövekedést adott. Az előállított, s a későbbiekben alkalmazott enzimoldat fehérjetartalma 1 mg/ml, specifikus aktivitása 43-50 U/mg volt.

### 4.2. Rögzített CPA előállítása

A CPA rögzítésére az Akrilex C 100, a p-benzokinonnal aktivált Akrilex P 100, a Szilokróm aldehid, a p-benzokinonnal aktivált Szilokróm, és a Sorsilen hordozókat alkalmaztuk. A különböző hordozókon történt rögzítési kísérletek eredményeit az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat: A CPA rögzítése különböző típusú hordozók felhasználásával

Hordozó	Kötődött fehérje (mg/ g száraz gél)	Kötődött aktivitás (U/g száraz gél)	Specifikus aktivitás (U/g fehérje)
Akrilex C 100	82.00	125.00	1524.39
p-benzokinonnal aktivált Akrilex P 100	4.08	7.72	1892.15
Szilokróm aldehid	24.26	1.54	63.56
p-benzokinonnal aktivált Szilokróm	0.49	2.58	5222.60
Polietilén-tereftalát (Sorsilen)	279.88	127.68	456.19

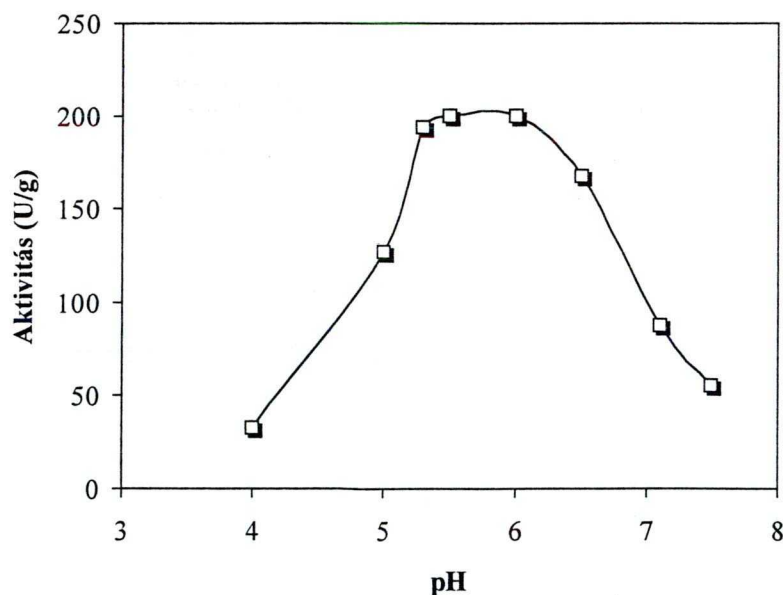
Valamennyi esetben aktív, rögzített enzimet sikerült előállítanunk. Az adatok azt mutatják, hogy a legnagyobb fehérjekötő kapacitással a fehérjéket egyszerű fizikai adszorpcióval rögzítő Sorsilen rendelkezett (279.88 mg fehérje/g száraz hordozó). Ez az

érték közel 3.5-szerese annak, amit a vízdékony karbodiimiddel aktivált karboxil csoportokat tartalmazó Akrix C-100-nál mértünk (82.00 mg fehérje/g száraz gél). Amennyiben az 1g kötődött fehérjére jutó enzimegységek számát vettük alapul, a legjobb értéket a p-benzokinonnal aktivált Szilokróom hordozón sikerült elérni (5222.6 U/g fehérje), az Akrix C 100-nál pedig ez az érték 5x nagyobb, mint a Sorsilen esetében. A CPA adszorpciója a Sorsilén felületén tehát meglehetősen erős volt, de a hordozó hidrofób karaktere elég jelentős inaktiválódást idézett elő. A jó fehérjekötő képességét, specifikus aktivitását, valamint kiváló mechanikai tulajdonságait figyelembe véve a továbbiakban az enzim rögzítéséhez, majd az ezt követő vizsgálatokhoz az Akrix C 100 hordozót használtuk fel.

### 4.3. Az Akrix C 100 hordozón történő kötődés körülményeinek optimalizálása

#### 4.3.1. A rögzítés pH függése

A rögzítés pH függését pH 4.5-7.5 tartományban vizsgáltuk. A rögzítendő enzim oldatához, hígításához, valamint a gélkezelésekhez 50 mM-os acetát puffereket (pH 4.5, ill. 5.5), valamint 50 mM-os kálium-foszfát puffereket (pH 5.5-7.5) használtunk. A rögzítést 4°C-on, 24 órán át kevertetve végeztük. Az 8. ábrán látható, hogy a rögzítés optimális pH-ja erősen a savas tartomány felé tolódott el.

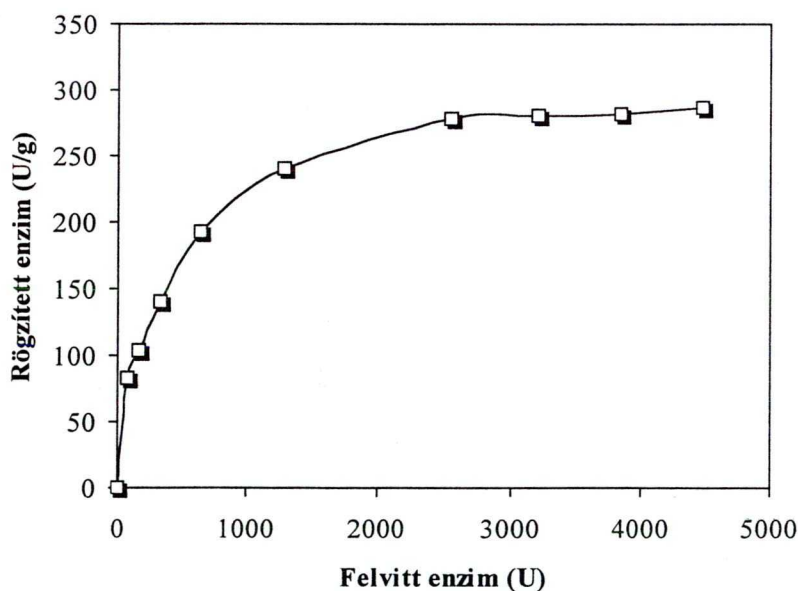


**8. ábra:** Az Akrix C 100 hordozón történő rögzítés pH függése. A rögzítést 4°C-on, 24 órás kevertetéssel végeztük.

A leghatékonyabb rögzítést akkor sikerült elérnünk, ha az alkalmazott puffer pH-ja az 5.5-6.0-os tartományban volt. A pH 6-nál 1g száraz gélre 200 U aktivitás kötődött.

#### 4.3.2. A rögzítés enzimmennyiség függése

A rögzítés enzimmennyiség függésének megállapításához 100 mg hordozóhoz 10 ml kálium-foszfát puffer (50 mM, pH 6) alkalmazása mellett, 80-450 U enzimegység hozzáadásával hajtottuk végre a kötést 4°C-on, 24 órás kevertetéssel. A 9. ábrán látható, hogy a görbe az 1g gélre vonatkoztatott adatok szerint 2500 U enzimegységnél érte el a telítési szakaszát. Ennél az értéknél 1g hordozóra 277.7 U rögzült. Tekintettel arra, hogy 1250 U felvitelénél már ~86 %-os telítést értünk el, és a rögzítés hatékonysága közel 20 %-os volt az előbbi 11 %-ossal szemben, a további kísérleteinknél 1g gélhez 1250 U aktivitást használtunk.



9. ábra: Az Akrilex C 100 hordozón történt rögzítés enzimmennyiség függése. Az ábrán az 1g száraz gélre vonatkoztatott értékeket tüntettük fel.

#### 4.3.3. A vízdékony karbodiimidek szerepe

A rögzítéseket elvégeztük az Akrilex C 100 hordozó aktiválásához szükséges vízdékony karbodiimid különböző szubsztituált származékainak, illetve különböző cégek készítményeinek felhasználásával, és úgy találtuk, hogy a szubsztituens csoportok minősége erősen befolyásolta a kötődést. Rögzítési kísérleteinket 4°C-on 24 óras

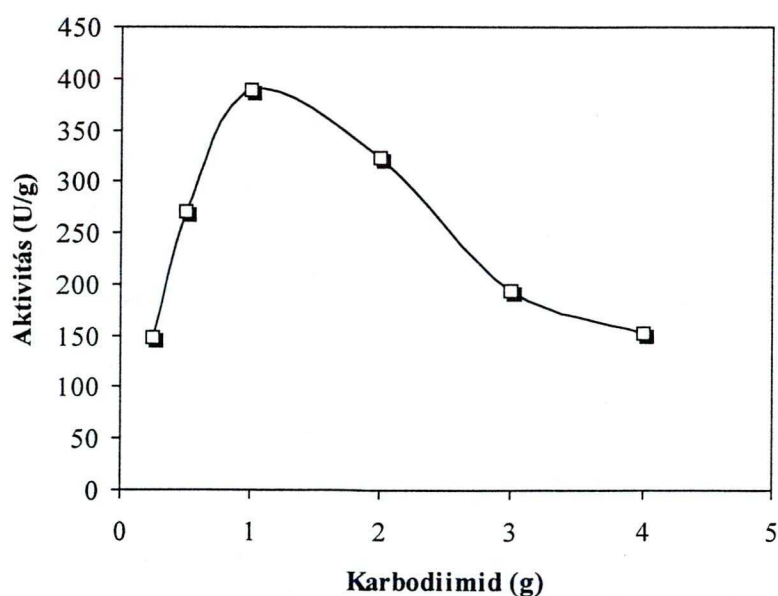
kevertetés mellett, kálium-foszfát pufferben (50 mM, pH 6), 1178 U enzimegység hozzáadásával hajtottuk végre. Eredményeinket a 2. táblázat tartalmazza.

**2. táblázat:** Rögzített CPA előállítása különböző karbodiimidek felhasználásával

Karbodiimid származék	Kötődött fehérje (mg/ g száraz gél)	Kötődött aktivitás (U/g száraz gél)	Specifikus aktivitás (U/g fehérje)
CMEC (Merck)	31.54	180.0	5707.0
DAPEC (Fluka)	48.60	147.0	3024.69
CMC (Fluka)	41.06	200.0	4871.40
CMC (Sigma)	44.94	133.2	2963.95

Mind a fehérje bekötődés, mind pedig a rögzített enzim aktivitása függ az aktiválószer minőségétől. A legnagyobb specifikus aktivitást (5707 U/g fehérje) az N-ciklohexil-N'-[ $\beta$ -(N-metilmorfolino)-etil]-karbodiimid-p-toluolszulfonát (CMEC) alkalmazásával sikerült elérnünk a rögzített enzimmél, ezért a továbbiakban ezt a karbodiimid származékot használtuk a karboxilcsoportok aktiválására.

Meghatároztuk az 1 g gél aktiválásához szükséges karbodiimid mennyiséget is. A 10. ábrán látható, hogy a karboxil csoportok aktiváláshoz szükséges optimális karbodiimid mennyiség 1g gélhez 1g, azaz elegendő a hordozó, és aktiválószer 1:1 arányban való alkalmazása.



**10. ábra:** Az Akrilex C 100 hordozón történt rögzítés karbodiimid függése. Az ábra adatai az 1 g géltre történő rögzítés eredményeit tartalmazzák. A rögzítéshez a CMEC típusú karbodiimid származékot használtuk fel.

#### **4.4. Az oldott, és rögzített (Akrilex C 100-CPA) katalitikus tulajdonságainak összehasonlítása**

Rögzítéskor az enzim, és a hordozó között kialakult kölcsönhatás(ok)nak köszönhetően, egy az enzim katalitikus aktivitását viszonylag jól megőrző új rendszer jön létre, amely az öt felépítő komponensek sajátosságainak meghatározott együttesével rendelkezik. A rögzítési folyamatban módosulhat az enzimmolekula konformációja, amely sok esetben a katalitikus tulajdonságok változását vonja maga után. Ezért fontos az oldott, és rögzített enzimek jellemzőinek összehasonlító vizsgálata, másrészt a rögzített enzimek alkalmazásának előfeltétele, a katalitikus tulajdonságaik, működési, és tárolási stabilitásuk ismerete.

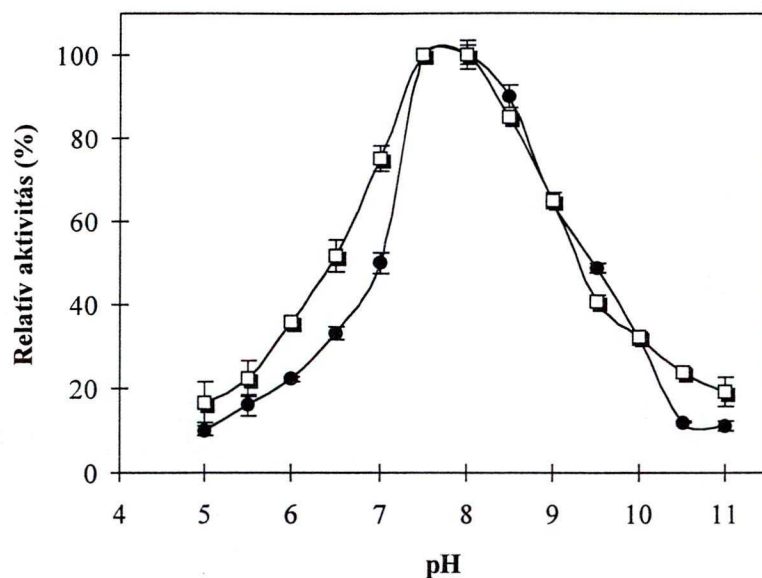
##### **4.4.1. Az enzimaktivitás pH függése**

A karboxipeptidáz A pH függését pH 5-11 tartományban vizsgáltuk. A mérésekhez 100 mM nátrium-acetát/NaOH puffert (pH 5-5.5), 100 mM kálium-foszfát puffert (pH 5.5-7.5), 100 mM Tris/HCl puffert (pH 7.5-9.0), valamint 100 mM glicin/NaOH puffert (pH 9-11) használtunk fel. A különböző pufferekben mért aktivitások esetenként azonos pH értékeknél is különböztek, így átfedő pufferek alkalmazásával, a pH optimumnál mért aktivitáshoz viszonyítva adtuk meg a relatív aktivitásokat. A mért maximális aktivitás oldott enzim esetében 2.06 U/ml, rögzített enzimnél pedig 1.25 U/ml volt. Mind az oldott, mind pedig a rögzített enzimforma esetében az elért maximális aktivitást tekintettük 100 %-nak, a további relatív aktivitásokat ezen értékekre vonatkoztatva a 11. ábrán adtuk meg. Látható, hogy a kovalens rögzítés valamelyest módosította ugyan a katalitikus aktivitás pH függésének profilját, azonban mindkét enzimforma aktivitásának optimuma pH 7.5-8.0 közé esett.

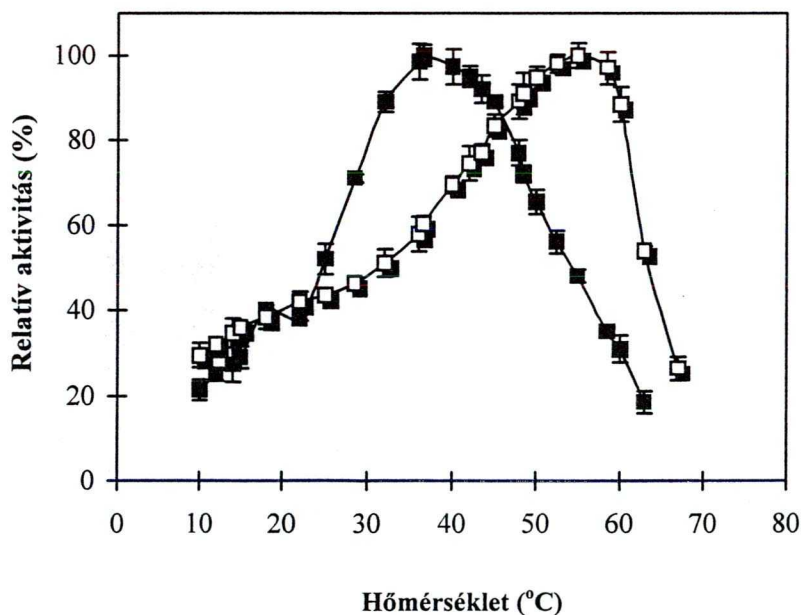
##### **4.4.2. Az enzimaktivitás hőmérséklet függése**

A hőmérséklet hatását a CPA aktivitására Tris/HCl puffer (100 mM, pH 7.5) alkalmazásával 10-70°C hőmérsékleti tartományban 5 perces inkubálási idővel mértük. A mért maximális aktivitást vettük 100 %-nak, ami oldott enzimnél 5 U/ml, rögzítettétnél 1.5 U/ml volt.

Az oldott enzim hőmérsékleti optimuma 30-50°C, a rögzített enzimformáé pedig 50-55°C közé esett (12. ábra), ami a rögzített enzim nagyobb stabilitására enged következtetni.



11. ábra: Az oldott (■) és a rögzített (□) CPA aktivitás pH függése.



12. ábra: Az oldott (■), és a hordozón rögzített (□) CPA aktivitás hőmérséklet függése.

#### 4.4.3. Kinetikai vizsgálatok

A kinetikai vizsgálatokhoz hippuril-L-fenilalanin szintetikus szubsztrátot

használtunk, s koncentrációját 0.1-0.5 mM között változtattuk a reakcióelegyben. A méréseket Tris/HCl puffer (100 mM, pH 7.5, 1 M NaCl) alkalmazásával végeztük el.

A Michaelis-állandók, ill. a  $v_{max}$  értékek meghatározását a Michaelis-Menten egyenlet linearizált formájának grafikus kiértékelésével végeztük el, Lineweaver-Burk féle ábrázolásban.

A megállapított  $K_{Mapp}$ , és  $v_{max}$  értékeket a 3. táblázatban foglaltuk össze.

**3. táblázat:** Az oldott és rögzített CPA kinetikai jellemzői

	$K_{Mapp}$ (mM)	$v_{max}$ ( $\mu\text{mol/perc/ml}$ )
Oldott CPA	1.07	17.62
Akrilex C 100-CPA	1.65	3.02

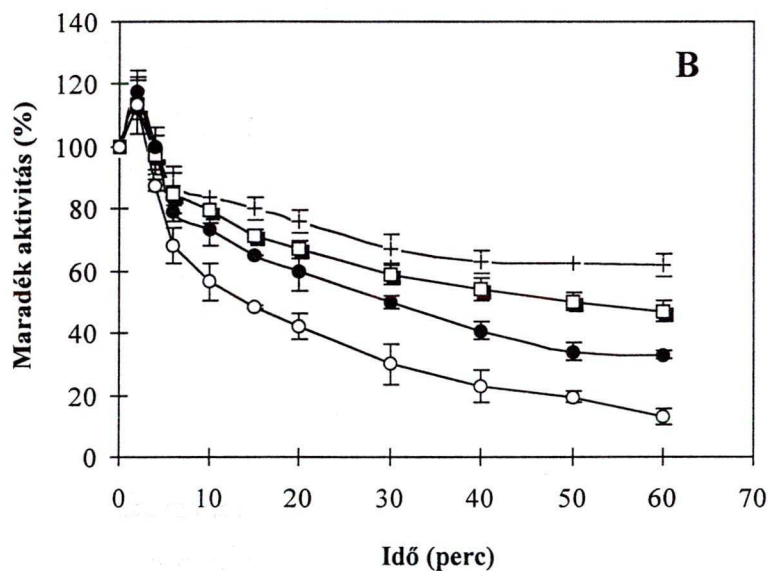
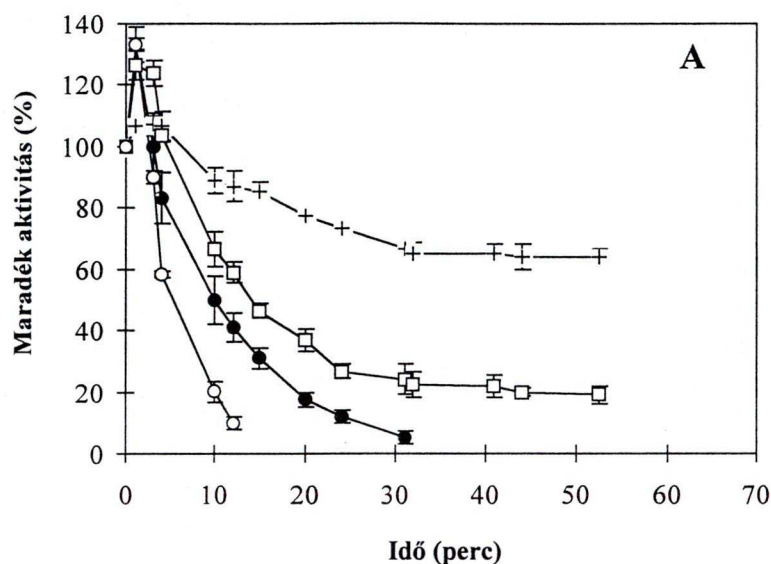
A  $K_{Mapp}$  rögzített enzimre (1.65 mM) valamivel magasabb, mint az oldott enzimre (1.07 mM) mért érték, de egy nagyságrendben vannak. A rögzített enzim  $v_{max}$  értéke 3.02 ( $\mu\text{mol/perc/ml}$ ) azonban egy nagyságrenddel alacsonyabb, mint az oldott enzimmél megállapított érték (17.62  $\mu\text{mol/perc/ml}$ ).

## 4.5. Stabilitásvizsgálatok

### 4.5.1. Hőstabilitás

A karboxipeptidáz A két formájának hőstabilitását 45-60 °C-os hőmérsékleti intervallumban tanulmányoztuk. A méréseket Tris/HCl puffer alkalmazásával (100 mM, pH 7.5) végeztük. Mind az oldott, mind pedig a rögzített enzim esetében a kiindulási aktivitást vettük 100 %-nak, amely oldott enzimmél 14.35 U/ml, rögzítettéknél pedig 5.55 U/ml volt (13. ábra). Egy rövid idejű átmeneti aktiválódás után mindkét enzimformánál, minden alkalmazott

hőmérsékletnél inaktiválódás volt tapasztalható. A megfelelő hőmérsékleten mért értékeket összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a rögzített enzim stabilabb, mint az oldott. 55°C-on a rögzített enzim megőrzi eredeti aktivitásának 35 %-át a 60 perces inkubálási idő alatt, míg az oldott 30 perc alatt gyakorlatilag teljesen inaktiválódott.



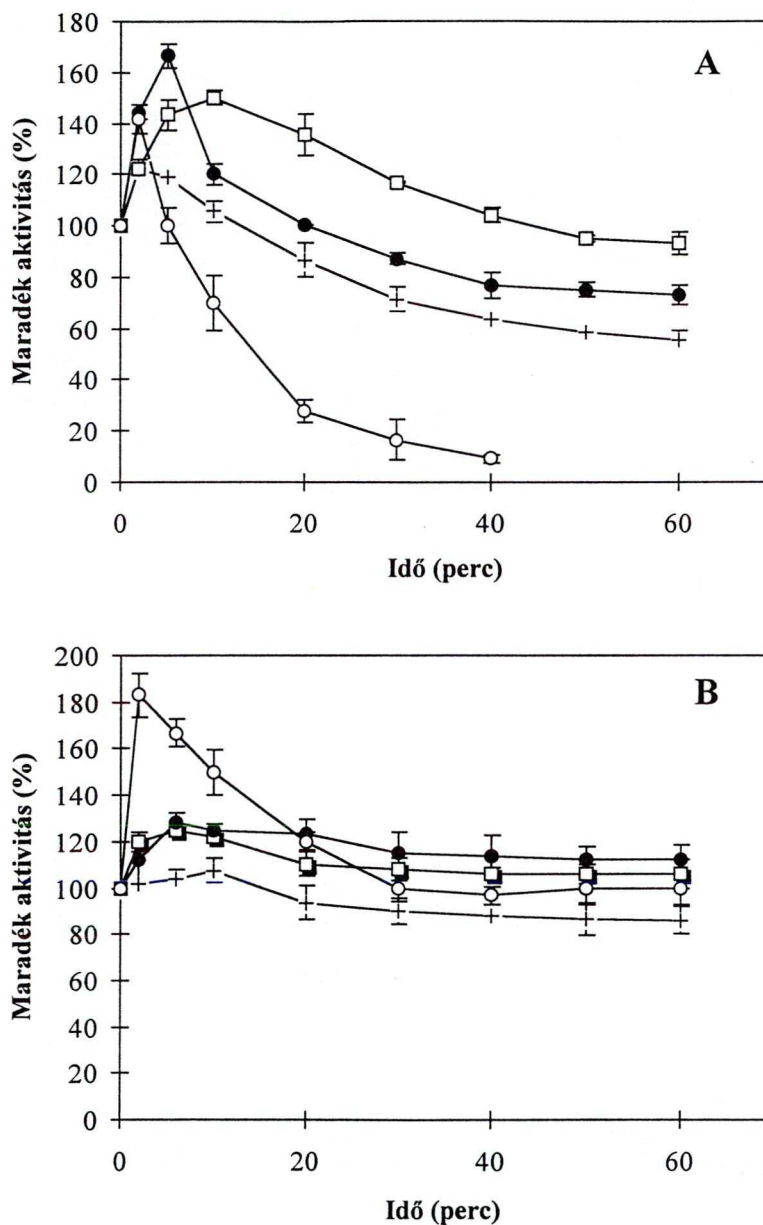
**13. ábra:** Az oldott (A), és a rögzített (B) CPA hőstabilitása. A kísérleteket 100 mM-os Tris/HCl pufferben (pH 7.5) hajtottuk végre. —+— : 45°C; —□— : 50°C; —●— : 55°C; —○— : 60°C.

#### 4.5.2. A hőinaktiválódás pH függése, a "pH stabilitás"

A karboxipeptidáz hőinaktiválódásának pH függését, az ún. pH stabilitást 50°C-on vizsgáltuk kálium-foszfát puffer (100 mM, pH 5.5-7.5), és Tris/HCl puffer (100 mM, pH 7.5-8.5) alkalmazásával. Mind az oldott, mind pedig a rögzített enzim esetében a kiindulási aktivitást vettük 100 %-nak, ami oldott enzimmél: 9.7 U/ml, rögzítetté: 1.4 U/ml volt. A két enzimforma stabilitása között a legszembevetőbb különbség pH 8.5-



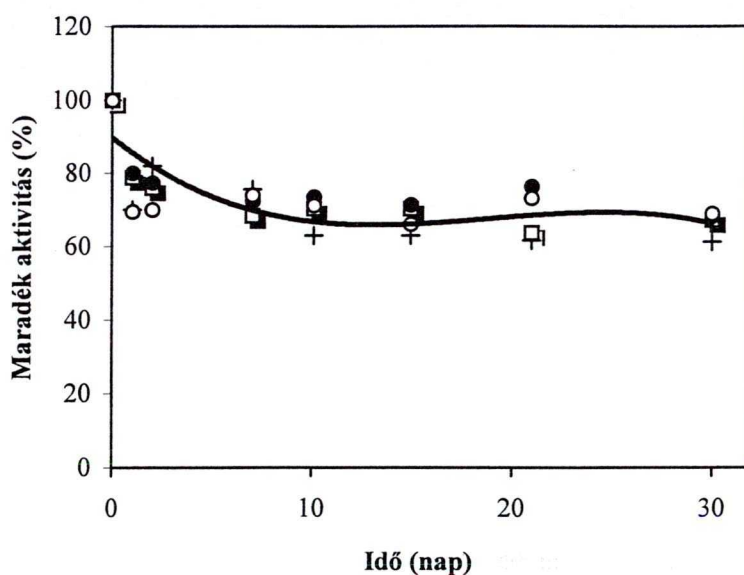
nél volt tapasztalható, ahol a rögzített enzim egy átmeneti aktiválódás után a teljes inkubálási idő alatt megőrizte eredeti aktivitását, ezalatt az oldott enzim 40 perces inkubálás alatt szinte teljesen elveszítette az aktivitását. A többi pH értéknél is a rögzített enzimforma bizonyult stabilabbnak (14. ábra).



**14. ábra:** Az oldott (A), és a rögzített (B) CPA hőinaktiválódásának pH függése. A kísérleteket 50°C-on, 100 mM-os K-foszfát pufferben (pH 5.5-7.5), és 100 mM-os Tris/HCl pufferben (pH 7.5-8.5) végeztük. — + — : pH 5.5; —□— : pH 6.5; —●— : pH 7.5; —○— : pH 8.5.

### 4.5.3. Tárolási stabilitás

Vizsgáltuk a rögzített enzimforma tárolhatóságát különböző pH értékeknél. A vizsgálathoz a következő puffereket használtuk fel: kálium-foszfát puffer (100 mM, pH 5.5-7.5), valamint Tris/HCl puffer (100 mM, pH 7.5-8.5). A tárolás hűtőszekrényben történt 4°C-on, az aktivitásméréseket 25°C-on végeztük el. A kiindulási aktivitást tekintettük 100 %-nak, amely 2.43 U/ml volt. Minden vizsgált pH-nál megállapítható, hogy az első 24 óra után egy jelentősebb aktivitásvesztés következett be (15. ábra), melynek során az enzim eredeti aktivitásának 20-30 %-át elveszítette. Ezt a lecsökkent aktivitást viszont a tárolás teljes ideje alatt (30 nap) közel azonos mértékben jól megőrizte, függetlenül a közeg pH-jától.

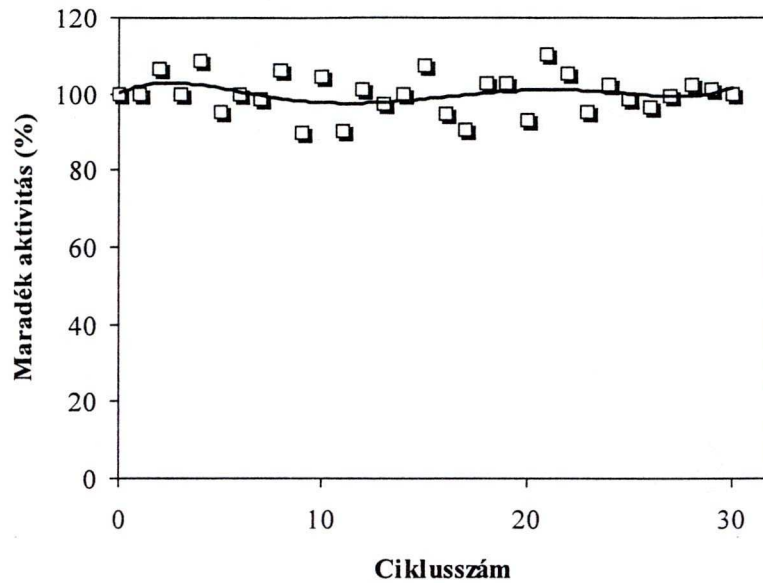


**15. ábra:** A rögzített CPA tárolási stabilitása különböző pH-n. Az alkalmazott pufferek 100mM K-foszfát puffer (pH 5.5-7.5), Tris/HCl puffer (pH 7.5-8.5). A tárolás 4°C-on történt. —+— : pH 5.5; —□— : pH 6.5; —●— : pH 7.5; —○— : pH 8.5.

### 4.5.4. A rögzített CPA működési stabilitásának vizsgálata

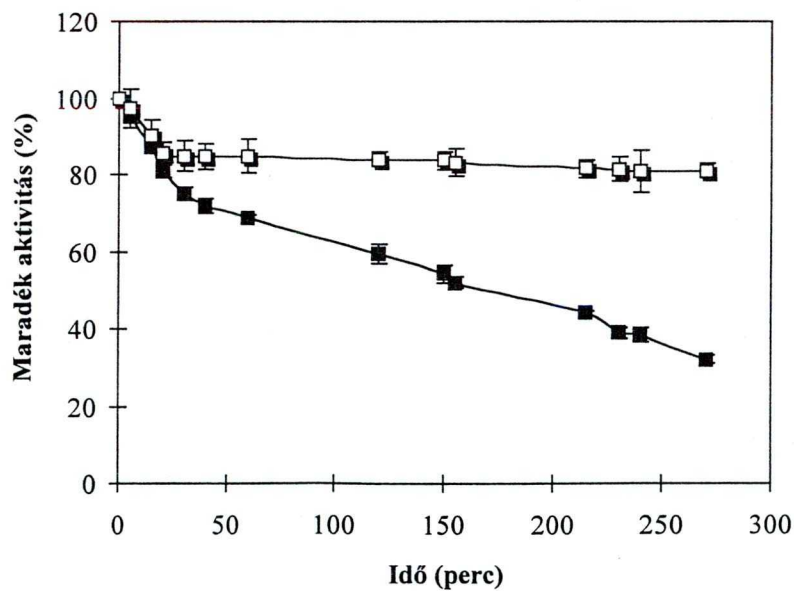
A rögzített enzimek egyik legfontosabb előnye az oldott formához képest a többszöri felhasználhatóság, s ennek megfelelően a bioreaktorokban való hatékony alkalmazhatóság. A rögzített Akrix C 100-CPA működési stabilitásának vizsgálatánál meghatároztuk 50 mg Akrix C 100-CPA aktivitását, majd a rögzített enzimet szűrés és Tris/HCl pufferes (50 mM; pH 7.5) mosás után újabb reakcióelegyben szuszpendáltuk, és mértük a maradék aktivitását.

Az Akrilex C 100-CPA kiindulási aktivitását (2.7 U/ml) vettük 100 %-nak. Az Akrilex C 100-CPA működési stabilitását mutatja a 16. ábra. Az Akrilex C 100-CPA az alkalmazott körülmények között igen stabil volt. A 30 ciklus alatt megőrizte kiindulási aktivitását.



**16. ábra:** Az Akrilex C 100-CPA működési stabilitása. A méréseket Tris/HCl puffer (50 mM; pH 7.5) alkalmazásával végeztük el 25°C-on.

#### 4.5.5. Ureával szembeni stabilitás



**17. ábra:** 4M urea hatása az oldott —■—, és a rögzített —□— CPA aktivitására. A kísérleteket 100 mM Tris/HCl pufferben (pH 7.5) végeztük 25°C-on.

Az urea hatását a karboxipeptidáz A stabilitására 4 M urea koncentráció mellett vizsgáltuk Tris/HCl pufferben (100 mM, pH 7.5), 25°C-on. Mindkét enzim esetében a kezeletlen minta aktivitását vettük 100 %-nak. Ez oldott enzimmél 6.67 U/ml, rögzítetténel 1.1 U/ml. A rögzítés jelentős mértékben megnövelte a CPA ureával szembeni stabilitását. 3 órás inkubálási idő után a rögzített enzim megőrizte eredeti aktivitásának 80 %-át, míg az oldott enzim aktivitása már csak 30 % volt (17. ábra).

#### 4.6. C-terminális aminosav meghatározás

A C-terminális aminosav analízist különböző peptidekkel (di-, és heptapeptid) végeztük el. Az 1 mg/ml peptidkoncentrációjú reakcióelegyet (5 ml) inkubáltuk az egyes enzimformákkal (2 U), és óránként mintát vettünk, hogy a C-terminális aminosav felszabadulás sebességét meghatározzuk. A Met-enkefalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-*Met*) kivételével valamennyi használt peptid C-terminális végén Leu, vagy pedig Phe volt. A peptidhasítást vékonyrétegekromatográfiával, és HPLC-vel követtük. Eredményeinket a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: A C-terminális aminosav lehasítás sebessége különböző CPA enzimformák felhasználásával

Karboxipeptidáz A formák	A C-terminális aminosav lehasítás sebessége (µg/h/ml)					
	Gly-Phe	Met-enkefalin	Leu-enkefalin	TIPP	TAPP	P7
Oldott karboxipeptidáz A	56.20	0.90	5.50	56.80	8.73	7.30
Akrilex C 100-CPA	51.70	1.50	3.00	19.80	23.60	2.95
p-benzokinonnal aktivált Akrilex P 100-CPA	0	0	0	0	50.30	0
Szilokróm aldehid-CPA	2.80	0	0	2.40	0.63	0
p-benzokinonnal aktivált Szilokróm-CPA	0	0	0	0.75	6.40	0
Sorsilen-CPA	2.60	0	0	0	0	0

A bontás sebessége függ a peptidektől, illetve az egyes peptidek esetében erősen függ az alkalmazott enzimformától. Az oldott karboxipeptidáz A valamennyi peptidet hasított, és itt kaptuk a legnagyobb hasítási sebességet is. A rögzített enzimformák

közül az Akrix C 100-CPA bizonyult a leghatékonyabbnak. A TAPP peptidet lényegesen nagyobb sebességgel hidrolizálta (23.6 µg/h/ml), mint az oldott enzim (8.73 µg/h/ml). A p-benzokinonnal aktivált Akrix P 100-CPA csak a TAPP-ot bontotta, viszont az oldotténál 5.8-szor nagyobb mértékben. A Szilokróm aldehid-CPA a Gly-Phe, a TIPP, és a TAPP peptidok C-terminális aminosavát hasította le, de kis sebességgel. A p-benzokinonnal aktivált Szilokróm hordozón rögzített enzim csak a TIPP és TAPP-ot hasította. Az utóbbinál a hidrolízis sebessége közel azonos volt az oldott enzimével. A Sorsilen-CPA csak a dipeptid hasítását végezte.

#### **4.7. A karboxipeptidáz A stabilitása szerves oldószerekben**

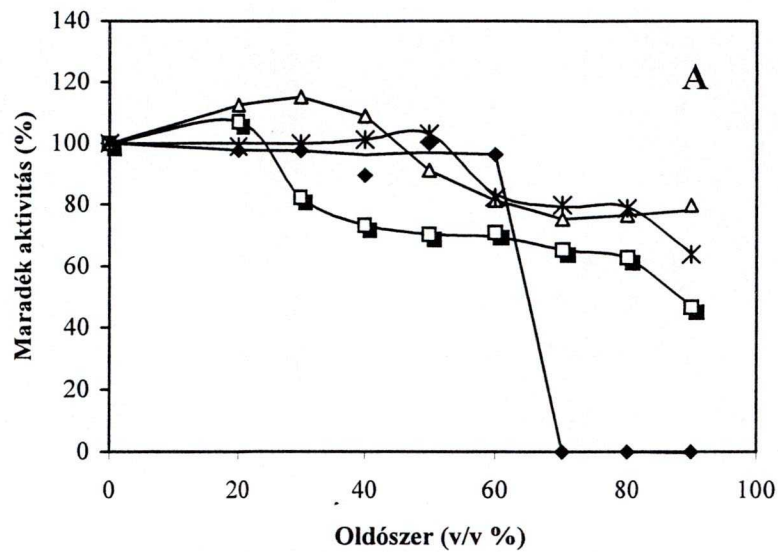
Az oldott, és a rögzített enzim szerves oldószerrel szemben mutatott stabilitását Tris/HCl pufferben (100 mM, pH 7.0) 20-90 % szerves oldószer jelenlétében mértük. A következő szerves oldószereket alkalmaztuk: Vízzel elegyedők: DMSO, 1,4-dioxán, acetonitril, etanol, vízzel nem, illetve korlátozottan elegyedők: etil-acetát, 1-butanol, és a toluol. Az inkubáló elegyek oldott enzimnél 2.33 U/ml, rögzítetténél pedig 1.52 U/ml enzimaktivitást tartalmaztak. A mintákat 25°C-on 0-120 perc inkubáltuk, intenzív kevertetés mellett, majd aliquotok vételével hippuril-L-fenilalanin szubsztrát használatával a standard módszer szerint határoztuk meg a maradék aktivitást.

##### **4.7.1. Szerves oldószerek hatása az oldott CPA aktivitására**

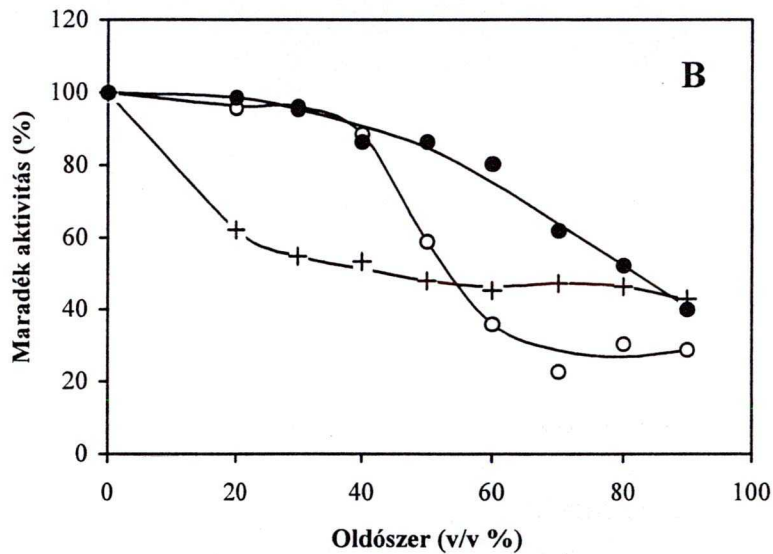
A 18. ábrán feltüntettük a szerves oldószerek hatását az oldott enzim aktivitására 40 perc inkubálási idő elteltével. Az értékeket a kezdeti, 0 percben mért adatokra vonatkoztatva adtuk meg. A 18/A. ábrán látható, hogy a vízzel elegyedő oldószerek esetén az inkubálási elegy növekvő oldószertartalma csak kis mértékben, lényeges eltérések nélkül csökkentette az enzimaktivitást. Kivételt képez a DMSO, mely már 70 %-os koncentrációban inaktiválta az enzimet.

Vízzel nem elegyedő szerves oldószerekben az aktivitásvesztés jelentősebb volt (18/B.ábra). Míg az enzim etil-acetátban, és 1-butanolban 40 perces inkubálás után alacsonyabb oldószer koncentrációknál (20-30 %) szinte megtartotta kiindulási aktivitását, addig 20 % toluol jelenlétében már mintegy 40 %-os inaktiválódást tapasztaltunk. Az ennél magasabb koncentrációknál az aktivitásvesztés üteme lelassult, és az enzim 90 % toluolt tartalmazó közegben is rendelkezett kiindulási aktivitásának

közel 40 %-val.



◆ DMSO; □ Acetonitril; Δ Etanol; ✕ 1,4-Dioxán;



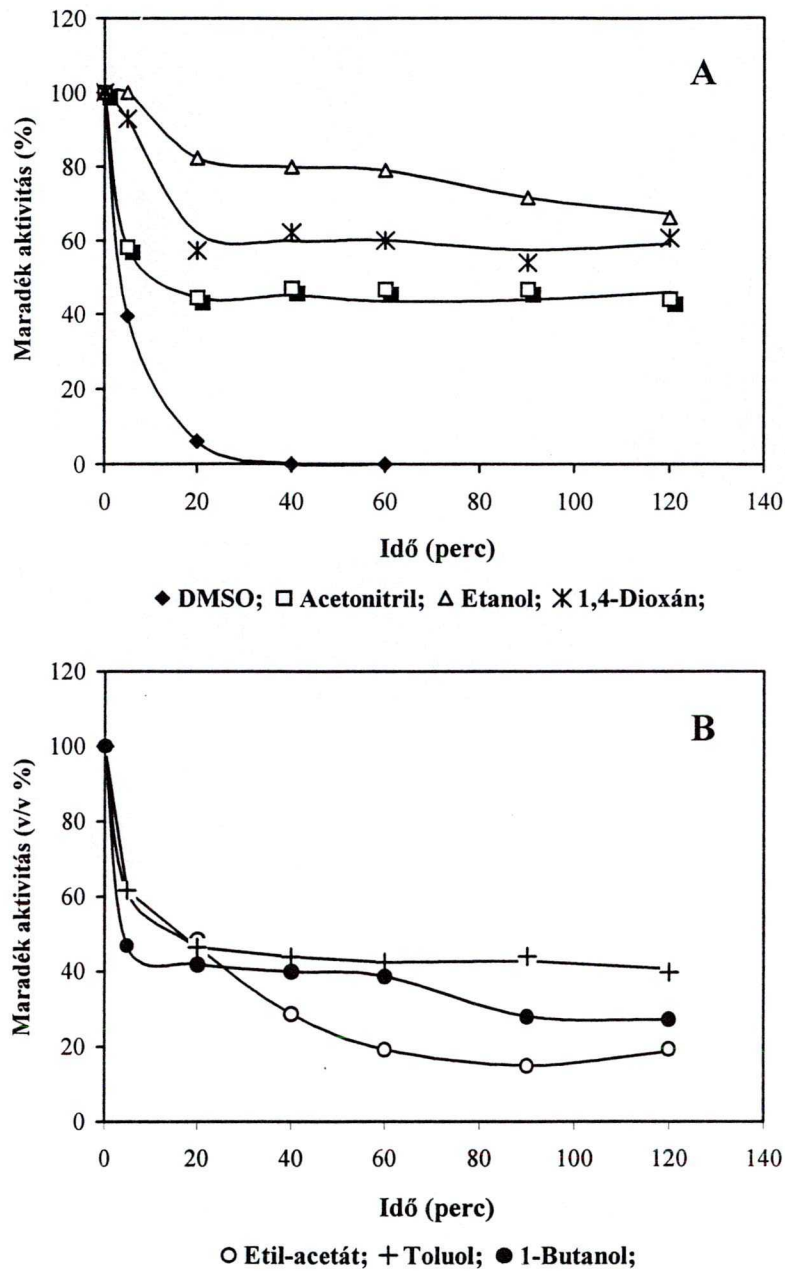
○ Etil-acetát; + Toluol; ● 1-Butanol;

**18. ábra:** Szerves oldószerek hatása az oldott karboxipeptidáz A aktivitására. (A) Vízzel elegyedő szerves oldószerek. (B) Vízzel nem elegyedő, ill. korlátozottan elegyedő szerves oldószerek. A kísérleteket 25 °C-on, 40 perces inkubálási idővel végeztük Tris/HCl pufferben (100 mM, pH 7.5).

#### 4.7.2. Különböző 90 v/v %-os szerves oldószerek hatása az oldott és a rögzített, Akrix C 100-CPA-ra

Az előző kísérletsorozatban különböző oldószer koncentrációk CPA aktivitására kifejtett hatását tanulmányoztuk, a továbbiakban 90 % oldószer koncentrációnál az

oldószerhatás időfüggését vizsgáltuk az oldott, és a rögzített enzimeknél.



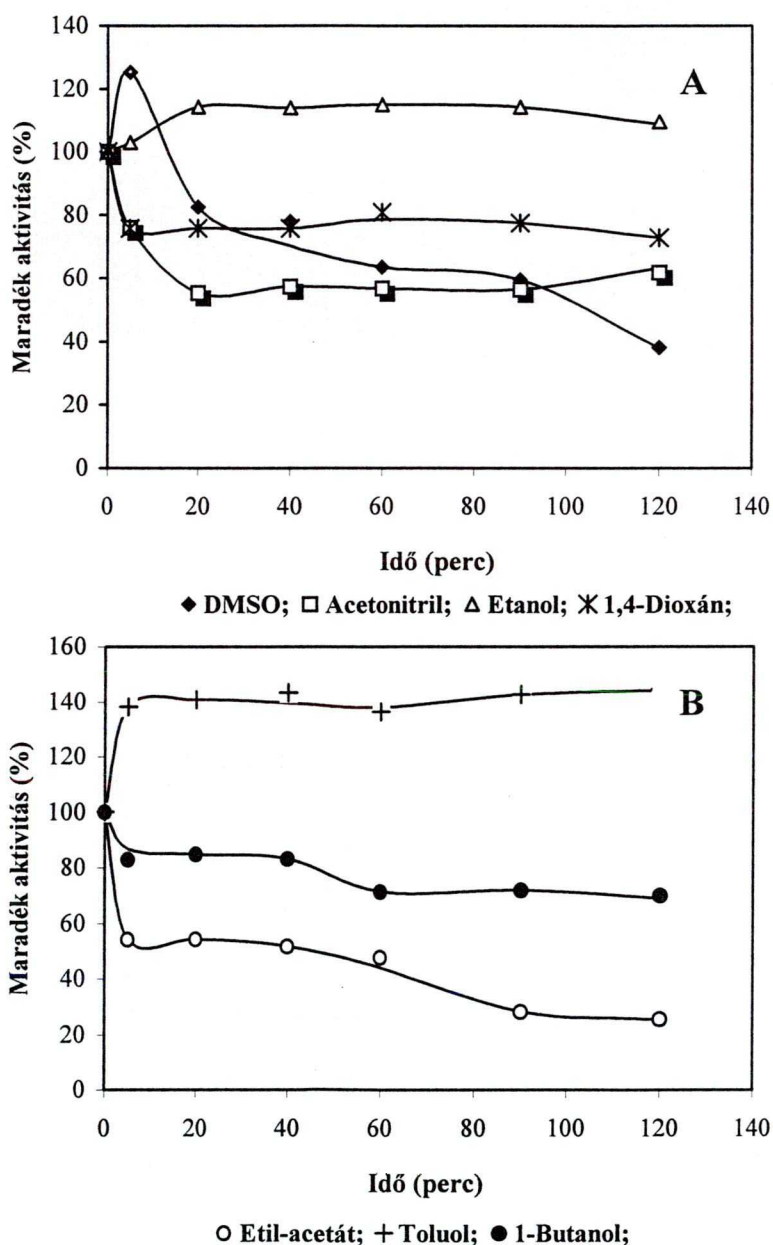
**19. ábra:** Szerves oldószerek hatása az oldott CPA aktivitására 90 %-os oldószer koncentrációknál. (A) Vízrel elegyedő szerves oldószerek. (B) Vízrel nem elegyedő szerves oldószerek. A kísérleteket 25°C-on végeztük, Tris/HCl pufferben (100 mM, pH 7.5).

A 19/A. ábrán látható, hogy az első 20 percben valamennyi oldószer esetében nagyobb aktivitásvesztést (20-55 %, a DMSO-nál 95 %) tapasztaltunk, melyet a továbbiakban csak kisebb változások követtek. A 120 perces inkubálás végén az enzim 90 % etanolban, és 1,4-dioxánban kiindulási aktivitásának még 65-60 %-val

rendelkezett. A DMSO 90 %-os jelenléte 30 perc alatt teljesen inaktíválta az enzimet.

A vízzel nem elegyedő oldószereknél hasonló változásokat tapasztaltunk (19/B. ábra). Itt azonban az oldószerek okozta jelentős inaktíválódás (40-57 %) már az első 5 percben megmutatkozott. Ezt követően az aktivitásvesztés ezekben a rendszerekben is lelassult.

Az alkalmazott szerves oldószerekben az Akrilex C 100-CPA stabilitása jelentős mértékben eltért az oldott enzimétől, (20/A. ábra). A vízzel elegyedő oldószerek esetén az etanolnál kismértékű (9-15 %-os) aktiválódást tapasztaltunk, amely a teljes inkubálás



**20. ábra:** Szerves oldószerek hatása a rögzített Akrilex C 100-CPA aktivitására 90 %-os oldószer koncentrációnál. (A) Vízzel elegyedő szerves oldószerek, (B) vízzel nem elegyedő szerves oldószerek. A kísérleteket 25°C-on végeztük, Tris/HCl pufferben (100 mM, pH 7.5).



alatt megmaradt. Meglepetésünkre aktiválódott a rögzített enzim a 90 %-os DMSO-ban is, ez utóbbi azonban csak egy rövid idejű átmeneti változás volt, melyet inaktiválódás követett, s a 2 órás inkubálás végén az Akrilex C 100-CPA kiindulási aktivitásának 38 %-val rendelkezett. Az 1,4-dioxán, és az acetonitril a rögzített enzim aktivitását 5 perces inkubálás után 76 %-ára csökkentette, ez az érték az 1,4-dioxán esetén stabilan megmaradt a teljes inkubációs periódus alatt, acetonitrilben pedig kis mértékben csökkent (61.53 %-ra).

Vízzel nem elegyedő szerves oldószereknél, 20/B.ábra, az etil-acetát esetében jelentős inaktiválódást észleltünk, a 120 perces inkubálás végéig a rögzített enzim kiindulási aktivitásából mintegy 75 %-ot veszített. 1-Butanol 90 %-os jelenléte a rögzített enzimmél lassú inaktiválódást eredményezett, ugyanakkor az Akrilex C 100-CPA az inkubálás végén is rendelkezett kiindulási aktivitásának 70.1 %-val. A toluol jelenléte jelentősen, 40-44 %-kal aktiválta a rögzített enzimet, s ez a megnövekedett aktivitás meg is maradt az inkubálás 120 perce alatt.

Az oldott, és a rögzített CPA-ra kapott értékeket összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy az Akrilex C 100-CPA valamennyi oldószerben stabilabb volt, mint az oldott enzim. Ezt a megállapítást leglátványosabban a két enzimforma DMSO-ban, és toluolban mutatott viselkedése támasztja alá.

#### **4.8. Dipeptidszintézis**

A stabilizálási kísérletek eredményei alapján feladatul tűztük ki a CPA-val megvalósítható szintetikus reakciók vizsgálatát. Először a dipeptidszintézis lehetőségét tanulmányoztuk. Tekintettel arra a tényre, hogy a peptidkötés hidrolízisének a CPA a peptid C-terminálisán az aromás (Phe, Tyr, Trp) illetve az elágazó láncot tartalmazó alifás aminosavakat (Ile, Leu) részesíti előnyben, a fordított irányú reakció megvalósításához is elsősorban ezeket az aminosavakat vizsgáltuk. Ahhoz, hogy a peptidszintézis maximális konverzióval történjen, a reakció körülményeit optimalizáltuk.

##### **4.8.1. A dipeptidszintézis szerves oldószer függése**

A dipeptidszintézis szerves oldószer függését 8 %-os víztartalmú reakcióelegyben, pH 5.5-ön, 30°C-on végeztük. A mintákat 24 órán keresztül

inkubáltuk. A szerves oldószerek a következők voltak: 1,4-dioxán, metanol, acetonitril, etanol, aceton, (vízzel elegyedők), etil-acetát, 1-butanol, és toluol (vízzel nem, ill. korlátozottan elegyedők). Eredményeinket az 5. táblázat tartalmazza.

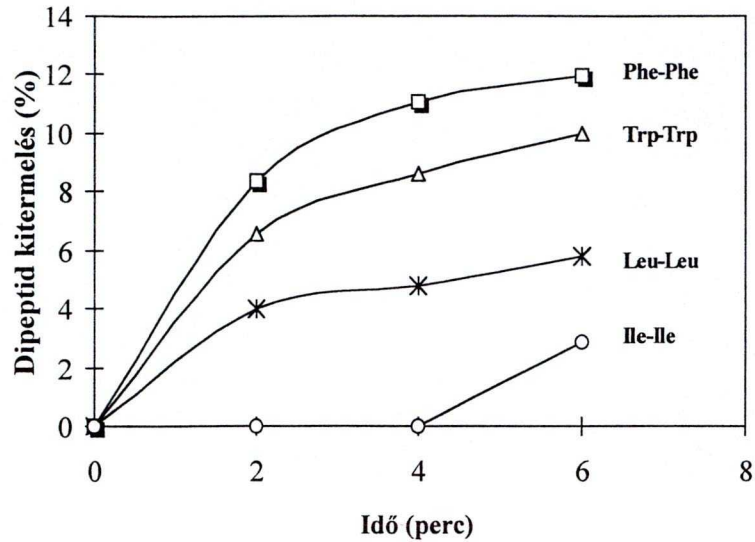
**5. táblázat:** A Phe-Phe dipeptidszintézis különböző szerves oldószerekben

Oldószer	log P	Phe-Phe kitermelés (%)
Toluol	2.5	0
1-Butanol	0.8	6.53
Etil-acetát	0.68	14.72
Aceton	-0.23	3.30
Etanol	-0.24	7.82
Acetonitril	-0.33	26.80
Metanol	-0.76	9.62
1,4-Dioxán	-1.1	2.46

A legnagyobb kitermelést, 26.8 %-ot acetonitrilben sikerült elérni, az enzim a vízzel nem elegyedő oldószerek közül az etil-acetát tűnt a leghatékonyabbnak 14.72 %-os kitermeléssel. Meglepetésünkre a toluolban nem képződött dipeptid. A táblázatban feltüntettük az egyes oldószerek log P értékeit is, azonban a szintézis mértéke, és a log P értékek között nem találtunk korrelációt.

#### 4.8.2. Különböző dipeptidek szintézise

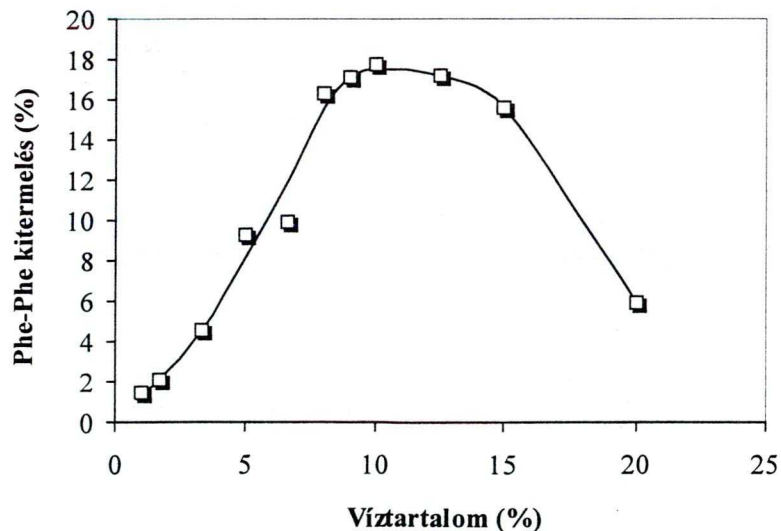
A különböző dipeptidek szintézisét L-Phe, L-Tyr, L-Trp, L-Ile, és L-Leu aminosavakkal külön-külön valósítottuk meg. Az aminosavak 2.5, és 5 mM koncentrációban voltak jelen reakcióelegyekben. A szintézist acetonitrilben 10 %-os víztartalom, és 5.5-ös pH mellett 6 órás inkubálási idővel 30°C-on kiviteleztek. Az 5 mM-os koncentrációnál elért eredményeket a 21. ábra mutatja. A legnagyobb dipeptid kitermelést, 12 %-ot az L-Phe esetében sikerült elérni. Jelentős azonban az L-Trp szubsztrát alkalmazásával elért 10 %-os kitermelés is. A 6 órás inkubálási idő alatt Tyr-Tyr képződést nem észleltünk. További kísérleteinkben a Phe-Phe szintézis körülményeit vizsgáltuk.



**21. ábra:** Dipeptidok szintézise CPA-val különböző aminosavakból. A 10 %-os víztartalmú reakcióelegyek pufferelt (pH 5.5) acetonitril, 5 mM-os koncentrációban az egyes aminosavakat, és 2 mg/ml enzimet tartalmaztak. Az elegyeket 30 °C-on inkubáltuk 6 órán keresztül 10 %-os víztartalom, és állandó kevertetés mellett.

#### 4.8.3. A Phe-Phe szintézis függése a reakcióelegy víztartalmától

A víznek kitüntetett szerepe van a szerves oldószeres enzimikus szintéziseknél. Fontos egyrészt az enzim aktív konformációjának fenntartása szempontjából, másrészt a reakció lefolyásában.

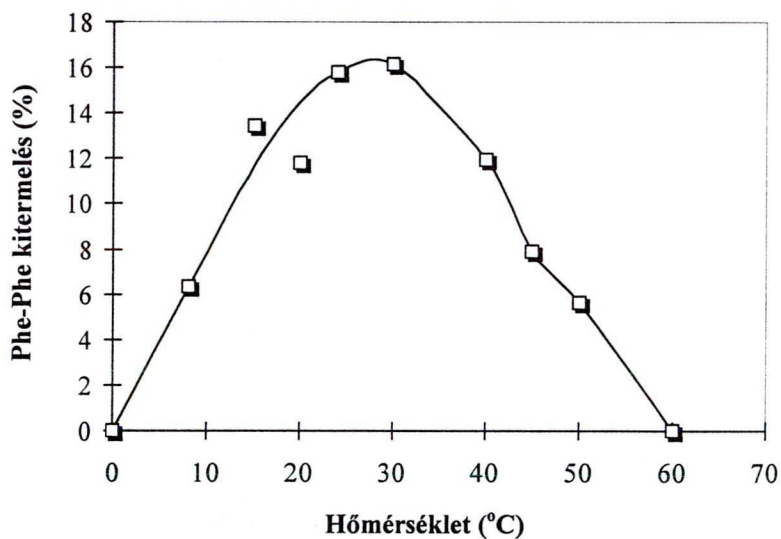


**22. ábra:** A Phe-Phe szintézis különböző víztartalmú reakcióelegyekben. A kísérleteket acetonitrilben, 6 órás reakcióidővel 30°C-on végeztük.

A víz szerepét a peptidszintézisben acetonitrilben vizsgáltuk 30°C-on, pH 5.5-ön, 6 h inkubálási idővel. A rendszer víztartalmát 1-20 % között változtattuk (22. ábra). A legnagyobb kitermelést 10 %-os víztartalomnál mértük (17.6 %). A haranggörbe érdekessége a viszonylag széles plató, 8-14 % víztartalom között, ahol a kitermelés szinte alig változik.

#### 4.8.4. A Phe-Phe szintézis hőmérséklet függése

A peptidszintézis hőmérséklet függését 0-60°C-os hőmérsékleti tartományban, pH 5.5-n 6 h inkubálási idővel 10 %-os víztartalomnál vizsgáltuk acetonitrilben. Eredményeinket a 23. ábrán foglaltuk össze. A dipeptidszintézis számára a legoptimálisabb hőmérsékleti tartomány 25-30°C.

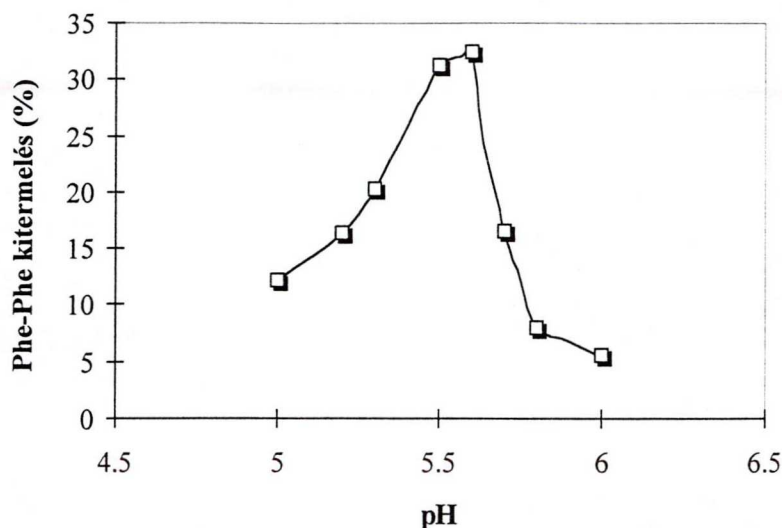


**23. ábra:** A Phe-Phe szintézis hőmérséklet függése. A reakciókat acetonitrilben, 10 %-os víztartalom mellett, 0-60 °C-on végeztük kevertetéssel.

#### 4.8.5. A dipeptidszintézis pH függése

A dipeptidszintézis pH függésének meghatározását a következő 50 mM-os pufferekben végeztük el: nátrium-acetát/NaOH puffer pH 5-5.6; kálium-foszfát-puffer pH 5.8-8; trietanol-amin/HCl puffer pH 7-8; Tris/HCl puffer pH 7-9. A reakcióelegyeket 30°C-on, 10 %-os víztartalommal acetonitrilben 6 h-n keresztül a megfelelő puffer jelenlétében inkubáltuk. Eredményeinek a 24. ábra mutatja. Megállapíthatjuk, hogy a dipeptidszintézis igen erősen pH függő, a legnagyobb

átalakulást, 32-33 %-ot pH 5.6-nál értük el.



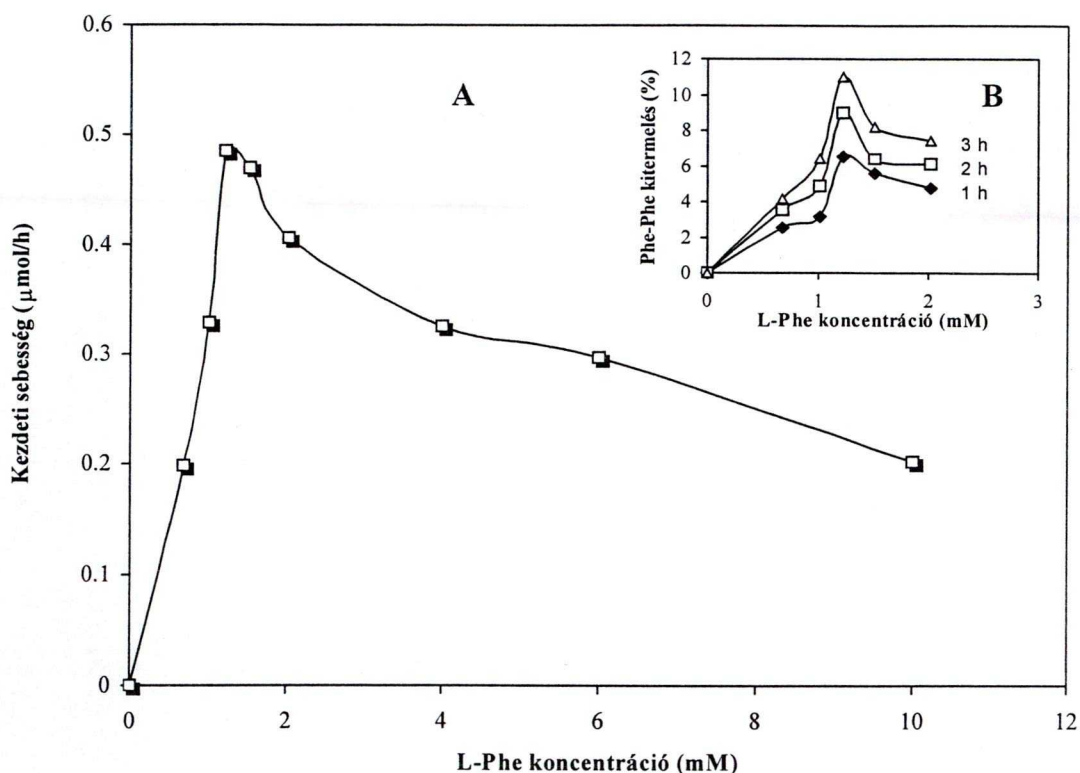
**24. ábra:** A Phe-Phe szintézis pH függése. A kísérleteket acetonitrilben, 10 %-os víztartalom mellett, 30 °C-on, 6 órás inkubálási idővel végeztük.

#### 4.8.6. A szubsztrátkoncentráció hatása a dipeptidszintézisre

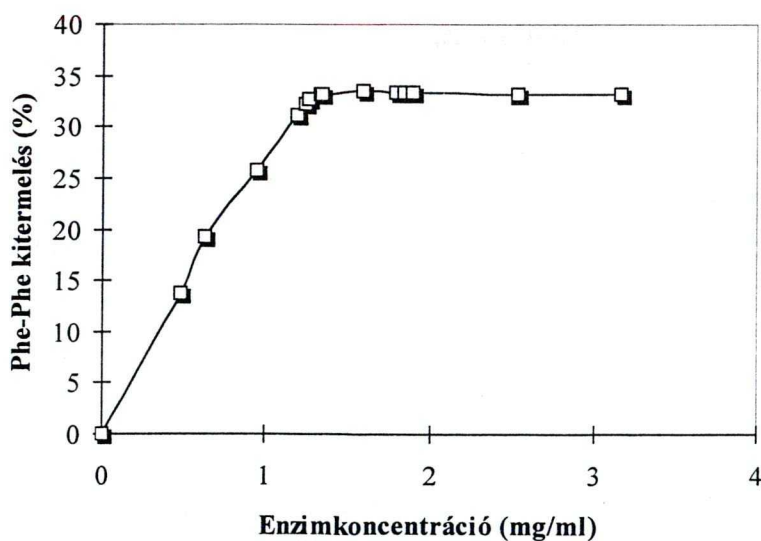
A szubsztrát, az L-Phe koncentrációját 0.67-10.0 mM között változtatva az optimalizálási kísérletek során megállapított paraméterek felhasználásával (10 %-os víztartalom 30°C, pH 5.5), 6 óra inkubálási idővel acetonitrilben végeztük a kísérleteket. Legnagyobb kitermelést 1.2 mM L-Phe koncentrációnál kaptunk. Magasabb koncentráció értékeknél a peptidszintézis gátolt (25. ábra).

#### 4.8.7. Az enzimkoncentráció hatása a dipeptidszintézisre

A reakciót acetonitrilben 30°C-on pH 5.5-nél 6 órás inkubálási idővel hajtottuk végre. Az elegy víztartalma 10 % volt, és 1.2 mM L-Phe koncentráció mellett az enzimkoncentrációt 0.5-3.5 mg/ml (7.6-53.2 U) között változtattuk (26. ábra). A legjobb kitermelést 1.4 mg/ml enzimkoncentrációnál, 21.3 U enzim hozzáadásával értük el.



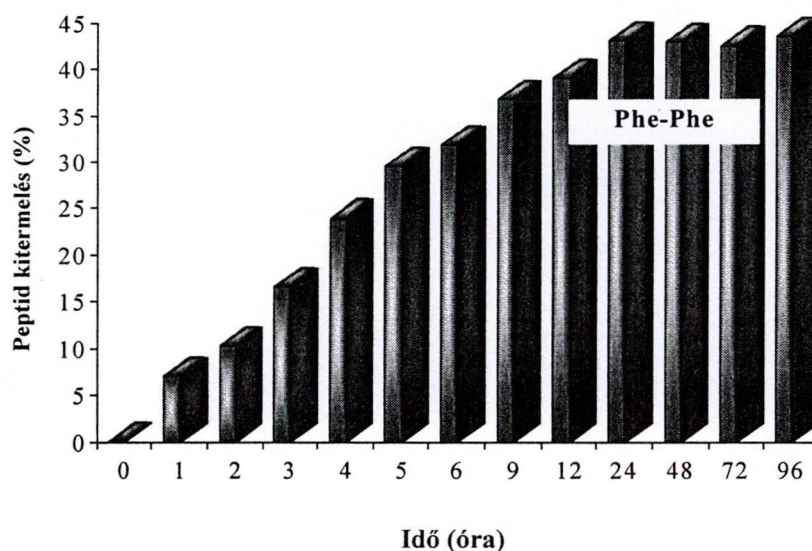
**25. ábra:** A dipeptidszintézis változása az L-Phe koncentráció függvényében. A reakciót pufferelt acetonitrilben, 5.5-ös pH alkalmazásával, 30 °C-on hajtottuk végre. A reakcióelegy 10 % vizet tartalmazott. Az (A) ábrán a kezdeti sebességeket ábráztuk az L-Phe koncentráció függvényében, a (B) ábra az 1-3 órás inkubálás során kapott Phe-Phe kitermelést mutatja ugyancsak az L-Phe koncentráció függvényében.



**26. ábra:** A Phe-Phe szintézis enzimkoncentráció függése. A reakciót közege acetonitril volt, 30°C-on, pH 5.5-ön az L-Phe-t 1.2 mM koncentrációban alkalmaztuk.

#### 4.8.8. Dipeptidszintézis optimalizált körülmények között

A dipeptidszintézis meghatározott optimális körülményei között (30°C, pH 5.5; 10 % víztartalom) 1.2 mM szubsztrátkoncentráció, és 2 mg/ml karboxipeptidáz A koncentráció alkalmazása mellett reakcióelegyünket 96 óráig inkubáltuk, és folyamatos mintavétellel követtük a peptidszintézist. 24 órás inkubálás után 43 %-os volt a kitermelés, és nem tapasztaltunk jelentős Phe-Phe szint növekedést a további inkubálás során (27. ábra).



**27. ábra:** Dipeptidszintézis optimalizált körülmények között (30°C, pH 5.5; 10 % víztartalom). Az L-Phe 1.2 mM, a CPA koncentráció 2 mg/ml volt.

#### 4.8.9. Dipeptidszintézis rögzített CPA-val

Négy rögzített enzimformát, az Akrilex C100-CPA-t, valamint ennek liofilizált alakját, a p-benzokinonnal aktivált Akrilex P 100-CPA-t, a Szilokróm aldehid-CPA-t, és p-benzokinonnal aktivált Szilokróm-CPA-t használtuk ezekhez a kísérletekhez. Az egyes rögzített enzimeket az oldott enzimes mérések alapján megállapított optimális körülmények között: pufferelt (50 mM-os pH 5.5-ös kálium-foszfát puffer) acetonitril, 10 %-os víztartalom, 30°C, intenzív kevertetés (450 rpm), inkubáltuk 96 órát. A reakciókat minden esetben 20-25 U enzimaktivitás hozzáadásával indítottuk. Kísérleti eredményeinket a 6. táblázatba foglaltuk össze.

**6. táblázat:** Phe-Phe szintézis különböző rögzített enzimformák felhasználásával

Karboxipeptidáz A formák	Phe-Phe kitermelés (%)	Maradék aktivitás (%) (96 h inkubálás után)
Oldott karboxipeptidáz A	43.0	15.0
Akrilex C 100-CPA	8.4	64.3
Akrilex C 100-CPA (liofilizált enzim-hordozó)	13.5	83.0
p-benzokinonnal aktivált Akrilex P 100-CPA	5.6	46.0
Szilokróm aldehid-CPA	0	72.0
p-benzokinonnal aktivált Szilokróm-CPA	4.2	51.2

A rögzített enzimformák közül a liofilizált Akrilex C 100-CPA-nál 13.5 %-os kitermelést tapasztaltuk. Szilokróm aldehid-CPA alkalmazása esetén nem szintetizálódott Phe-Phe. A táblázat adataiból kitűnik, hogy rögzített CPA-k alkalmazásával a Phe-Phe kitermelés alacsonyabb, mint az oldott enzimmél elért érték, viszont a rögzített enzimformák lényegesen stabilabbak voltak. A liofilizált Akrilex C 100-CPA 96 órás inkubálás után is rendelkezett eredeti aktivitásának 83 %-val.

Ez utóbbi enzimforma felhasználásával L-Trp, L-Tyr, L-Leu, és L-Ile szubsztrátokból történő peptidszintéziseknél nem tapasztalható lényeges specifitásbeli eltérés az oldott enzimhez képest.

Vizsgáltuk a liofilizált Akrilex C 100-CPA katalizálta Phe-Phe szintézist 1-butanol, etil-acetát, acetón, etanol, acetonitril, metanol, és 1,4-dioxán oldószerekben. A 7. táblázat adatai alapján megállapítható, hogy a vizsgált rögzített enzim számára is az acetonitril bizonyult a legmegfelelőbb szerves oldószernek. Etanolban és metanolban Phe-Phe képződést nem tapasztaltunk. Érdekes, hogy 1,4-dioxánban viszonylag magas ~5 %-os kitermelést értünk el, ami lényegesen felülmúlja az oldott enzimmél mért 2.46 %-os értéket.



**7. táblázat:** Dipeptidszintézis liofilizált Akrix C 100-CPA-val különböző szerves oldószerekben

Oldószer	Phe-Phe kitermelés (%)
1-Butanol	1.62
Etil-acetát	3.34
Aceton	2.43
Etanol	0
Acetonitril	13.5
Metanol	0
1,4-Dioxán	4.88

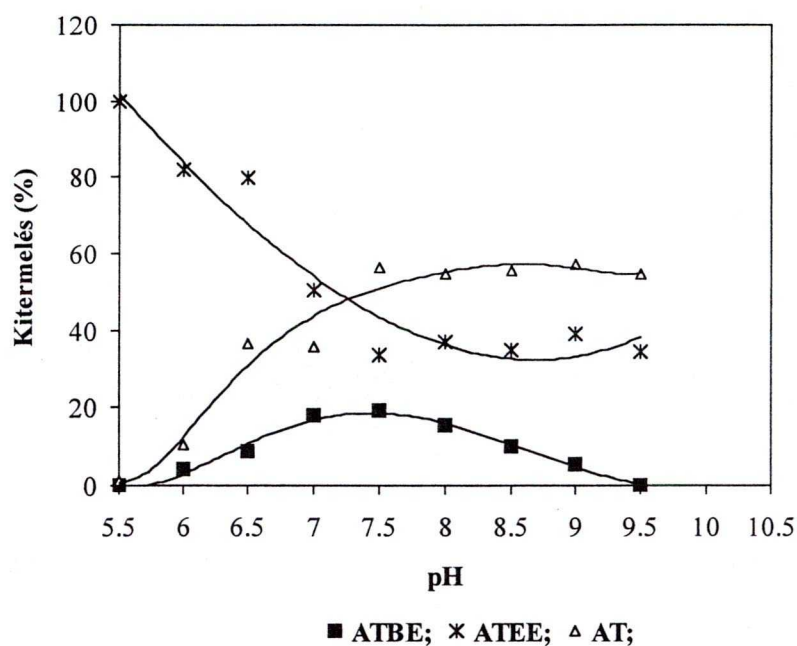
Az inkubálást 96 órán keresztül 10 % víztartalmú acetonitrilben, 1.2 mM L-Phe jelenlétében, 30°C-on, pH 5.5-ön végeztük.

#### 4.9. Átészteresítési, észteresítési reakció CPA-val

A CPA peptidáz aktivitása mellett észteráz aktivitással is rendelkezik. Miután a CPA nagy szerves oldószer koncentrációnál hidrolitikus aktivitásának „megfordításaként” képes volt kondenzációs reakcióban dipeptid szintézisére, tanulmányoztuk, hogy a szerves oldószeres közeg miként befolyásolja az enzim észteráz aktivitását. Szubsztrátként N-acetil-L-tirozint, és N-benzoil-L-fenilalanint valamint hippuril-L-fenilalanint alkalmaztunk. Metanollal, etanollal, propanollal, és 1-butanollal próbáltuk az észterképzést kivitelezni acetonitrilben, illetve a fenti oldószerekben ezek szubsztrátként és közegként való alkalmazásával. A reakcióelegy pH-ját 4-11 között, víztartalmát 5-15 % között 30°C-on változtatva, 1-4 mg/ml szubsztrát, és 2 mg/ml enzimkoncentráció mellett nem tudtunk kimutatni átalakulást. Sikerrel jártunk viszont az átészteresítési kísérletekben.

Az átészteresítési reakcióban használt reakcióelegyünk közege, és egyben az átészteresítési reakció szubsztrátja az 1-butanol volt. A másik szubsztrátot az N-védett aromás aminosav-észter származékot, N-acetil-L-tirozil etil észtert (ATEE), 2 mg/ml koncentrációban alkalmaztuk. Kiindulási reakcióelegyünk 10 % víztartalommal rendelkezett, az alkalmazott pH tartomány 5.5-10.5 A felhasznált pufferek a következők voltak: 100 mM kálium-foszfát puffer (pH 5.5-7.5); 100 mM Tris/HCl puffer (pH 7.5-9.5); 100 mM glicin/NaOH puffer (pH 9.0-10.5). A reakciókat mintegy 72 µl enzim, mintegy 19 U aktivitás hozzáadásával indítottuk. Azt tapasztaltuk, hogy a reakció a

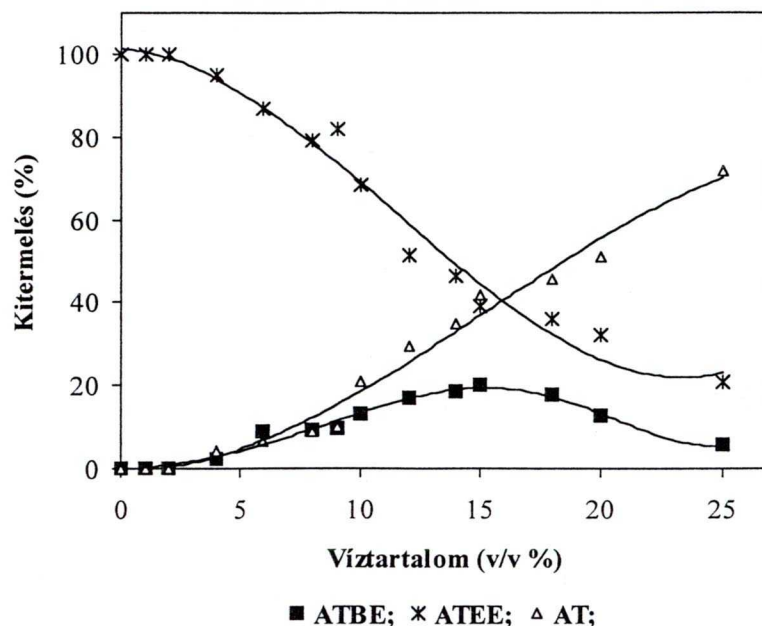
dipeptidszintézis optimális pH-jához képest magasabb, 7.5-ös pH-n megy végbe. A folyamat során azonban egyensúlyi rendszer jött létre. Az átészterésítés termékéhez, az N-acetil-L-tirozil-butil (19.1 %) észterhez képest közel 3-szoros mennyiségben (56 %) keletkezett a hidrolízis terméke, az N-acetil-L-tirozin (28. ábra).



**28. ábra:** Az ATEE átészterésítése 1-butanollal a CPA-val katalizált reakcióban, különböző pH-nál. A reakcióelegyetek 10 %-os víztartalommal 30°C-on 48 óráig inkubáltuk. Az elegyekben az ATEE koncentrációja 2 mg/ml volt.

A dipeptidszintézishez szükséges optimális vízmennyiséget, 10 %-os víztartalmú reakcióelegyet alkalmaztunk az átészterésítés pH függésének vizsgálatakor is. Tekintettel a víz aktív konformáció fenntartásában, és a katalitikus reakcióban betöltött fontos szerepére, feltételeztük, hogy rendszerünk víztartalmának változtatásával az átészterésítés során tapasztalt egyensúlyt befolyásolni tudjuk, nagyobb mennyiségű átészterésített termék képződése, és a hidrolízis visszaszorítása irányába.

A rendszer víztartalmának csökkentésével azonban mind a hidrolízis, mind pedig az átészterésítés kitermelése jelentős mértékben visszaszorult (29. ábra). Az N-védett aminosav származékok felhasználásával, CPA enzimmel katalizált átészterésítési reakciót a továbbiakban nem vizsgáltuk, mivel a körülmények változtatásával a hidrolízist nem sikerült visszaszorítani.



**29. ábra:** Az ATEE átészteresítése 1-butanollal a CPA katalizálta reakcióban. A víztartalmat 1-25 %-os tartományban változtattuk, az alkalmazott pH 7.5, az ATEE koncentrációja 2 mg/ml, a reakcióközegként, és szubsztrátként használt szerves oldószer az 1-butanol volt. A reakcióelegyeket 30°C-on 48 órán keresztül inkubáltuk.

#### 4.10. N-acil (N-védett) L-aminosavak szintézise CPA-val

Az N-acil aminosav származékok szintéziséhez L-aminosav szubsztrátként az L-Phe-t használtuk 5 mM koncentrációban. Acilező komponensként aromás, ill. nyílt láncú (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) karbonsavat alkalmaztunk 10 mM-os koncentrációban. A reakcióelegy víztartalma 10 %, pH-ja 7.0 volt. A reakciókat 72 µl enzimszuszpenzió (19 U) hozzáadásával indítottuk, majd 30°C-on kevertetés (450 rpm) mellett 48 órán keresztül inkubáltuk.

Tekintettel az acilezési reakció termékének az N-védett aminosav származékoknak a szerves szintézisekben betöltött kitüntetett szerepére, fontosnak találtuk ezen „prekurzorok” szintézis körülményeinek optimalizálását is.

##### 4.10.1. Aminosavak N-acilezése különböző szerves savakkal

Különböző N-acil aminosavak szintéziséhez választott szerves közegünk 10 % vizet tartalmazó acetonitril volt. A kísérleteket pH 7.0-n, 30°C-on kevertetve (450 rpm)

48 órás inkubálási idővel végeztük. Aminosav szubsztrátként L-Phe-t használtunk. Az acil-donor szerepét nyíltláncú karbonsavak (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), benzoosav, fenil-ecetsav, valamint hippursav (N-benzoil-glicin) töltötték be. Eredményeinket a 8. táblázat tartalmazza.

**8.táblázat: N-acil-L-Phe szintézis CPA-val**

Acil donor	Kitermelés (%)
Hangyasav	2.07
Ecetsav	0.85
Propionsav	1.23
Vajsav	1.48
Valeriánsav	2.52
Benzoosav	14.60
Fenil-ecetsav	0.67
Hippursav	15.10

15.1 % kitermelést a hippursav, 14.6 %-ot a benzoosav acil donorként való alkalmazásával értünk el. Gyakorlati jelentőségére való tekintettel a további kísérletekhez a benzoosavat használtuk szubsztrátként.

Kísérleteket végeztünk más aminosavak, L-Tyr, L-Trp, L-Ile, L-Leu, és benzoosav felhasználásával is ezek azonban az N-benzoil-L-triptofán (7.65 %) kivételével nem vezettek eredményre. Így a további kísérletekben az N-benzoil-L-Phe szintézisét tanulmányoztuk.

#### **4.10.2. Az N-benzoil-L-Phe szintézis szerves oldószer függése**

Az N-benzoil-L-Phe képződésének szerves oldószer függését a 9. táblázat adatai mutatják. A reakcióelegyek víztartalma 10 %, pH-ja 7.0, a benzoosav 10 mM, az L-Phe 5 mM-os koncentrációban volt jelen, az inkubálási idő 48 óra volt 30 °C-on.

A legnagyobb kitermelést 15.9 %-ot acetonitrilben értük el. A további kísérleteinket acetonitrilben végzetük. Nem tapasztaltunk N-benzoil-L-Phe képződést etil-acetát, etanol, és metanol oldószerekben. Az N-benzoil-L-Phe szintézis szerves oldószer függés profilja jelentősen eltér a Phe-Phe szintézisnél tapasztaltaktól.

**9. táblázat:** A CPA által katalizált N-benzoil-L-Phe szintézis szerves oldószer függése

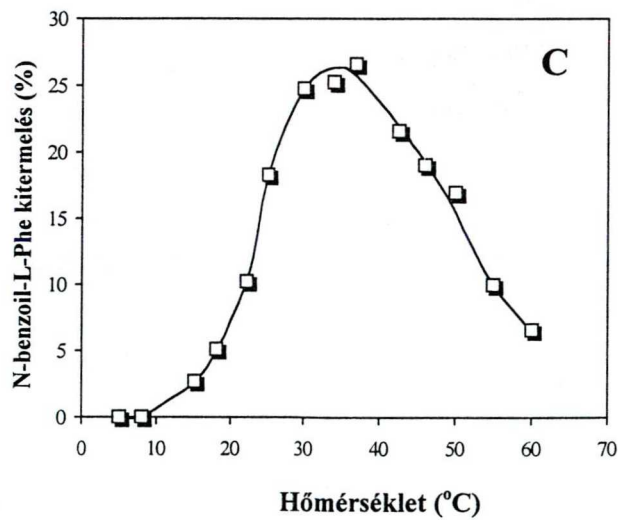
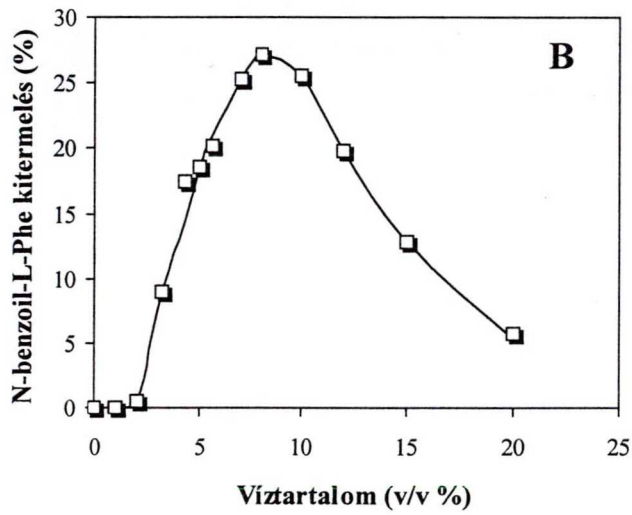
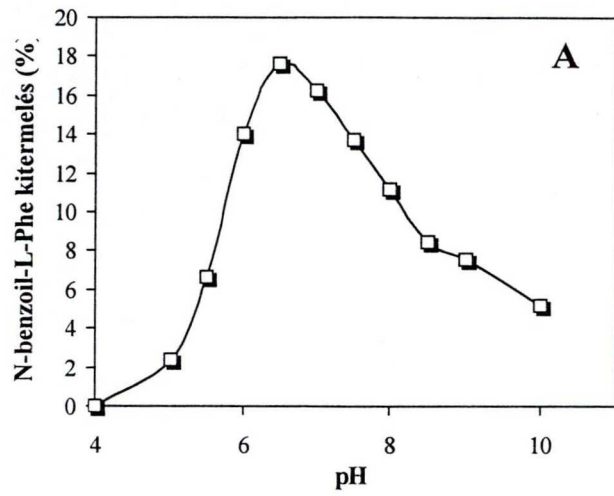
Oldószer	N-benzoil-L-Phe kitermelés (%)
1-Butanol	1.15
Etil-acetát	0
1-Propanol	0.70
Aceton	11.30
Etanol	0
Acetonitril	15.90
Metanol	0
1,4-Dioxán	6.29

A dipeptidszintézisnél a toluol kivételével valamennyi oldószerben tapasztaltunk Phe-Phe termelődést, míg az acilálási reakció során az etil acetát, az etanol, és a metanol alkalmazásával sem tudtunk N-benzoil-L-Phe szintézist kimutatni.

#### 4.10.3. A N-benzoil-L-Phe szintézis pH, víztartalom, és hőmérséklet függése

A szintézis optimális pH-ját 100 mM-os pufferek felhasználásával (nátrium-acetát/NaOH puffer pH 5-5.5; kálium-foszfát-puffer pH 5.5-7.5; trietanol-amin/HCl puffer pH 7-8.5; Tris/HCl puffer pH 8.5-9, és glicin/NaOH puffer 9-10) pH 5-10 tartományban határoztuk meg. A pH függés vizsgálatát 48 órás inkubálási idővel 10 %-os víztartalomnál vizsgáltuk acetonitrilben. Eredményeinket a 30/A. ábrán foglaltuk össze. A legnagyobb átalakulást 17.6 %-ot pH 6.5-ön értük el. A dipeptidszintézisnél tapasztaltakkal összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a görbe jellege más, az N-benzoilálásnál nincs olyan kifejezett pH függés.

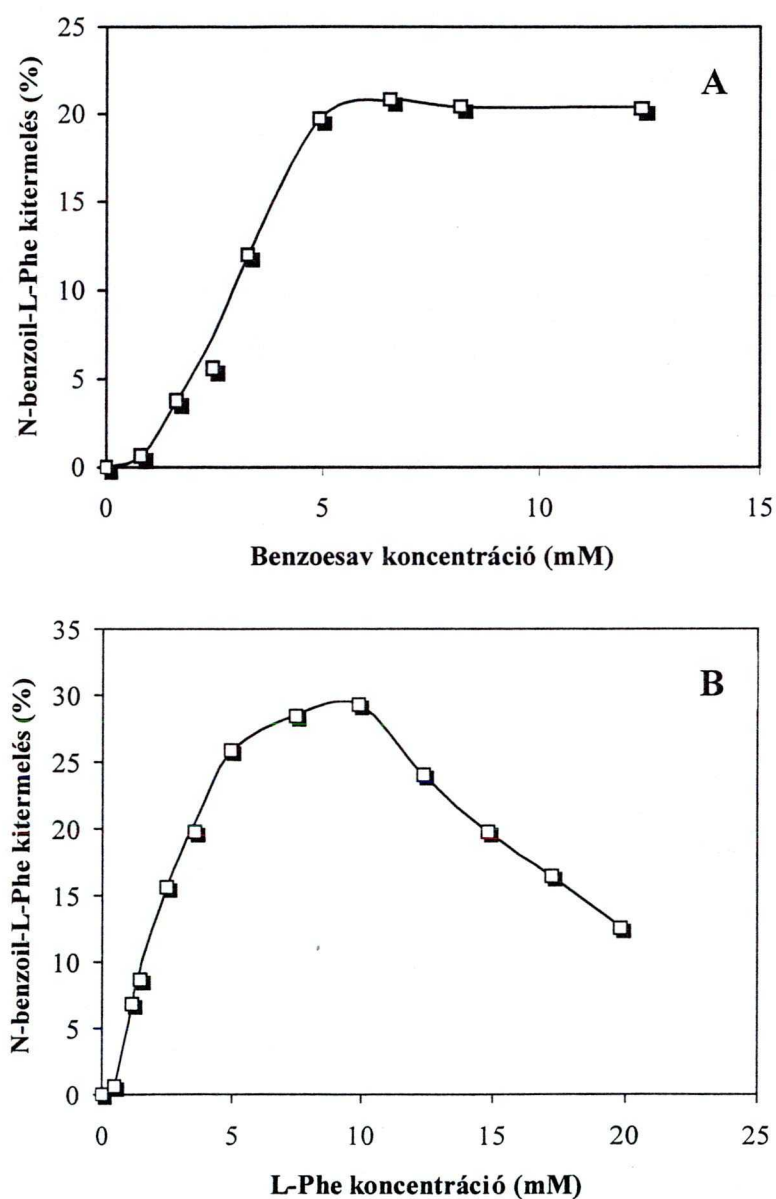
Az acilezési reakcióban a víz szerepét 30°C-on, pH 6.5-n 6 órás inkubálási idővel, a rendszer víztartalmát 1-20 % között változtatva vizsgáltuk. A legjobb kitermelést, 27 %-ot abban a reakcióelegyben értük el, melynek víztartalma 8 % volt (30/B. ábra). Ez a reakció érzékenyebben reagál a rendszer víztartalmának változására, mint a dipeptidszintézis.



**30. ábra:** A CPA-val katalizált N-benzoil-L-fenilalanin szintézis (A) pH, (B) víztartalom, (C) hőmérséklet függése. A kísérleteket acetonitrilben, 48 órás inkubálási idővel végeztük el.

A hőmérséklet függést 5-60°C-os hőmérsékleti tartományban, 8 %-os víztartalomnál pH 6.5-n 48 órás inkubálási idővel vizsgáltuk. Eredményeinket a 30/C. ábra tartalmazza. Az N-benzoil-L-Phe optimális hőmérséklete 30-37°C.

#### 4.10.4. A szubsztrátkoncentrációk (benzooesav; L-Phe) hatása a szintézisre



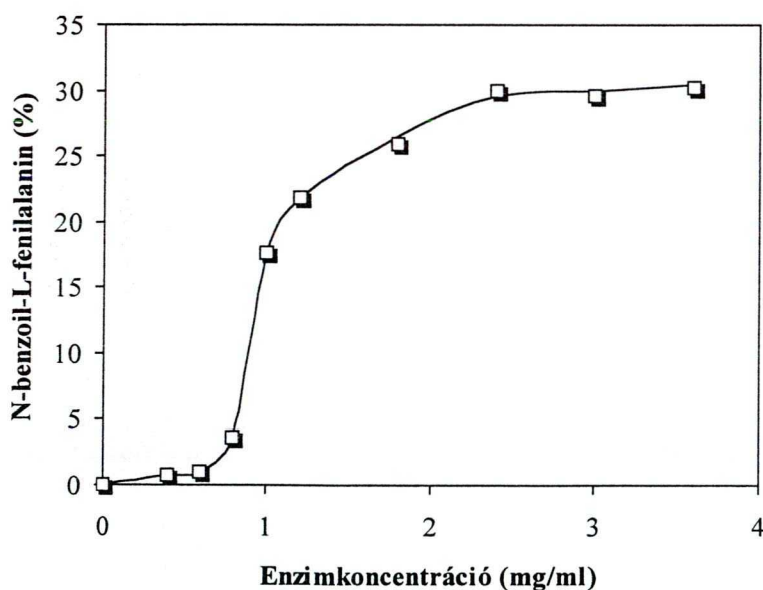
**31. ábra:** A szubsztrátkoncentrációk hatása a CPA által katalizált N-benzoil-L-Phe szintézisre. (A) A benzooesav koncentráció, (B) az L-Phe koncentráció hatása. A reakciót acetonitrilben 8 %-os víztartalom mellett, 37°C-on, 6.5-ös pH alkalmazásával végeztük. A reakcióidő 48 óra volt.

A benzoészav koncentrációját 0.8-12.3 mM között, az L-Phe koncentrációját koncentrációját 0.5-20.0 mM között változtattuk az egyes reakcióelegyekben 8 %-os víztartalom, pH 6.5, és 37°C inkubálási hőmérséklet alkalmazása mellett. Az 5 mM-os benzoészav koncentrációnál értük el a legnagyobb kitermelést 20 %-ot, a benzoészav koncentráció további emelésével ez az érték lényegesen nem változik a 48 órás inkubálás során (31/A. ábra).

Az N-benzoil-L-Phe szintézis L-Phe koncentráció függésének vizsgálatánál a 10 mM-os szubsztrátkoncentrációt találtuk a optimálisnak, ennél magasabb koncentrációban az L-Phe gátolja az enzim működését (31/B. ábra).

#### 4.10.5. Az enzimkoncentráció hatása az N-benzoil-L-Phe szintézisre

A reakciót 37°C-on pH 6.5-nél 48 órás inkubálási idővel hajtottuk végre. A reakcióelegy víztartalma 10 % volt. 10 mM L-Phe, és 5 mM benzoészav koncentrációk mellett az enzimkoncentrációt 0.4-3.6 mg/ml (6.4-57.73 U) között változtattuk (32. ábra). A legnagyobb kitermelést 2.4 mg/ml enzimkoncentrációnál, 38.5 U enzimaktivitás hozzáadásával értük el.

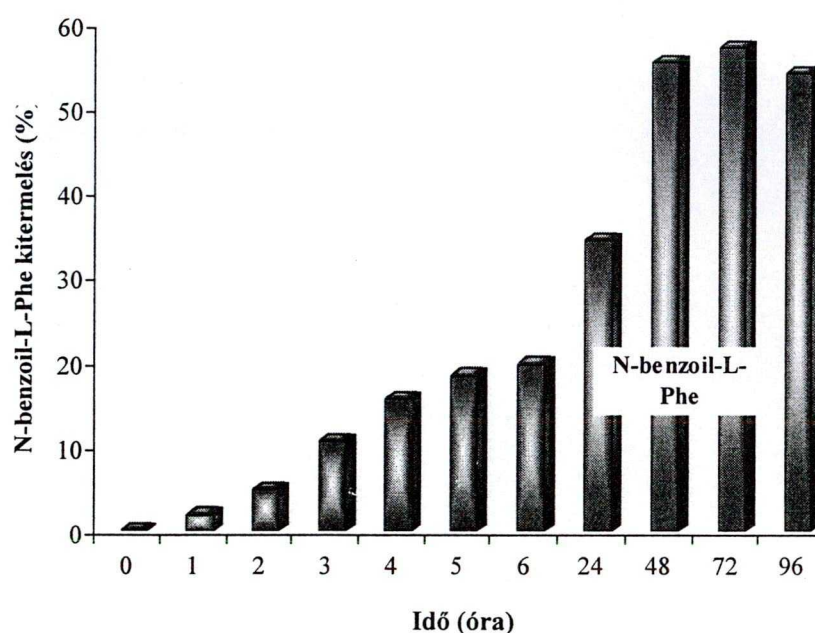


**32. ábra:** Az N-benzoil-L-Phe szintézis enzimkoncentráció függése. A reakciót 8 %-os víztartalommal, 37°C-on, pH 6.5-nél, 5 mM benzoészav, és 10 mM L-Phe koncentrációk alkalmazásával hajtottuk végre.



#### 4.10.6. N-benzoil-L-Phe szintézise CPA-val optimalizált körülmények között

A szintézis optimális körülményeinek (37°C, pH 6.5; 8 % víztartalom), valamint 5 mM benzoésav, és 10 mM L-Phe koncentrációk, és 2.4 mg/ml karboxipeptidáz A koncentráció alkalmazása mellett reakcióelegyünket 96 óráig inkubáltuk, és megfelelő időnkénti mintavétellel követtük a szintézis kitermelésének alakulását. 48 órás inkubálás után 55.2 %-ot értünk el, és a továbbiakban nem tapasztaltunk N-benzoil-L-Phe szint növekedést (33. ábra).



**33. ábra:** N-benzoil-L-Phe szintézis CPA-val optimalizált körülmények között.

Kísérleteink igazolták, hogy CPA-val mind a dipeptidszintézis, mind pedig N-acil aminosavak szintézise megvalósítható. Az N-benzoil-L-Phe előállítására rögzített CPA-val a jelenleg folyó, és a további kísérletek feladata.

## 5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

### 5.1. Rögzített karboxipeptidáz A előállítás

A CPA enzim rögzítéséhez öt különböző jellegű hordozót használtunk fel. Kovalens kötással rögzítettük az enzimet a vízdoldékony karbodiimiddel aktivált Akrilex C 100-hoz, a p-benzokinonnal aktivált Akrilex P 100-hoz, a Szilokróm aldehidhez, és a p-benzokinonnal aktivált Szilokrómhoz. Polietilén-tereftalát (Sorsilen) hordozóhoz az enzimet adszorpcióval kötöttük. Valamennyi hordozó esetében sikerült katalitikus aktivitással rendelkező rögzített enzimet létrehozni. Az egyes enzimformák rögzítési eredményei azonban eltérő képet mutattak. Legkisebb aktivitással a Szilokróm aldehid-CPA rendelkezett (1.54 U/g száraz gél). A CPA adszorpciója a Sorsilén felületén meglehetősen erős, de a hordozó hidrofób karaktere elég jelentős inaktiválódást idézett elő. Ez jó egyezést mutat az ugyancsak Sorsilen hordozón rögzített alkoholdehidrogenáz viselkedésével (Simon és mtsai, 1990), illetve a hidrofób jellegű hordozók azon tulajdonságával, hogy megváltoztatják az enzimmolekula konformációs stabilitását (Zaborsky, 1974).

A poliakrilamid alapú hordozó, az Akrilex C 100 megfelelő fehérjekötő képességgel, és jó aktivitással (125.0 U/g száraz gél) rendelkezett. Így további kísérleteinkhez az Akrilex C 100-CPA-t használtuk fel. Az Akrilex C 100 hordozó alkalmazásával elért sikeres rögzítés magyarázható a gél nagyfokú hidrofilicitásával. Hidrofil jellegű hordozók ugyanis stabilizálják az enzimek aktív konformációját, ellentétben a hidrofób jellegűekkel, melyek az enzim hidrofób magjának lazításával inaktiválhatják az enzimet.

A CPA kovalens rögzítésének számos példáját tárja elénk a szakirodalom. Ezekben a munkákban azonban a szerzők általában nem adták meg rögzítéseik anyagmérlegét, így vizsgálataink eredményeivel való összevetésük nehéz. Sikeresen rögzítették a CPA-t Burgess és munkatársai (1975) Sephadex hordozóhoz aktivitásvesztés nélkül. Az oxidált cellulóz savklorid származékán, ill. a sztiren-maleinsav anhidrid kopolimer hordozó különböző módszerekkel aktivált formáin 60-70 %-os eredménnyel rögzítettek CPA-t (Kumar és munkatársai 1986; Dua és mtsai, 1985). A hordozó előkészítése, és aktiválása ezekben az esetben többlépcsős, erőteljes kémiai beavatkozást igénylő eljárással történt. Az enzimek rögzítése során gyakran jelentkezik valamilyen mértékű inaktiválódás. Ez több okra vezethető vissza. Egyrészt a hordozó és

az enzim között a kovalens kötések kialakításában az aktív centrum esszenciális oldalláncai, illetve az aktív térszerkezet fenntartásában résztvevő oldalláncok is részt vehetnek, aminek következtében a rögzített enzim inaktiválódhat. Másrészt, a rögzített enzimek alacsony aktivitásának térbeli okai is lehetnek, ugyanis a hordozó, vagy az egymás mellett elhelyezkedő fehérjemolekulák lefedhetik az enzim aktív centrumát. Töltéssel rendelkező hordozók esetében pedig diffúziós gáttakkal is számolni kell.

A rögzítési reakció körülményeinek vizsgálata során a 5.5-6.0-s pH-t találtuk optimálisnak. A szakirodalomban CPA rögzítésére használt pH 5.5, és 6.5 között változik a hordozó jellegétől függően (Kumar és mtsai, 1986).

Az oldott, és a rögzített enzim kinetikai tulajdonságainak összehasonlítása azt mutatta, hogy a  $K_{Mapp}$  értéke hippuril-L-fenilalanin szubsztrátra az Akrilex C 100 hordozón rögzített enzimnél (1.65 mM) magasabb, mint az oldott enzimnél (1.07 mM). A rögzített enzimek Michaelis állandóját befolyásolja a diffúzió (a szubsztrátkoncentráció alakulása a gélben), a hordozó töltései, továbbá az enzim aktív konformációjának változása. Az Akrilex C 100-CPA esetében tapasztalt  $K_{Mapp}$  érték növekedés egyik lehetséges magyarázata, hogy a diffúziós korlátként működő polimer mátrix azonos töltési karakterrel rendelkezik, mint a szubsztrát. A módosított cellulóz mátrixon, ill. sztirén-maleinsav anhidrid származékokon rögzített CPA esetében  $K_{Mapp}$  csökkenést észleltek, ami egyrészt indokolható a hordozó, és a szubsztrát molekulák ellentétes töltési karakterével. Elképzelhető azonban, hogy az enzim szerkezete módosult, melynek eredményeként megnőtt az affinitása a szubsztrátokra, esetleg a kötődött enzim molekula körül egy speciális mikrokörnyezet alakult ki, melyben a szubsztrátkoncentráció magasabb, mint a körülvevő oldat többi részében, s ez az egyenlőtlen megoszlás a  $K_{Mapp}$  érték csökkenésében jelent meg (Dua és mtsai, 1985; Kumar és mtsai, 1986).

Az enzimek rögzítés során bekövetkező specifikus kémiai módosítása különböző mértékben hat az egyes enzim molekulákra. Ezek a módosítások hatással vannak a rögzített enzim katalitikus tulajdonságaira. A polianionos, erősen hidrofil jellegű mikrokörnyezet nem változtatta meg az Akrilex C 100-CPA katalitikus aktivitásának pH optimumát a natív enzimhez képest, viszont a rögzítés jelentősen megnövelte az Akrilex C 100-CPA konformációs stabilitását, amely a megállapított hőmérsékleti optimum mintegy 20°C-os pozitív eltolódásában is egyértelműen kifejeződik. Megnövekedett konformációs stabilitást észleltek a CPA poliszacharid hordozóra rögzített formái esetében is (Kumar és mtsai, 1986). Korábbi vizsgálatok bemutatták,

hogy a vízdékony karbodiimiddel aktivált Akrilex C ugyancsak hatékony hordozó a karboxipeptidáz B esetében is (Südi és mtsai, 1989). Ez utóbbi rendszernél a katalitikus aktivitás pH optimuma gyakorlatilag megegyezett a CPA esetében tapasztaltakkal. A hőmérsékleti optimum eltolódása kisebb, a  $K_{mapp}$  érték eltérése viszont nagyobb volt a CPB esetében.

A rögzített enzimforma megnövekedett stabilitása magyarázható lehet azzal is, hogy a rögzítés során az enzim molekula felületi szabad amino csoportjainak száma csökken, mivel ezek egy része a hordozóval savamid, vagy Schiff-bázis kötés kialakításában vesz részt. ez eredményezhet egy felületi áttöltődést, melynek hatására megváltozhat a rögzített enzim konformációja, és konformációs motilitása.

Az CPA Akrilex C 100 hordozóhoz rögzítése alkalmas az enzim hő-, pH, és ureával szemben mutatott stabilitásának növelésére is. 60°C-on az oldott forma 15 perc alatt inaktiválódott, míg a rögzített eredeti aktivitásának 50 %-ával rendelkezett. Mind a hőinaktiválódás pH függésének vizsgálata, mind pedig az enzimek 4M-os ureával való inkubálásának eredménye a rögzített enzimforma nagyobb stabilitását tükrözte. Az urea az enzim molekula hidrofób magjában működő másodlagos kötőerők bontása, lazítása révén okoz inaktiválódást. A hidrofil hordozó konformációt stabilizáló karaktere azonban megfelelő védelmet biztosítva megnövelte a CPA ureával szembeni stabilitását is. Ezek az eredmények jó egyezést mutatnak a CPA más, kovalens kötéssel rögzített származékainál tapasztaltakkal (Burgess és mtsai, 1975; Kumar és mtsai, 1986; Dua és mtsai, 1985). A CPA molekula rögzítéseinek sorozatában érdekesek azok a kísérletek is, amelyek a molekula antigén tulajdonságát kihasználva szilárd hordozóhoz kapcsoltan, (Solomon és mtsai, 1984) vagy antigén-antitest keresztkötések kialakításával immunkomplexet képezve (Solomon és Balas, 1991) a hődenaturációval szemben sikeresen stabilizálták az enzimet. A monoklonális antitestek, chaperon jellegükénél fogva jelentős mértékben stabilizálják az enzim molekulát, s új távlatokat nyithatnak a biotechnológiai kutatások területén (Solomon és mtsai, 1995, 1998).

A rögzített enzimformával szembeni egyik legnagyobb elvárás a többszöri felhasználhatóság, illetve a tárolhatóság. Az Akrilex C 100-on rögzített karboxipeptidáz A pH 5.5-8.5-ös kálium-foszfát, ill. Tris/HCl pufferekben tárolva az első napon jelentősebb 20-30 %-os aktivitás veszteséget mutatott, a lecsökkent aktivitását viszont az inkubálás teljes ideje alatt viszonylag jól megőrizte. Az Akrilex C 100-CPA stabil enzimforma, 30-szoros ismételt felhasználás során megőrizte kiindulási aktivitását. Dua és munkatársai (1984) különböző sztiren-maleinsav anhidrid kopolimer származékokon

rögzített CPA működési stabilitásának vizsgálata során, a működtetés 30 ciklusa után mintegy 13-25 %-os aktivitás csökkenést tapasztaltak.

A rögzített enzimes rendszerek széleskörűen alkalmazhatóak aminosav analízisre (Church és mtsai, 1984; Voyksner és mtsai, 1990; Ge és Zhang, 1996). A rögzített CPA formák a natív enzimétől eltérő szubsztrátspecifitással rendelkeztek. E változásnak oka lehet a már említett sztérikus gát, a hordozó hidrophil karaktere, valamint az elektrosztatikus kölcsönhatások. A legkisebb különbséget az erősen hidrophil jellegű, polianionos, nyitott pórusú Akrilex C 100-ra rögzített CPA esetében tapasztaltuk. Amennyiben a poliakrilamid hordozót p-benzokinonnal aktiválták, a rögzült CPA katalitikus aktivitása jelentős mértékben lecsökkent, ahogyan ezt a peptidhasítás adatai is mutatták. Hasonló eredményeket kaptunk a szilika-alapú hordozók (aldehid, vagy p-benzokinonnal aktivált) esetében is. Ezen hordozók kevésbé hidrophil jellegűek, kevésbé „mozgékony” struktúrával rendelkeznek, mint az Akrilex C 100. A hidrophób Sorsilen felületén adszorbeálódott CPA pedig csak a Gly-Phe hasítására volt képes. E rendszerek komplexitása általános érvényű következtetések levonása előtt mindenképpen további kutatást igényel.

## **5.2. A CPA stabilitása szerves oldószerekben**

A nem hagyományos közegek (elsősorban szerves oldószeres) enzimreakciók számára történő alkalmazása jelentősen kiszélesítette a biokatalizátorok elméleti, és gyakorlati felhasználhatóságának körét. A szerves oldószer jelenléte nagymértékben megnöveli e rendszerek komplexitását, és számos olyan problémát (pl. a biokatalizátor viselkedése a különböző szerves oldószerekben, a biokatalizátor stabilitásának, stabilizálásának problematikája, oldódási viszonyok változása, stb.) felvet, melyek szinte enzimenként beható kutatást igényelnek (Brink és mtsai, 1988). Az enzimek katalitikus tulajdonságai szerves oldószeret tartalmazó rendszerben szigorúan függenek attól a vízmennyiségtől, amely rendelkezésre áll az aktív konformáció fenntartásához (Lozano és mtsai, 1997).

Ismerve a CPA enzim különleges szerkezeti sajátosságait, az ún. belső vízmolekulák létét, illetve a hidratációs burok jelentőségét, szerkezetét (Rees és mtsai, 1983), fontosnak tartottuk a különböző szerves oldószeres (vízzel elegyedő, és vízzel nem elegyedő) hatását megvizsgálni az enzim működésére.

A DMSO, mely közismerten jó oldószer a fehérjéknek, 70 %-os koncentráció

tartománytól erősen lecsökkentette a CPA aktivitását. A DMSO 90 %-os koncentrációban az enzim aktivitását 20 perces inkubálási idő elteltével a kiindulási aktivitás 6 %-ra redukálta. Érdekes megjegyezni, hogy a DMSO a karboxipeptidáz Y enzimet már alacsonyabb, 50 %-os oldószerjelenléténél teljesen inaktiválta (Lewis és Schuster, 1991). A többi vízzel elegyedő oldószer, az 1,4-dioxán, az acetonitril, és az etanol alkalmazása esetén az enzim aktivitása még magasabb koncentrációknál sem csökkent jelentős mértékben. 90 %-os oldószerkoncentrációnál az enzim még két órás inkubálás után is megőrizte kiindulási aktivitásának mintegy 45-65 %-át. Feltehetőleg ezek az oldószeres csak kis változásokat idéznek elő a CPA molekulát körülvevő hidrátburokban, hiszen képesek lehetnek arra, hogy ezt egy szerves molekulából felépülő solvatációs burokkal helyettesítsék az aktív konformáció változtatása nélkül, sőt esetenként hozzájáruljanak egy stabilabb konformáció kialakulásához (Tanford, 1974; Khmel'nitsky és mtsai, 1988). A rendszer összetettségét tükrözi, hogy a vízzel elegyedő szerves oldószeres a szubsztrátok, és az enzim között fellépő hidrofób kölcsönhatásokat csökkentve kompetitív inhibitoroként is hathatnak, sőt változtathatják a poláros csoportok elektrosztatikus kölcsönhatásait az enzimmolekula struktúráján belül (Nagashima és mtsai, 1992).

A kovalensen Akrix C 100-hoz kötött CPA megnövekedett konformációs stabilitását látszik alátámasztani a rögzített rendszer szerves oldószeresekkel szembeni viselkedése is. 90 % vízzel elegyedő oldószer jelenlétében szembevetve, hogy a rögzített enzim valamennyi esetben jobban megőrizte az aktivitását, mint az oldott enzim. Az etanol esetében aktiválódás figyelhető meg, mely az inkubálás 120 perce alatt megmaradt, s a DMSO átmenetileg ugyancsak fokozta a rögzített enzimforma aktivitását. A DMSO hatására bekövetkezett átmeneti aktiválódás csupán rövid idejű volt, amit inaktiválódás követett. Az oldhatatlan hordozóra történt kovalens enzimrögzítés tehát „megvédte” az enzimmolekulát a szerves oldószer denaturáló hatásával szemben. Az oldott enzimmel összehasonlítva a stabilizáló hatás sok esetben magasabb aktivitásban, az oldószer magas koncentrációjánál (90-95 %) aktivitásvesztés nélküli működésben, vagy az irreverzibilis denaturációval szembeni nagyobb ellenálló képességben nyilvánult meg (Khmel'nitsky és mtsai, 1988). Érdemes azonban odafigyelni arra is, hogy hidrolitikus enzimek esetében tapasztaltak olyan jelenséget, hogy szerves oldószeres közegben akkor is képesek funkciójuk betöltésére, ha az aktív centrumuk teljes mértékben károsodott. (Klyosov és mtsai, 1975). Így tehát a rögzített enzimeknél tapasztalható magas stabilitás nem feltétlenül van összefüggésben a

katalikusan aktív konformáció meglétével.

A vízzel nem, ill. korlátoltan elegyedő szerves oldószerek közül a poláros jellegű etil-acetát, és az 1-butanol, valamint az apoláris toluol enzimműködésre gyakorolt hatását vizsgáltuk. A maradék aktivitás értékek 40 perces inkubálás után azt mutatták, hogy mindhárom oldószer esetén a növekvő oldószerjelenlét jelentős enzimaktivitás csökkenést eredményezett, s az enzim ezekben az oldószerekben való viselkedése nagyobb eltéréseket mutatott. Míg a poláros jellegű etil-acetát, és az 1-butanol enzimaktivitást csökkentő hatása csak magasabb koncentrációknál érvényesül, addig az apoláros toluol már 20 %-os koncentrációnál is erős inaktíválódást idézett elő, feltehetőleg az enzim molekula apoláros kötési rendszerének megbontása miatt. A 90 %-os oldószer koncentrációnál kapott eredményeink is a vízzel nem, ill. korlátoltan elegyedő oldószerek nagyobb mértékű inaktíváló hatását támasztották alá. Cantarella és munkatársai (1991) is hasonló eredményt kaptak a két-fázisú rendszerek tanulmányozása során. Tapasztalataik szerint az 1.2-2.2-es log P-jű oldószerek „jótékony” hatást gyakorolnak a savas-foszfátáz, a  $\beta$ -glükózidáz, és a  $\beta$ -fruktofuranozidáz hidrolitikus enzimek működésére. Ezen határokon kívül eső oldószereknél azonban ezeknél az enzimeknél jelentős mértékű inaktíválódással, denaturációval kellett számolni.

A rögzített enzim adatok ezen oldószerek esetén meglepő képet tártak elénk. A toluolnál jelentős (~40 %-os) aktivitásnövekedést mértünk, melyet az Akrilex C 100-CPA az inkubálás 120 perce alatt mindvégig megtart. Etil-acetátban pedig a két enzimforma között nem találtunk szignifikáns eltérést. A rögzített, Akrilex C 100-CPA esetében a hidrofil mátrix védi az enzimet. A vízzel nem elegyedő vizsgált három oldószernél a log P értékek emelkedésével egyenes arányban nő a rendszer stabilitása. Ez a megnövekedett stabilitás jó egyezést mutat az ugyancsak hidrofil jellegű, poli(2-hidroxiethyl metakrilát) hordozóba zárt, fent említett hidrolitikus enzimeknél tapasztaltakkal (Cantarella és mtsai, 1993).

### **5.3. CPA-val megvalósított szintetikus reakciók szerves oldószert tartalmazó közegben**

Tekintettel arra a tényre, hogy a CPA szerves közegű szintetikus reakciókban való alkalmazása nem rendelkezik megfelelő szakirodalommal, valamint arra, hogy a peptidáz aktivitás mellett észteráz aktivitása is van, továbbá, hogy a szerkezetében, és a

katalízis mechanizmusában a vízmolekulák kitüntetett szereppel rendelkeznek, az enzimet ezen a téren többirányú vizsgálatnak vetettük alá.

A szakirodalomban közölt, szerves oldószeres közegben proteolitikus enzimekkel végrehajtott szintézisekben túlnyomórészt aktivált, N-védett aminosavakat, illetve aminosav származékokat használtak a szerzők. A jellemző reakciók pedig az észterezés, az átészterezés, és a peptidszintézis (Clapés és mtsai, 1997; Mitin és mtsai, 1997; Gololobov és mtsai, 1994).

A CPA-val a vizsgált aminosavak  $\text{NH}_2$ -csoportján N-acilezési reakciókat, (dipeptidszintézis, N-védés), valamint N-védett aminosav észterek átészterezését terveztük megvalósítani. A dipeptidszintézis ez esetben tulajdonképpen olyan N-acilezési reakcióként fogható fel, melyben az acil-donor, és -akceptor is egy-egy aminosav. A dipeptidszintézist, és az aminosavak N-védését, illetve ezek körülményeit vizsgálva megállapítottuk, hogy ez a két, elméletileg nem sokban különböző reakció a gyakorlatban eltéréseket mutat, s ennek megfelelően külön-külön tárgyaltuk őket.

### 5.3.1. Dipeptidszintézis

A CPA által katalizált dipeptidszintézisben nem védett aminosavak „egyszerű” kondenzációs reakciójára került sor. Viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre a peptidázokkal végrehajtott kondenzációs peptidszintézis reakciókról. Kunugi, és munkatársai élesztőből izolált karboxipeptidáz Y-nal végeztek kondenzációs reakciót. (Kunugi és mtsai, 1997)

A CPA enzim szerkezetének belső stabilizálásában rendkívül fontos szerepet játszanak a vízmolekulák. Ezen vízmolekulák száma korábbi szerzők szerint 10, újabb tanulmányok pedig 24-ről tudósítanak (Hartsuck és Lipscomb, 1971; Rees és mtsai, 1983). Így rendkívül érdekesnek látszott a peptidszintézis, (kondenzációs) reakciót alacsony víztartalmú szerves oldószeres közegben vizsgálni. A legmagasabb kitermelést (43%-ot) acetonitrilben sikerült elérni. A neutráz által katalizált peptidszintézis esetében is az acetonitril szerepelt, mint egyike az erre legmegfelelőbb oldószereknek (Clapés és mtsai, 1990). Szerves oldószerek hatását vizsgálták Lozano, és munkatársai a kimotripszin katalizálta peptidszintéziseknél (Lozano és mtsai, 1995). Az enzim „peptidszintetizáló” aktivitása jelentős mértékben nőtt, ha a közeg vízáktivitasát aprotikus szerves oldószerek hozzáadásával csökkentették. Megállapítást nyert, hogy az oldószer hidrofilitása kulcsparaméterként határozza meg a kimotripszin szerves



oldószerben mutatott szintetikus aktivitását. A legnagyobb aktivitást a leginkább hidrofíli DMSO-ban észlelték. A CPA-val történő dipeptidszintézis kitermelése esetünkben független volt a közegként alkalmazott oldószer log P értékétől.

A szubsztrátkoncentráció CPA enzim kondenzációs működésére kifejtett hatásának vizsgálata azt mutatta, hogy a legoptimálisabb, ha az L-Phe szubsztrát 1.2 mM koncentrációban van jelen. Ezen koncentráció felett erőteljes csökkenést mértünk a dipeptid kitermelésben, amely a feltehetőleg szubsztrátgátlással magyarázható. Látszólagos szubsztrátgátlást észleltek a karboxipeptidáz Y katalizálta peptid kondenzációs reakció esetén, (Kunugi és mtsai, 1997) s ugyancsak jelentős redukció következett be a kitermelésben, amennyiben több, mint 30 mM koncentrációban volt jelen a karboxil komponens a pepszin katalizálta peptidszintézis kétfázisú reakcióelegyében (Bemquerer és mtsai, 1994).

Viszonylag magas víztartalom (10 %), továbbá 1.4 mg/ml CPA koncentráció volt szükséges ahhoz, hogy a 30°C-on elérjük a legjobb konverziót. Annak érdekében, hogy a CPA lehetséges legnagyobb szintetikus aktivitását elérjük, feltehetőleg az L-Phe töltés nélküli karboxil csoportjainak megfelelő számára van szükség. Rendszerünkben a peptidszintézis savas közegben (pH 5.5) volt maximális. A pH változása nagymértékben befolyásolta az enzim ionizációs állapotát. Proteázokkal szintetikus kísérleteket általában pH 3.2, és 7 között végeztek, az optimális pH függ az enzimtől, illetve az alkalmazott szubsztráttól (Wayne és Fruton, 1983; Mitin és mtsai, 1997). A karboxipeptidáz A kondenzációs reakciója optimális körülmények között, 43 %-os maximális kitermeléssel éri el a látszólagos egyensúlyát 24 óra alatt, és ez az érték hosszabb idejű inkubálás során nem változott. A karboxipeptidáz Y katalizálta peptidszintézis Cbz-Phe, és Gly-NH<sub>2</sub> szubsztrátok felhasználásával, pH 6.3-nál, 30°C-on, 5 órás reakció idő mellett legmagasabb kitermelését, ~60 %-ot 50 % DMSO, mint korszolvens jelenlétében érte el (Kunugi és mtsai, 1997). A kitermelés különböző szerves oldószerek különböző koncentrációban való alkalmazásával 10 és 60 % között volt. Az N-védett, aktivált aminosavak felhasználásával végzett enzimes szintézis szerves oldószeres közegben irodalmi adatok szerint 57-99 % kitermelést eredményezett 24-72 h inkubálási idő alatt.

A proteázokkal végzett enzimatisz peptidszintézisek utóbbi évtizedben, a gyakorlati kutatásban is egyre nagyobb jelentőségre tettek szert. A peptidek, biológiailag aktív molekulaként fontos szerepet töltenek be a mezőgazdaságban, gyógyászatban stb. (Duke és Abbas, 1995; Pinilla és mtsai, 1995). A tanulmányok

túlnyomó többségében dipeptidek szintézisét írták le. A megszintetizált peptid hosszával párhuzamosan növekszik a rendszer összetettsége, és egyre nagyobb lehet a nem kívánt oldalreakciók valószínűsége (Gololobov és mtsai, 1994).

A CPA dipeptidek, ill. N-védett („blokkolt”) dipeptidszármazékok kötésére egyaránt képes, ezeket azonban eltérő sebességgel hidrolizálja. Gyorsabb a hidrolízise a blokkolt  $\text{NH}_2$ -csoporttal rendelkező dipeptideknek viszont a szabad amino csoportú, nem védett dipeptidek hidrolízise lassú (Riordan és Holmquist, 1984). Feltehetőleg ezzel is magyarázható, hogy a rendszer viszonylag magas víztartalma ellenére, a dipeptidszintézis során nem tapasztaltunk hidrolitikus mellékreakciót.

Az oldott, és a rögzített (az Akrilex C 100-CPA) különböző szerves oldószerekben végzett stabilitásvizsgálata azt mutatta, hogy a rögzített enzimforma valamennyi vizsgált rendszerben stabilabb volt, mint az oldott, ezért elvégeztük a dipeptidszintézist a CPA különböző rögzített formáinak felhasználásával is. 96 órás inkubálás után a legmagasabb kitermelést 13.5 %-ot az Akrilex C 100-CPA liofilizált formájának alkalmazásával érték el. A biokatalizátor „víztelenítése” (szerves oldószeres kezeléssel, liofilizálással) fontos lehet a katalitikusan aktív konformáció megőrzésében. A liofilizált Akrilex C 100-CPA rendszernek a Phe-Phe kitermelése ugyan alacsonyabb volt, mint az oldott enzimé (43 %), viszont ez az enzimforma még 96 órás inkubálás után is rendelkezett kiindulási aktivitásának 83 %-val, az oldott forma 15 %-val szemben. A rögzített enzimekkel létrejött egyensúlyi elegyek alacsonyabb koncentrációban tartalmazzák a dipeptidet. Feltehetőleg a rögzítés hatására, az enzim és hordozó között kialakult kölcsönhatások olyan szerkezeti változást idéztek elő, amely a reakció egyensúlyára is kihatott. Laboratóriumunkban folyó, sertés pankreász lipáz különböző rögzített formáival végrehajtott átészteresítési reakció során is egyes esetekben az oldott enzimmel elért eredményekhez képest alacsonyabb termék-koncentrációnál érték el az egyensúlyt (Bagi és Simon, 1999). Különböző hordozókon rögzített  $\alpha$ -kimotripszin szerves közegben mutatott észteresítési reakcióját vizsgálva Reslow és munkatársai (1988) megállapították, hogy acetónitrilben a rögzített kimotripszin rendszerek aktivitása egyenesen arányos a rögzítéshez alkalmazott hordozó aquafilicitásával (az egyes hordozók vízmegkötő kapacitásának mértéke), továbbá, hogy különböző szerves oldószerekben a hordozóra rögzített enzim szintetikus aktivitása eltérő. Ez jó egyezést mutat az általunk alkalmazott rögzített CPA rendszerek acetónitrilben tapasztalt viselkedésével.

### 5.3.2. Átészteresítés

A CPA által katalizált átészteresítési reakció szerves oldószer közegeként, s egyben az átészteresítési reakció szubsztrátjaként 1-butanolt alkalmaztunk. Az átészteresítés során a 18-20 %-os kitermeléssel nyert butil-észter származék mellett nagy mennyiségű hidrolízis termék, N-acetil-tirozin keletkezett. A folyamat során egy olyan egyensúly jött létre, melyet sem a pH, sem a víztartalom változtatásával nem sikerült eltolnunk. Kise és Hayakawa (1991) a rögzített kimotripszin, és szubtilizin által katalizált észteresítést, és átészteresítést vizsgálták. Az Ac-Tyr-OMe átészteresítéshez használt szubsztrát, s egyben oldószer az etanol volt. A legnagyobb kitermelést 2-3 %-os víztartalomnál sikerült elérniük. A szubtilizin katalizálta peptidszintézist (különböző szerves oldószerekben), és átészteresítést (benzolban) vizsgálták Ferjancic és munkatársai (1990). A Z-Ser-OMe szubsztráton bemutatták a hidrolízis/aminolízis arányának változását a rendszer víztartalmának emelkedésével. A víztartalom emelkedésével a mellékreakcióként kezelt hidrolízis aránya jelentős mértékű 2-2.5-szörös az aminolízishez képest. Ezt a hidrolízis-átészteresítési arányt tapasztaltuk a CPA-val végrehajtott reakció során is. A pH szerves oldószeres közegben mutatott jelentőségét Zaks és Klivanov (1988) vizsgálatai igazolták. Ők szubtilizinnel az N-acetil-L-Phe etil észterét propanollal észteresítették át oktánban. A reakció legjobban a 7.8-as pH-jú pufferből liofilizált szubtilizinnel volt végrehajtható. Míg a kimotripszin, és a szubtilizin esetében nyomnyi mennyiségű víz jelenléte elegendő ahhoz, hogy szerves oldószerben nagy kitermeléssel szintetikus reakciókat katalizáljanak, addig a CPA szerves oldószeres közegben 8-10 % víz jelenlétében működik megfelelően. Ez a víztartalom elegendő és/vagy szükséges a CPA aktív konformációjának fenntartásához, és nem idéz elő hidrolízist a dipeptidszintézis során. A CPA számára az átészteresítés optimális pH-ja 7.5 volt, s ez megegyezik a vizes közegű, CPA-val katalizált észterhidrolízis optimumával.

A CPA esetében az enzimnek feltehetőleg minimális az affinitása az alkohol-szubsztrát irányába, s tekintettel arra, hogy elegendő mennyiségű víz van a rendszerben, a CPA inkább ez utóbbit választja nukleofil szubsztrátként.

### 5.3.3. N-acil aminosavak szintézise

Az enzimek már a kémiai peptidszintézisekben, a védőcsoportok régió-, és

enantioszelektív eltávolításában is kitüntetett szereppel rendelkeztek. Az aminosavak, és egyéb molekulák megfelelő funkciós csoportjainak védelme, ill. a védőcsoportok szelektív eltávolítása mind a kémiai, mind pedig az enzimátikus (nem hagyományos közegben végbemenő) szintéziseknél (peptidszintézisek, proteázok katalizálta észteresítések, átészteresítések) fontos (Meyers és Glass, 1975; Pathak és Waldmann, 1998). A szerves oldószeres közegek alkalmazása lehetőséget biztosít az (elsősorban) aminosavak enzimátikus N-acilálására (N-védésére).

Az aminosavak N-védését CPA enzimmel aromás, és alifás szerves savakkal valósítottuk meg acetónitrilben. Aminosavak aminoaciláz enzim katalizálta N-acilálását vizes, és szerves oldószeres közegben is elvégezték már. Közegként dimetilformamidot, és 1,4-dioxánt használtak Kosáry és munkatársai (1994). Kísérleteink során aromás szerves savak alkalmazása esetén magasabb kitermelést sikerült elérni, mint a nyíltláncú szerves savakkal (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) végrehajtott acilezési reakció során, ahol a hangyasav kivételével a kitermelés egyenesen arányos a szénlánc hosszával. Legjobb szubsztrátnak az aromás benzoosavat, a hippursavat, és az L-Phe-t találtuk. Az N-benzoil-L-Phe szintézisnél optimális körülmények alkalmazásával, 72 óra inkubálási idővel 55.2 %-os kitermelést értünk el. Ferjancic-Biagini és munkatársai (1997) C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> szerves savakkal vizes közegben sertésvese-, és bél-aminoaciláz enzimmel végrehajtott N-acilálási reakcióban 17 óra inkubálási idővel 20-30 %-os kitermelést értek el.

Amennyiben a CPA hippuril-L-Phe-ra, és N-Bz-L-Phe-ra (az utóbbinál mért értékek:  $K_{Mapp}=0.457$  mM; a  $v_{max}=0.00169$   $\mu$ mol/perc/ml) megállapított kinetikai paramétereit hasonlítjuk össze, a  $K_{Mapp}$  értékek alapján megállapíthatjuk, hogy az enzim az N-benzoil-L-Phe irányába nagyobb affinitást mutat, erősebben köti, mint az általánosan használt mesterséges szubsztrátját, de lényegesen lassabban hidrolizálja el.

Azért is fontosnak tartottuk a töltéssel rendelkező védőcsoportok kialakítását fontos célnak, mert ezek a hagyományos, kémiai peptidszintézis általánosan alkalmazott védőcsoportjaihoz (Z, Fmoc, Boc, stb.) képest egyrészt megnövelik az aminosav származékok vízdékonyságát, másrészt pedig a hajlandóságát a szintetikus reakciókban való részvételre (Fischer és mtsai, 1991).

Az aminosavak N-védésének optimális körülményeit vizsgáló kísérletek a dipeptidszintézistől eltérő értékeket hoztak (30-37°C; pH 6.5; 8 %-os víztartalom). Az optimális hőmérsékleti, és víztartalom igény lényeges eltérést nem mutatott. A magasabb optimális pH magyarázható az erősebben savas jellegű komponens alkalmazásával, hiszen, mint már említettük a megfelelő kötéshez a töltés nélküli

karboxil csoportok megfelelő számára volt szükség.

A CPA-val katalizált szerves oldószeres szintézisek érdekessége, hogy viszonylag magas 8-10 %-os víztartalomnál érték el a maximális konverziót. A szakirodalom adatai szerint a hidrolitikus enzimekkel katalizált szerves oldószeres szintézisek optimális közege ennél lényegesen alacsonyabb víztartalmú. Így például az  $\alpha$ -kimotripszin esetében a reakciórendszer 2-3 %-os, lipáznál pedig a 0.0-0.4 %-os víztartamú (László és Simon, 1998; Kise és Shirato, 1988; Halling, 1994).

Meglepőnek találtuk, hogy viszonylag magas 10 mM-os L-Phe koncentráció tünt az N-acilálás számára a legoptimálisabbnak. A dipeptidszintézisnél már 1.2 mM koncentráció fölött megállapított gátló hatás ez esetben csak 10 mM fölött jelenik meg. Tekintettel arra a tényre, hogy a benzoésav koncentrációjának emelésével gátlást nem tapasztaltunk, arra következtethetünk, hogy egyfajta „versengés” folyik a két szubsztrát között. A CPA feltehetőleg a fenti körülmények alkalmazásával nagyobb affinitással köti a benzoésav szubsztrátot, s így ennek jelenlétében az L-Phe csak magasabb koncentrációnál töltheti be a másik szubsztrát szerepét. Az Ferjancic-Biagini és munkatársai (1997) által leírt, aminoacilázzal katalizált N-acilálásnál az aminosav szubsztrátot az L-Met-t 0.2 M koncentrációban, míg az adott szerves sav nátrium sóját 0.02 M-os koncentrációban alkalmazták.

Amennyiben a CPA enzimmel végrehajtott N-acilezést, valamint kutatócsoportunk másik vizsgált enzimével az  $\alpha$ -kimotripszinnel sikeresen megvalósított N-acil aminosavak észterésítési folyamatait (esetleg rögzített enzimformák alkalmazásával) összekapcsoljuk, e két enzimmel N-acil aminosav észterek előállítására nyílhat lehetőség (László és Simon, 1998).

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink során előállítottuk a CPA enzim különböző hordozókhoz rögzített formáit, és az Akrilex C 100 hordozó esetében meghatároztuk a rögzítés optimális feltételeit. Az Akrilex C 100-CPA-nak vizsgáltuk a katalitikus tulajdonságait, és a stabilitását, továbbá összehasonlítottuk az oldott formával. Különböző hosszúságú peptidek (di-heptapeptid) C-terminális aminosav hasításán keresztül mutattuk be a rögzített CPA gyakorlati alkalmazhatóságát, ill. az oldott enzimhez képest, a rögzítés során bekövetkezett hasítási specifitás változást.

Szerves oldószert tartalmazó (20-90 %) rendszerekben vizsgáltuk az oldott CPA stabilitását, s kis víztartalmú közegekben, 90 % szerves oldószer jelenlétének hatását tanulmányoztuk az oldott, és a rögzített Akrilex C 100-CPA enzimforma aktivitására, stabilitására. Az oldott, és rögzített CPA-val különböző szerves oldószeres közegekben szintetikus reakciókat: „N-acil aminosavak” (dipeptidszintézis, aminosavak N-védelme) szintézisét, átészteresítést vizsgáltunk, ill. meghatároztuk ezek optimális feltételeit.

Kísérleti eredményeinket a következőkben foglalhatjuk össze:

1. Kísérleteink során CPA-t adszorpcióval rögzítettük Sorsilenen, valamint kovalens kötéssel négy különböző jellegű hordozóhoz, a Szilokróm aldehidhez, a p-benzokinonnal aktivált Szilokrómhoz, a p-benzokinonnal aktivált Akrilex P 100-hoz, és vízdékony karbodiimiddel aktivált Akrilex C-100-hoz. Valamennyi rögzített enzimforma rendelkezett katalitikus aktivitással. Az 1 g hordozóra rögzült aktivitásértékek alapján legmegfelelőbbnek a vízdékony karbodiimiddel aktivált, karboxil funkciós csoportokat tartalmazó, poliakrilamid alapú hordozón (Akrilex C 100-on) rögzített enzimformát találtuk. Feltehetőleg a hordozó hidrophil karaktere megfelelően stabilizálta az enzim aktív konformációját.
2. Meghatároztuk az Akrilex C 100 hordozón történő rögzítés optimális körülményeit. Ennek során vizsgáltuk a rögzítés pH, a rögzítéshez alkalmazott enzimmennyiség, a hordozó aktiválásához alkalmazott vízdékony karbodiimid minőség, és mennyiség függését. Megállapítottuk, hogy a rögzítés számára alkalmas puffer enyhén savas, 5.5-6-os pH-jú, 1 g gélhez 1250 U enzimegységet célszerű alkalmazni, mellyel 20 %-os hatékonyságú rögzítés érhető el. A

legmegfelelőbb karbodiimid származék a CMEC, melynek optimális mennyisége a hordozó: aktiválószer 1:1-es arányával fejezhető ki.

3. Az oldott, és az Akrilex C 100-CPA katalitikus sajátságait vizsgálva megállapítottuk, hogy az oldott, és a rögzített enzimforma működésének pH optimuma megegyezik, a rögzített enzimforma hőmérsékleti optimumának mintegy 20°C-os pozitív eltolódásából pedig az Akrilex C 100-CPA oldotténál nagyobb stabilitására következtettünk. Az oldott, és a rögzített CPA Michaelis állandóit összehasonlítva úgy találtuk, hogy a rögzített enzimforma  $K_M$  értéke (hippuril-L-fenilalanin szubsztrátra) kissé magasabb, mint az oldotté.
4. Az összehasonlító jellegű stabilitási, inaktiválódási (hő, pH, urea) vizsgálataink is azt bizonyították, hogy az enzim Akrilex C 100 hordozóhoz rögzítése révén megnövekedett hő-, és denaturáló szerekkel szembeni stabilitással rendelkezett. Különösen szembetűnő különbségeket tapasztaltunk 60°C-on valamint a hőinaktiválódás pH függésének vizsgálatánál pH 8.5 alkalmazása esetén.

Az Akrilex C 100-CPA mintegy harmincszoros ismételt felhasználás után sem vesztett kiindulási aktivitásából, és viszonylag csekély aktivitásvesztéssel tárolható a különböző (pH 5.5-8.5) pH-jú pufferekben. A CPA Akrilex C 100-on való rögzítésével tehát jó stabilitású, katalitikus aktivitását hosszan megőrző rögzített enzimet hoztunk létre.

5. Az oldott, és a különböző rögzített CPA formák felhasználásával különböző peptidek C-terminális aminosavának meghatározását végeztük el, és kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy a rögzített enzimformák hasítási specifitása az oldottétól eltérő. Ezeknek a változásoknak oka lehet egy szterikus gát, a hordozó, és az enzim között kialakult kapcsolat, elektrosztatikus kölcsönhatások, melyek a CPA katalízist befolyásolták. A legkisebb különbséget az erősen hidrofil jellegű, polianionos Akrilex C 100-ra rögzített CPA esetében állapítottunk meg, amely valamennyi vizsgált peptid C-terminális aminosavát lehasította, és az oldotthoz képest csupán sebességbeli eltéréseket tapasztaltunk. Az aminosav hasítás eredménye alapján arra következtethettünk, hogy a hordozó hidrofil jellege (aquafilicitása) egyik döntő fontosságú paraméterként határozza meg a hozzá rögzített enzim katalitikus sajátságait.
6. Vizsgáltuk az oldott-, és a rögzített CPA aktivitását különböző, vízzel elegyedő, korlátozottan elegyedő, és nem elegyedő oldószerekben. A rendszer növekvő oldószer koncentrációja minden esetben csökkentette az oldott enzim aktivitását.

A csökkenés mértéke vízzel elegyedő oldószerekben kisebb mértékű volt, mint a vízzel nem, ill. korlátozottan elegyedő oldószerekben. Feltehetőleg a vízzel elegyedő oldószerek képesek az enzim molekuláinak hidrátburkának összetételét az oldószer molekuláival módosítani, az enzimkonformáció fenntartásában jelentős szerepet játszó kölcsönhatásrendszer nagyobb mértékű módosítása nélkül. Kivételt képezett a dimetil-szulfid, amely igen erőteljesen inaktiválta a CPA-t. 90 %-os oldószer koncentrációnál összehasonlítottuk az oldott, és az Akrilex C 100-CPA viselkedését, és a rögzített enzimformát valamennyi oldószerben stabilabbnak találtuk, ami jól egyezik az előzőekben megállapítottakkal. Különösen szembeűnő volt a rögzített enzim etanolban, és toluolban tapasztalt aktiválódása, ill. a 90 %-os dimetil-szulfidban mutatott viszonylag magas aktivitása.

7. Vizsgáltuk, hogy a CPA képes-e szerves oldószeres közegben szintetikus reakciók katalízisére. Ennek a kísérletsorozatnak a keretében először CPA-val dipeptidszintézist végeztünk. A dipeptidszintézishez védőcsoport nélküli aminosavakat használtunk, és legjobb szubsztrátnak az L-Phe-t találtuk. E reakcióhoz legalkalmasabb oldószer az acetonitril volt. Megállapítottuk a Phe-Phe szintézis körülményeit, a reakcióelegy optimális hőmérsékletét (30°C), pH-ját (pH 5.5), a közeg víztartalmát (10%), majd meghatároztuk a szintézishez szükséges enzim-, és szubsztrát mennyiséget is. A szubsztrátként használt L-Phe koncentrációfüggése alapján megállapítottuk, hogy a nagyobb koncentrációnál gátolja az enzim működést. A szintézis a megállapított paraméterek felhasználásával 43 %-os Phe-Phe kitermelést eredményezett. Az oldott enzimmel végrehajtott dipeptidszintézis optimális körülményeinek alkalmazásával, a reakciót különböző rögzített enzimformákkal is elvégeztük. Legnagyobb kitermelést az Akrilex C 100-CPA liofilizált formájának felhasználásával értük el.
8. Tekintettel arra a tényre, hogy a CPA peptidáz aktivitása mellett észteráz aktivitással is rendelkezik, szerves közegű átészteresítési reakciót hajtottunk végre az oldott enzimforma felhasználásával N-acetil-L-tirozin etil-észter és 1-butanol szubsztrátként, s ez utóbbi egyben szerves közegként való alkalmazásával. A reakciót a dipeptidszintézisnél magasabb, enyhén lúgos pH-n (pH 7.5) sikerült kiviteleznünk. A reakció során azonban jelentős mennyiségű hidrolitikus termék, N-acetil-L-tirozin keletkezett.



9. A CPA-t alkalmasnak találtuk N-védett aminosavak előállítására. Acetonitrilben, különböző aromás, és alifás (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) szerves savak (acilező komponensek), valamint L-Phe alkalmazásával sikeresen állítottunk elő különböző N-acil-L-Phe aminosav származékokat. Legmagasabb kitermelést a benzoecsav, és a hippursav (benzoil-glicin) esetében értünk el. Gyakorlati jelentőségére való tekintettel a dipeptidszintézishez hasonlóan meghatároztuk az N-benzoil-L-Phe szintézis optimális körülményeit, (pH 6.5, 37°C, 8 % víztartalom) szubsztrát-, és enzimkoncentráció függését. 10 mM L-Phe, és 5 mM benzoecsav szubsztrát koncentráció a legmegfelelőbb az N-benzoil-L-Phe szintézis számára. Az L-Phe 10 mM-nál magasabb koncentrációban gátolja az enzim szintetikus aktivitását. A benzoecsav koncentrációjának emelésével gátlást nem tapasztaltunk. Feltehetőleg a CPA az adott reakciókörülmények alkalmazásával nagyobb affinitással köti a benzoecsav szubsztrátot, s így ennek jelenlétében az L-Phe csak magasabb koncentrációnál töltheti be a szubsztrát szerepét. Noha mindkét folyamat (a dipeptidszintézis, és az aminosavak N-védése) N-acilezési reakcióként fogható fel, az alkalmazott szubsztrátok kémiai karaktere, valamint az optimális reakciókörülmények kismértékű eltérést mutattak.

Az oldott CPA a megfelelő oldószer kiválasztásával magasabb oldószer koncentrációknál is jól megőrizte aktivitását, továbbá jó kitermeléssel 43, ill. 55.2 %-kal szintetizált Phe-Phe dipeptidet valamint N-benzoil-L-Phe-t. Eredményeink bizonyítják, hogy a CPA alkalmas nem hagyományos, szerves oldószeres közegű dipeptidszintézisre, valamint N-védett aminosavak szintézisére is. Ez utóbbi reakció rögzített enzimformákkal való eredményes végrehajtása pedig az enzim további felhasználása előtt nyithat utat.

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Aasmul-Olsen, S., Thorbek, P.H.S., Hansen, S., Widmer, F. 1990. Enzymic single-step processes for the production of dipeptides from simple starting materials. 5<sup>th</sup> Proc.-Eur. Congr. Biotechnol. 1: 429-432. Copenhagen, Carlbiotech Ltd. A/S.
2. Abramowitz-Kurn, N., Schechter, I. 1974. Mapping the active site of carboxypeptidase A: a proposed scheme for substrate binding at the active site. *Israel J. Chem.* 12: 543-555.
3. Adlercreutz, P. 1993. Activation of enzymes in organic media at low water activity by polyols and saccharides. *Biochim. Biophys. Acta* 1163: 144-148.
4. Auld, D.S., Holmquist, B. 1974. Carboxypeptidase A. Differences in the mechanisms of ester and peptide hydrolysis. *Biochemistry* 13: 4355-4361.
5. Bagi, K., Simon, L.M. 1999. Comparison of esterification and transesterification of fructose by porcine pancreas lipase immobilized on different supports. *Biotechnol. Tech.* 13: 309-312.
6. Banci, L., Bertini, J., La Penna, G. 1994. The enzymatic mechanism of carboxypeptidase: a molecular dynamics study. *Proteins* 18: 186-197.
7. Bauman, E.K., Goodson, L.H., Guilabault, G.G., Kramer, D.N. 1965. Preparation of immobilized cholinesterase for use in analytical chemistry. *Anal. Chem.* 37: 1378-1381.
8. Bauman, E.K., Goodson, L.H., Thompson, J.R. 1967. Stabilization of serum cholinesterase in dried starch gel. *Anal. Biochem.* 19: 587-591.
9. Bemquerer, M.P., Adlercreutz, P., Tominaga, M., 1994. Pepsin catalyzed peptide synthesis in organic media: studies with free and immobilized enzyme. *Int. J. Pept. Protein Res.* 44: 448-456.
10. Blanco, R.M., Guisán, J.M., Halling, P.J. 1992. The equilibrium and kinetics of N-acetyl-tryptophan phenylethyl ester synthesis by agarose-chymotrypsin in organic media. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 1092-1096.
11. Blanco, R.M., Rakels, J.L.L., Guisán, J.M., Halling, P.J. 1992. Effect of thermodynamic water activity on amino-acid ester synthesis catalyzed by agarose-chymotrypsin in 3-pentanone. *Biochim. Biophys. Acta* 1156: 67-70.
12. Brandt, J., Andersson, L.O., Porath, J. 1975. Covalent attachment of proteins to polysaccharide carriers by means of benzoquinone. *Biochim. Biophys. Acta* 386: 196-202.
13. Brink, L.E.G., Tramper, J., Luyben, K.Ch..A.M., Van't Riet, K. 1988. Biocatalysis in organic media. *Enzyme Microb. Technol.* 10: 736-743.
14. Brown, E., Racois, A. 1974. Enzymes Immobilisees. Les vanacryls et leur emploi dans la preparation de nouveaux derives insolubles de la trypsine. *Tetrahedron Lett.* 30: 675-682.
15. Brown, G. 1976. *Methods in Enzymology* /Mosbach, K. ed./ Academic Press, NewYork 44: 263-280.
16. Brown, G., Thomas, D., Gellf, G., Domurado, D., Berjonneau, A., Guillon, C. 1973. New methods for binding enzyme molecules into a water-insoluble matrix. Properties after insolubilization. *Biotechnol. Bioeng.* 15: 359-375.
17. Bukrinsky, J.T., Bjerrum, M.J., Kadziola, A. 1998. Native carboxypeptidase A in a new crystal environment reveals a different conformation of the important tyrosine 248. *Biochemistry.* 47: 16555-16564.
18. Burgess, A.W., Weinstein, L.I., Gabel, D., Scheraga, H.A. 1975. Immobilized carboxypeptidase A as a probe for studying the thermally induced unfolding of bovine pancreatic ribonuclease. *Biochemistry.* 14: 197-200.

19. Cantarella, L., Alfani, F., Cantarella, M. 1993. Stability and activity of immobilized hydrolytic enzymes in two-liquid-phase systems: acid phosphatase,  $\beta$ -glucosidase, and  $\beta$ -fructofuranosidase entrapped in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) matrices. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 861-867.
20. Cantarella, M., Cantarella, L., Alfani, F. 1991. Hydrolytic reactions in two-phase systems. Effect of water-immiscible organic solvents on stability and activity of acid phosphatase,  $\beta$ -glucosidase, and  $\beta$ -fructofuranosidase. *Enzyme Microb. Technol.* 13: 547-553.
21. Carr, P.W., Bowers, L.D. 1980. Immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry. Fundamentals and applications. /Elving, P.J., Winefordner, J.D., Kolthoff, J.M. eds./ Wiley-Interscience, New York
22. Cashion, P., Javed, A., Harrison, D., Seeley, J., Lentini, V., Sathe, G. 1982. Enzyme immobilization on tritylagarose. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 403-423.
23. Chang, T.M.S. 1976. Methods for the therapeutic application of immobilized enzymes. *Methods in Enzymology* /Mosbach, K. ed./ Academic Press, New York 44: 676-697.
24. Chang, T.M.S., Poznansky, M.I. 1968. Semipermeable microcapsules containing catalase for enzyme replacement in acatalasaemic mice. *Nature* 218: 243-245.
25. Chibata, I. 1978. Immobilized enzymes, research and development. Halsted Press, New York
26. Chin, C.C.Q., Wold, F. 1974. The preparation of matrix-bound proteases and their use in the hydrolysis of proteins. *Anal. Biochem.* 61: 379-391.
27. Chrambach, A., Rodbard, D. 1971. Polyacrylamide gel electrophoresis. *Science* 172: 440-451.
28. Christianson, D.W., David, P.R., Lipscomb, W.N. 1987. Mechanism of carboxypeptidase A: Hydration of a ketonic substrate analogue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1512-1515.
29. Church, F.C., Swaisgood, H.E., Catignani, G.L. 1984. Compositional analysis of proteins following hydrolysis by immobilized proteases. *J. Appl. Biochem.* 6: 205-211.
30. Clapés, P., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. 1990. Enzymatic peptide synthesis in organic media: a comparative study of water miscible and water immiscible solvent systems. *J. Biotechnol.* 15: 323-338.
31. Clapés, P., Pera, E., Torres, I.L. 1997. Peptide bond formation by the industrial protease, neutrase, in organic media. *Biotechnology Letters* 19: 1023-1026.
32. Cramer, S.M., Horváth, Cs. 1989. Peptide synthesis and deamidation with chemically modified immobilized carboxypeptidase Y. *Enzyme. Microb. Technol.* 11: 74-79.
33. Dal Degan, F., Ribadean-Dumas, B., Breddam, K. 1992. Purification and characterization of two serine carboxypeptidases from *Aspergillus niger* and their use in C-terminal sequencing of proteins and peptide synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2144-2152.
34. Dévényi, T., Hazai, I., Ferenczy, S., Bati, J. 1971. Thin-layer ion-exchange chromatography on resin-coated chromatoplates. V. One-dimensional separation of amino acids. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 6: 385-388.
35. Dordick, J.S. 1988. Biocatalysis in nonaqueous media. Patents and literature. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 19: 103-112.
36. Dordick, J.S. 1989. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 11: 194-211.
37. Dua, R.D., Kumar, S., Vasudevan, P. 1985. Carboxypeptidase A immobilization on

- activated styrene-maleic anhydride systems. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 675-680.
38. Dua, R.D., Vasudevan, P., Kumar, S. 1984. Carboxypeptidase immobilization on a cellulosic matrix. *J. Macromol. Sci. Chem.* A21: 43-55.
  39. Dua, R.D., Vasudevan, P., Kumar, S. 1985. Immobilized carboxypeptidase A for sequential analysis. *J. Macromol. Sci. Chem.* A22: 1557-1569.
  40. Duke, S.D., Abbas, H.K. 1995. Natural products with potential use as herbicides. *ACS Symp. Ser.* 582: 348-362.
  41. Epton, R., Hibbert, B.L., Thomas, T.H. 1976. Enzymes covalently bound to polyacrylic and polymethacrylic copolymers. *Methods in Enzymology* /Jakoby, W.B., Wilchek, M. eds./ Academic Press, New York 44: 84-107.
  42. Ferjancic, A., Puigserver, A., Gaertner, H. 1990. Subtilisin-catalysed peptide synthesis and transesterification in organic solvents. *Appl. Microb. Technol.* 32: 651-657.
  43. Ferjancic-Biagini, A., Giardinal, T., Rezner, M., Puigserver, A. 1997. Hog kidney and intestine aminoacylase-catalyzed acylation of L-methionine in aqueous media. *Biocatal. Biotransform.* 4: 313-318.
  44. Fischer, U., Zeitschel, U., Jakubke, H.D. 1991. Chymotrypsin-catalyzed peptide synthesis in an acetonitrile-water system: studies on the efficiency of nucleophiles. *Biomed. Biochim. Acta* 50: 131-135.
  45. Fitzpatrick, A.P., Klivanov, A.M. 1991. How can the solvent affect enzyme enantioselectivity. *J. Am. Chem. Soc.* 113: 3166-3171.
  46. Flemming, C., Gabert, A., Roth, P. 1973. Synthese und Eigenschaften tragefixierter Enzyme. I-II. *Acta Biol. Med. Ger.* 31: 365-373; 449-451.
  47. Folk, J.E., Schirmer, E.W. 1963. The porcine pancreatic carboxypeptidase a system. I. Three forms of the active enzyme. *J. Biol. Chem.* 238: 3884-3894.
  48. Frye, J.L., Sebastian, J.F. 1990. Effects of sulfonates on the esterase activity of carboxypeptidase A. *Biochem. Cell Biol.* 68: 1062-1065.
  49. Funakoshi, T., Hayata, S., Shoji, S. 1983. Application of carboxypeptidase Cn to amino acid sequence analysis I. Preparation and enzymatic properties of immobilized carboxypeptidase Cn. *Chem. Pharm. Bull.* 31: 985-991.
  50. Galdes, A., Auld, D.S., Vallee, B.L. 1983. Cryokinetic studies of the intermediates in the mechanism of carboxypeptidase A. *Biochemistry* 22: 1888-1893.
  51. Galdes, A., Auld, D.S., Vallee, B.L. 1986. Elucidation of the chemical nature of the steady-state intermediates in the mechanism of carboxypeptidase A. *Biochemistry* 25: 646-651.
  52. Gardell, S.J., Craik, C.S., Hilvert, D., Urdea, M.S., Rutter, W.J. 1985. Site-directed mutagenesis shows that tyrosine 248 of carboxypeptidase A does not play a crucial role in catalysis. *Nature* 317: 551-555.
  53. Ge, S.J., Zhang, L.X. 1996. The immobilized porcine pancreatic exopeptidases and its application in casein hydrosylates debittering. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 59: 159-163.
  54. Geisow, M.J. 1991. Peptide synthesis-theme and variations. *Trends Biotechnol.* 9: 294-295.
  55. Gill, I., Vulfson, E.N. 1993. Enzymatic synthesis of short peptides in heterogeneous mixtures of substrates. *J. Am. Chem. Soc.* 115: 3348-3349.
  56. Goldstein, L., Manecke, G. 1976. The chemistry of enzyme immobilization in *Appl. Biochem. Bioeng.* /Wingard, L.B., Katchalski-Katzir, E., Goldstein, L. eds./ Academic Press, New York 1: 23-111.
  57. Gololobov, Yu.M., Stepanov, V.M., Voyushina, T.L., Morozova, I.P., Adlercreutz, P. 1994. Side reactions in enzymatic peptide synthesis in organic media: Effects of

- enzyme, solvent, and substrate concentrations. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 522-528.
58. Hallé, J.P., Bourassa, S., Leblond, F.A., Chevalier, S., Beaudry, M., Chapdelaine, A., Cousineau, S., Saintonge, J., Yale, J.F. 1993. Protection of islets of Langerhans from antibodies by microencapsulation with alginate-poly-L-lysine membranes. *Transplantation* 55: 350-354.
  59. Halling, P.J. 1994. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb. Technol.* 16:178-206.
  60. Hartsuck, J.A., Lipscomb, N. 1971. *The Enzymes*, 3<sup>rd</sup> ed. Academic Press, New York, pp.1-56.
  61. Hass, G.M., Ryan, C.A. 1980. Cleavage of the carboxypeptidase inhibitor from potatoes by carboxypeptidase A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97: 1481-1486.
  62. Hicks, G.P., Updike, S.J. 1966. The preparation and characterization of lyophilized polyacrylamide enzyme gels for chemical analysis. *Anal. Chem.* 38: 726-730.
  63. Hofstee, B.H.J., Otilio, N.F. 1973. Immobilization of enzymes through non-covalent binding to substituted agaroses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53: 1137-1144.
  64. Inman, J.K. 1974. Covalent linkage of functional groups, ligands and proteins to polyacrylamide beads. *Methods in Enzymology* /Jakoby, W.B., Wilchek, V. eds./ Academic Press, New York 34: 30-58.
  65. Kálmán, M., Szajáni, B., Boross, L. 1983. A novel polyacrylamide-type support prepared by p-benzoquinone activation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 8: 515-522.
  66. Kawashiro, K., Sugahara, H., Sugiyama, S., Hayashi, H. 1997. Effect of organic solvents on enantioselectivity of protease catalysis. *Biotechnol. Bioeng.* 53: 26-31.
  67. Keller, P.J., Cohen, E., Neurath, H. 1956. Purification and properties of procarboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 223: 457-467.
  68. Keller, P.J., Cohen, E., Neurath, H. 1958. Procarboxypeptidase. II. Chromatographic isolation, further characterization, and activation. *J. Biol. Chem.* 230: 905-915.
  69. Kent, S.B.H. 1988. Chemical synthesis of peptides and proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 957-989.
  70. Khmel'nitsky, Y.L., Belova, A.B., Levashov, A.V., Mozhaev, V.V. 1991. Relationship between surface hydrophobicity of a protein and its stability against denaturation by organic solvents. *FEBS Letters* 284: 267-269.
  71. Khmel'nitsky, Y.L., Levashov, A.V., Klyachko, N.L., Martinek, K. 1988. Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme Microb. Technol.* 10: 710-724.
  72. Kise, H., Hayakawa, A. 1991. Immobilization of proteases to porous chitosan beads and their catalysis for ester and peptide synthesis in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 13: 584-588.
  73. Kise, H., Shirato, H. 1988. Enzymatic reactions in aqueous-organic media. v. Medium effect on the esterification of aromatic amino acids by  $\alpha$ -chymotrypsin. *Enzyme Microb. Technol.* 10: 582-585.
  74. Klyosov, A.A., van Viet, N., Berezin, I.V., 1975. The reactions of  $\alpha$ -chymotrypsin and related proteins with ester substrates in non-aqueous solvents. *Eur. J. Biochem.* 59: 3-7.
  75. Kosary, I., Sisak, Cs., Szajáni, B., Boross, L. 1994. Acylation of amino acids by aminoacylase in non-conventional media. *Biocatal.* 11: 329-337.
  76. Kotormán, M., Simon, L.M., Szajáni, B. 1994. Coenzyme production using immobilized enzymes. III. Immobilization of glucose-6-phosphate dehydrogenase

- from Baker's yeast. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 974-978.
77. Kotormán, M., Simon, L.M., Szajáni, B., Boros, L. 1986. Immobilization of lactate dehydrogenase on polyacrylamide beads. *Biotech. Appl. Biochem.* 8: 53-59.
  78. Krishna, n., Lemuel, B., Wingard, J. 1985. p-Benzoquinone activation of metal oxide electrodes for attachment of enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 7: 283-286.
  79. Ksycinska, H., Grezgorzewska, J. 1980. Properties of crude carboxypeptidase bound with a solid carrier. *Acta Pol. Pharm.* 37: 685-692.
  80. Kuhl, P., Eichhorn, U., Jakubke, H-D. 1995. Enzymic peptide synthesis in microaqueous solvent-free systems. *Biotechnol. Bioeng.* 45: 276-278.
  81. Kuhn, R.W., Walsh, K.A., Neurath, H. 1974. Isolation and partial characterization of an acid carboxypeptidase from Yeast. *Biochemistry.* 13: 3871-3877.
  82. Kumar, S., Vasudevan, P., Dua, R.D. 1986. Activity of carboxypeptidase A bound to a modified cellulose matrix. *Appl. Biochem. Biotech.* 12: 107-119.
  83. Kunugi, S., Shiraishi, M., Tanaka, N., Yanagi, Y., Yoshida, M. 1996. Carboxypeptidase Y catalysis in ternary systems containing octyl  $\beta$ -D-glucopyranoside, octanol and water. *Biotechnol. Prog.* 12: 618-623.
  84. Kunugi, S., Suzuki, N., Nishimoto, S., Morisawa, T., Yoshida, M. 1997. Kinetic study of carboxypeptidase Y-catalyzed peptide condensation reactions in aqueous-organic solvent. *Biocatal. Biotransform.* 14: 205-217.
  85. Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. 1987. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 30: 81-87.
  86. Landsteiner, K., van der Scheer, J. 1936. On cross of immune sera to azoproteins. *J. Exp. Med.* 63: 325-339.
  87. Lasch, J., Koelsch, R., Roth, P., Gabert, A., Marquardt, I., Hanson, H. 1976. Studies of the hydrolysis of proteins by immobilized enzymes. *Acta Biol. Med. Ger.* 35: 735-743.
  88. László, K., Simon, L.M. 1998.  $\alpha$ -Chymotrypsin-catalysed synthesis of N-acetyl-L-tyrosine esters in organic media. Stability and Stabilization of Biocatalysts. (Ballesteros, A., Plou, F.J., Iborra, J.L., Halling, P.J. eds.) *Progress in Biotechnology* 15: 713-718.
  89. Lee, H.J., Kim, J.R., Yoo, Y.J. 1998. The stabilization of enzyme in organic solvent at low temperature. Stability and Stabilization of Biocatalysts. (Ballesteros, A., Plou, F.J., Iborra, J.L., Halling, P.J. eds.) *Progress in Biotechnology* 15: 465-470.
  90. Lee, K.J., Kim, D.H. 1998. Design of mechanism-based carboxypeptidase A inactivators on the X-ray crystal structure and catalytic reaction pathway. *Bioorg. Med. Chem.* 9: 1613-1622.
  91. Lewis, W.S., Schuster, S.M. 1991. Carboxypeptidase Y stability. *J. Biol. Chem.* 266: 20818-20822.
  92. Lipscomb, W.N. 1980. Carboxypeptidase A mechanismus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3875-3878.
  93. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
  94. Lozano, P., Cano, J., Iborra, J.L., Manjón, A. 1993. Glycylglycylphenylalaninamide synthesis catalysed by papain in a medium containing polyols. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 18: 67-74.
  95. Lozano, P., de Diego, T., Iborra, I.L. 1995. Effect of water-miscible aprotic solvents on kyotorphin synthesis catalyzed by immobilized  $\alpha$ -chymotrypsin. *Biotechnol. Lett.* 17: 603-608.
  96. Lozano, P., de Diego, T., Iborra, I.L. 1997. Hydrophobicity and water activity relationships of water-miscible aprotic solvents on kyotorphin synthesis catalyzed

- by  $\alpha$ -chymotrypsin. *Biotechnol. Lett.* 19: 1005-1009.
97. Makinen, M.W., Troyer, J.M., van der Werf, H., Berendsen, H.J., van Gunsteren, W.F. 1989. Dynamical structure of carboxypeptidase A. *J. Mol. Biol.* 207: 201-216.
  98. Makinen, M.W., Yamamura, K., Kaiser, E.T. 1976. Mechanism of action of carboxypeptidase A in ester hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3882-3886.
  99. Mansson, M.O., Siegbahn, N., Mosbach, K. 1983. Site-to-site directed immobilization of enzymes with bis-NAD analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1487-1491.
  100. Markvicheva, E.A., Bronin, A.S., Kudriavtseva, N.E., Kuz'kina, I.F., Pashkin, I.I., Kirsh, IuE., Rumsh, L.D., Zubov, V.P. 1994. A new method of immobilizing proteolytic enzymes in polymeric hydrogels. *Bioorg. Khim.* 20: 257-262.
  101. Mattiasson, B., Mosbach, K. 1971. Studies on a matrix-bound three-enzyme system. *Biochim. Biophys. Acta* 235: 253-257.
  102. Mázor, L. 1971. *Analitikai zsebkönyv. Műszaki Könyvkiadó, Budapest*
  103. Merrifield, R.B. 1986. Solid phase synthesis. *Science* 232: 341-347.
  104. Meyers, C., Glass, J.D. 1975. Enzymes as reagent in peptide synthesis: enzymatic removal of amine protecting groups. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72: 2193-2196.
  105. Mitin, Y.V., Braun, K., Kuhl, P. 1997. Papain catalyzed synthesis of glycerol esters of N-protected amino acids and peptides for the use of trypsin catalyzed peptide synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 54: 287-290.
  106. Mitz, M.A. 1956. New insoluble active derivative of an enzyme as a model for study of cellular metabolism. *Science.* 123: 1076-1077.
  107. Mock, W.L., Wang, L. 1999. Synergistic inhibition of carboxypeptidase A by zinc ion and imidazole. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 239-243.
  108. Murphy, A.O., Fagain, C. 1998. Chemically stabilized trypsin used in dipeptide synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 58: 366-373.
  109. Nagashima, T., Watanabe, A., Kise, H. 1992. Peptide synthesis by proteases in organic solvents: medium effect on substrate specificity. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 842-847.
  110. Navon, G., Shulman, R.G., Wyluda, B.J., Yamane, T., 1970. Nuclear magnetic resonance study of the binding of fluoride ions to carboxypeptidase A. *J. Mol. Biol.* 51: 15-30.
  111. Neurath, H. Evolution of proteolytic enzymes. 1984. *Science* 224: 350-367.
  112. Orsat, B., Alper, P.B., Moree, W., Mak, C-P., Wong, C-H. 1996. Homocarbonates as substrates for enantioselective enzymatic protection of amines. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 712-713.
  113. Pathak, T., Waldmann, H. 1998. Enzymes and protecting group chemistry. *Current Opinion in Chem. Biol.* 2: 112-120.
  114. Phillips, M.A., Kaplan, A.P., Rutter, W.J., Bartlett, P.A. 1992. Transition-state characterization: a new approach combining inhibitor analogues and variation in enzyme structure. *Biochemistry* 31: 959-963.
  115. Pinilla, C., Appel, L., Blondelle, S., Dooley, C., Dorner, B., Eichler, J., Ostresh, J., Houghten, R.A. 1995. A review of the utility of soluble peptide combinatorial libraries. *Biopolymers* 37: 221-240.
  116. Rawlings, N.D., Barrett, A.J. 1993. Evolutionary families of peptidases. *J. Biochem.* 290: 205-218.
  117. Rees, D.C., Lewis, M., Lipscomb, W.N. 1983. Refined crystal structure of carboxypeptidase A at 1.54Å resolution. *J. Mol. Biol.* 168: 367-387.
  118. Reslow, M., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. 1988. On the importance of the support material for bioorganic synthesis. *Eur. J. Biochem.* 172: 573-578.

119. Riordan, J.F., Holmquist, B. 1984. Carboxypeptidase A. Peptidyl-L-amino-acid hydrolase, EC 3.4.17.1. *Methods Enzym. Anal.* 3<sup>rd</sup> edition 5: 44-54.
120. Rival, S., Besson, C., Saulnier, J., Wallach, J. 1999. Dipeptide derivative synthesis catalyzed by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Pept. Res.* 53: 170-176.
121. Rony, P.K. 1971. Multiphase catalysis. II. Hollow fiber catalysts. *Biotechnol. Bioeng.* 13: 431-436.
122. Royer, G.P., Anantharmaiah, G.M. 1979. Peptide synthesis in water and the use of immobilized carboxypeptidase Y for deprotection. *J. Am. Chem. Soc.* 101: 3394-3396.
123. Royer, G.P., Liberatore, F.A., Green, G.M. 1975. Immobilization of enzymes on aldehydic matrices by reductive alkylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64: 478-484.
124. Royer, G.P., Schwartz, W.E., Liberatore, F.A. 1977. Complete hydrolysis of polypeptides with insolubilized enzymes. *Methods in Enzymology* /Hirs, C.H.W., Timasheff, S.N., eds/ Academic Press, New York 47: 40-45.
125. Rybak, M., Coupek, I. 1980. Enzyme immobilization on hydroxyalkyl methacrylate carrier Separon E-properties of immobilized enzymes and their prospective uses in medicine. *Cas. Lek. Cesk.* 119: 1055-1057.
126. Sajadi, Z., Almahmood, M., Loeffler, L.J., Hall, I.H. 1979. Antitumor and antiinflammatory agents: N-benzoyl-protected cyanomethyl esters of amino acids. *J. Med. Chem.* 22: 1419-1422.
127. Schelhaas, M., Waldmann, H. 1996. Protecting group strategies in organic chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* 35: 2057-2083.
128. Schlitzer, M., Sattler, I., Dahse, H.M. 1999. Synthesis and antiproliferative activity of N-acylaspartic acid dimethyl esters. *Anticancer Res.* 19: 2117-2120.
129. Schwarz, A., Steinke, D., Kula, M.R., Wandrey, C. 1990. Optimization of enzyme-mediated peptide bond formation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12: 188-195.
130. Sebastian, J.F., Himks, R.S., Reuland, R.V. 1987. Kinetic studies of modifier effects on the carboxypeptidase A catalyzed hydrolyses of peptides. *Biochem. Cell Biol.* 1987. 65: 717-725.
131. Sebastian, J.F., Liang, G., Jabarin, A., Thomas, K., Wu, H.B. 1996. Effect of enzyme-substrate interactions away from the reaction site on carboxypeptidase A catalysis. *Bioorg. Chem.* 24: 290-303.
132. Shih, I-L., Chin, L-C., Lai, C.T., Liaw, W-C., Tai, D-F. 1997. Enzymes catalyzed esterification of N-protected amino acids with secondary alcohols. *Biotechnology Letters* 19:857-859.
133. Simon, L.M., Heinrichova, K., Veszelka, I., Szajáni, B. 1990. Effects of polyethylene terephthalate on yeast alcohol dehydrogenase. *Acta Biochim. Biophys. Hung.* 25: 1-7.
134. Simon, L.M., Kotormán, M., Szajáni, B. 1992. Coenzyme production using immobilized enzymes. I. Preparation, characterization, and laboratory-scale application of an immobilized NAD<sup>+</sup> kinase. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 997-1000.
135. Simon, L.M., Kotormán, M., Szajáni, B. 1994. Coenzyme production using immobilized enzymes. II. Factors affecting the continuous production of NADP<sup>+</sup>. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 236-239.
136. Smalla, K., Turkova, J., Coupek, J., Hermann, P. 1988. Influence of salts on the covalent immobilization of proteins to modified copolymers of 2-hydroxyethyl



- methacrylate with ethylene dimethacrylate. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 10: 21-31.
137. Solomon, B., Balas, N. 1991. Thermostabilization of carboxypeptidase A by interaction with its monoclonal antibodies. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 14: 202-211.
  138. Solomon, B., Goldstein, L. 1996. Modulation of the catalytic pathway of carboxypeptidase A by conjugation with polyvinyl alcohols. *Adv. Mol. Cell Biol.* 15: 33-45.
  139. Solomon, B., Katar-Gozanski, T., Koppel, R., Hanan-Aharon, E. 1998. Activity of monoclonal antibodies in prevention of in vitro aggregation of their antigens. *Progress in Biotechnology.* 15: 183-188.
  140. Solomon, B., Koppel, R., Katchalski-Katzir, E. 1984. Use of a specific monoclonal antibody for the preparation of a highly active immobilized carboxypeptidase A. *Biotechnology* 2: 709-712.
  141. Solomon, B., Schwartz, F. 1995. Chaperone-like effect of monoclonal antibodies on refolding of heat-denatured carboxypeptidase A. *J. Mol. Recognit.* 8: 72-76.
  142. Stachowiak, K., Wilder, C., Vestal, M.L., Dyckes, D.F. 1988. Rapid protein sequencing by the enzyme-thermospray liquid chromatographic /mass spectrometric method/. *J. Am. Chem. Soc.* 110: 1758-1765.
  143. Stambolieva, N., Turkova, J. 1980. Covalent attachment of proteins to spheron by means of benzoquinone. *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.* 45: 1137-1143.
  144. Steinke, D., Kula, M.R. 1990. Application of carboxypeptidase C for peptide synthesis. *Enzyme Microb. Technol.* 12: 836-840.
  145. Steinke, D., Schwarz, A., Wandrey, C., Kula, M.R. 1991. Formation of peptide bonds by carboxypeptidase C from orange leaves. *Enzyme Microb. Technol.* 13: 262-266.
  146. Südi, P., Dala, E., Szajáni, B. 1989. Preparation, characterization, and application of a novel immobilized carboxypeptidase B. *Appl. Biochem. Biotech.* 22: 31-43.
  147. Tanford, C. 1978. The hydrophobic effect and the organisation of living matter. *Science* 200: 1012-1018.
  148. Triantafyllou, A.Ö., Wehtje, E., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. 1997. How do additives affect enzyme activity and stability in nonaqueous media? *Biotechnol. Bioeng.* 54: 67-76.
  149. Vallee, B.L., Neurath, H. 1956. Carboxypeptidase, a zinc metalloprotein. *J. Am. Chem. Soc.* 76: 5006-5007.
  150. van Sonsbeek, H.M., Beeftink, H.H., Tramper, J. 1993. Two-liquid-phase bioreactors. *Enzym Microb. Technol.* 15: 722-729.
  151. Vértési, A., Bagi, K., Simon, L.M. 1996. Study of the operation of co-immobilized glucose-6-phosphate isomerase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in a flow injection system. *Acta Biol. Hung. Szegediensis* 41: 15-22.
  152. Voyksner, R.D., Chen, D.C., Swaisgood, H.E. 1990. Optimization of immobilized enzyme hydrolysis combined with high-performance liquid chromatography /thermospray mass spectrometry/ for the determination of neuropeptides. *Anal. Biochem.* 188: 72-81.
  153. Wayne, S.I., Fruton, J.S. 1983. Thermolysin-catalyzed peptide bond synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3241-3244.
  154. Weakley, F.B., Mehlretter, C.L. 1973. Binding of papain to dialdehyde starch. *Biotechnol. Bioeng.* 15: 1189-1192.
  155. Weetall, H.H. 1970. Storage stability of water-insoluble enzymes covalently

- coupled to organic and inorganic carrier. *Biochim. Biophys. Acta.* 212: 1-7.
156. Weston, P.D., Avrameas, S. 1971. Proteins coupled to polyacrylamide beads using glutaraldehyde. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45: 1574-1580.
  157. Wheatley, M.A., Phillips, C.R. 1983. Temperature effects during polymerisation of polyacrylamide gels used for bacterial cell immobilization. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 623-626.
  158. Wheeler, K.P., Edwards, B.A., Whittam, R. 1969. Some properties of two phosphatases attached to insoluble cellulose matrices. *Biochem. Biophys. Acta* 191: 187-192.
  159. Wiseman, A. 1975. *Handbook of Enzyme Biotechnology.* Halsted Press, New York
  160. Wolfe, S., Demain, A.L., Jensen, S.E., Westlake, D.W.S. 1984. Enzymatic approach to syntheses of unnatural beta-lactams. *Science* 226: 1386-1392.
  161. Wong, C-H. 1990. Design and development of enzymatic organic synthesis. *Chemical Aspect of Enzyme Biotechnology.* /Baldwin, T.O. ed./ Plenum Press, NewYork.
  162. Yu, Y., Chang, T.M.S. 1982. Immobilization of multienzymes and cofactors within lipid-polyamide membrane microcapsules for the multistep conversion of lipophilic and lipophobic substrates. *Enzyme Microb. Technol.* 4: 327-331.
  163. Zaborsky, O.R. 1974. *Immobilized enzymes 2<sup>nd</sup> edn.* /Weast, R.C., ed./ CRC Press, Cleveland.
  164. Zaks, A., Klivanov, A.M. 1985. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3192-3196.
  165. Zaks, A., Klivanov, A.M. 1988. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.* 263: 3194-3201.
  166. Zaks, A., Klivanov, A.M. 1988. The effect of water on enzyme action in organic media. *J. Biol. Chem.* 263: 8017-8021.
  167. Zhang, K., Chance, B., Auld, D.S., Larsen, K.S., Vallee, B.L. 1992. X-ray absorption fine structure study of the active site of zinc and cobalt carboxypeptidase A in their solution and crystalline forms. *Biochemistry* 31: 1159-1168.

## **ABSTRACT**

### **Introduction**

Technical application of enzymes is getting more and more important in different areas of biotechnology such as the food- or pharmaceutical industries. Due to their stereodiscriminating properties, enzymes offer the opportunity to carry out highly enantio-, and regioselective transformations. They often operate at neutral, weakly acidic or weakly basic pH values and at moderate temperatures. Surprisingly, these possibilities are still unexploited. Various processes have been developed using soluble and immobilized enzymes, mainly in aqueous reaction phases. The catalytic activity of enzymes in water, and also in other solvents was investigated intensively in the past decades. Apart from water as the exclusive solvent and reaction phase for enzymatic reactions many kinds of solvent systems were studied in the recent years.

When biocatalysts are used in organic media it is desirable to deposit them on supports to minimize mass transfer limitations and protect them from the inactivation by the organic phase. The choice of support material can play a crucial role in the determination of enzymatic activity. The interaction of the support with the water present is important in determining the availability of the water required by the biocatalyst to maintain its conformation, hence its catalytic properties. Much work is still required to optimize the conditions in non-aqueous solutions for enzymatic catalysis because the knowledge of the biophysical chemistry of enzymology in organic media is still limited at present. Obtaining stable biocatalyst is the main target of biotechnology.

Enzymes immobilized on or within a solid matrix by conjugation with synthetic water-insoluble polymeric supports can be used in the laboratory, medical practice, and in the industry as reusable and removable highly specific reagents, which often possess improved storage, operational, thermal stability, and resistance against different chemicals (e.g. denaturing agents). The immobilized enzymes can preserve (better than soluble enzymes) their catalytic properties in water containing organic solvent systems. However at high concentrations of the organic component, it might be very important to fix the conformation of the catalytically active enzyme.

Despite the practical importance, only a few attempts have been made to immobilize carboxypeptidase A (CPA). First Lasch et al. (1976) immobilized different proteolytic enzymes, including CPA, on CNBr-activated Sepharose 6B. Later in the

experiments of Dua et al. (1985), the support was copolymer of styrene-maleic anhydride (SMA) activated to various degrees to create enzyme coupling forms. The immobilized CPA on these supports showed enhanced thermal and chemical stability. In other experiments, CPA was immobilized on an acid chloride of oxidized cellulose (Kumar et al., 1986). Voyskner et al. (1990) used immobilized carboxypeptidases (CPA, CPB and CPY) and proteinases (chymotrypsin, thermolysin, trypsin, and V8-protease) to split neuropeptides.

Since carboxypeptidases are the enzymes that remove amino acids from the C-terminal of peptides and proteins, they are used for C-terminal sequence determination.

The aim of our study was to prepare immobilized forms of CPA, to find the most useful support and characterize it. We have compared the catalytic properties and stability of soluble and immobilized enzymes. For practical purposes, CPA (soluble, and different immobilized forms) catalyzed determination of C-terminal amino acids were carried out with different peptides ranging from dipeptides to heptapeptides.

In recent years, enzyme-catalyzed reactions in organic media have attracted considerable attention because of many potential advantages, including the increased solubility of hydrophobic substrates, and the ease of both product and enzyme recovery. The thermodynamic equilibria of enzymatic reactions involving water as product are shifted in the synthetic direction instead of hydrolysis, if the water content in the reaction medium is very low (Dordick, 1989). However, it has been demonstrated that the enzyme properties, e.g. the catalytic parameters, the substrate specificity and enantioselectivity (Kawashiro et al., 1997), can be altered by the nature of the reaction medium.

The behavior of biocatalysts in these nonconventional systems is more difficult to predict than in aqueous solution. It is partially due to the limited experience with these systems, and their greater complexity. This is why we have studied the effects of different water-miscible and water-immiscible organic solvents on the conformational stability of CPA in buffered aqueous solutions.

Classical chemical techniques have predominated the preparation of peptides peptide- and amino acid derivatives for drug research (Pinilla et al., 1995). However, these procedures involve several drawbacks, such as the need for the protection and deprotection of amino acid functional groups, racemization and the lack of stereoselectivity. The introduction and removal of protecting groups are very important

and widely used transformations in synthetic organic chemistry (Pathak and Waldmann, 1998), and the limitations mentioned earlier are valid in this area too. Enzymatically catalyzed reactions don't have these limitations because of the mild conditions and their high specificity. There were earlier studies on the enzymatic syntheses of peptides using various proteases (including  $\alpha$ -chymotrypsin, trypsin, subtilisin, papain, etc.) in organic media (Clapés et al., 1990). Out of the carboxypeptidases, the yeast carboxypeptidase Y's behavior and potential for peptide synthesis been investigated (Kunugi et al., 1997). The aim of our work was to study the use of CPA (soluble and immobilized) for the syntheses of dipeptides and N-acyl (N-protected) amino acids, and to establish the optimal conditions for these procedures.

## Materials and Methods

**Assay of enzyme activity:** CPA activity was determined spectrophotometrically by measuring the change in absorbance at 254 nm at 25 °C (Folk and Schirmer, 1963). The reaction mixture contained 55 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5), 500 mM NaCl and 0.5 mM hippuryl-L-phenylalanine. In case of the immobilized enzyme, 20-100 mg of immobilized enzyme was suspended in the reaction mixture and stirred for an appropriate time (1-10 min). The enzyme was then filtered off quickly and the absorbance was measured at 254 nm. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that hydrolysed one  $\mu$ mol of hippuryl-L-phenylalanine per minute under the assay conditions.

**Immobilization of CPA:** The bovine pancreas CPA has been immobilized on different supports. It was covalently attached to four different supports: Silochrome aldehyde, Silochrome activated with p-benzoquinone (Simon et al., 1992), to polyacrylamide bead polymers activated by carbodiimide and with p-benzoquinone (Akrilex C 100 and Akrilex P 100) (Kotormán et al. 1986; Kálmán et al., 1983). The CPA was also immobilized to Sorsilen by adsorption a simple physical attachment. Immobilization procedures were performed as follows: appropriate quantity of each support was washed with a proper buffer (molarity of buffers, and pH were different in the individual experiments), and suspended in the same buffer containing the appropriate amount of CPA. The suspensions had been stirred at 4 °C for 24 h except

the Silochrome aldehyde (It had been stirred for 3 h). The coupled enzyme-support systems were next filtered off by suction, and washed thoroughly to remove the weakly bound and unbound proteins.

**Stability tests of soluble and Akrix C 100-CPA:** Thermal inactivation experiments (45-60 °C) were performed in 100 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5). In the pH stability tests, the pH of the 50 mM phosphate buffer (pH 5.5-7.5), and that of the 100 mM Tris/HCl buffer (pH 8.5) were controlled during the experiments. After appropriate incubation periods, the samples were rapidly cooled to 0-4 °C, and the residual activities were assayed at 25 °C by the standard procedure.

**Peptide digestion, and analysis by HPLC:** Five mg of peptide was dissolved in 5 ml of distilled water/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 7.5), and the solution was incubated for 4 h at room temperature with 2 U either one of the different forms of immobilized CPA or soluble CPA. The samples were stirred gently, and aliquots were withdrawn hourly. The immobilized enzymes were removed by filtration, and the samples were analysed by means of TLC and HPLC.

**Stability of CPA in organic solvents:** The stability of the enzyme was determined in 100 mM Tris/HCl buffer (pH 7.0) containing of 20-90 % (v/v) organic solvents. The samples were incubated for appropriate periods (up to 120 min.) at 25°C and aliquots were then withdrawn. The residual activity of the enzyme was determined by using the standard method.

**Synthetic reactions with CPA in buffered aqueous organic solvents:** Different organic solvents were used for investigation of the CPA catalyzed dipeptide synthesis, transesterification and the N-acylation (N-protection) of amino acids. The substrates (L-amino acids, N-protected amino acids and different organic acids) were dissolved in buffered aqueous organic solvents (usually acetonitrile). The reactions were started with the addition of enzyme (or the addition of immobilized enzyme). After appropriate incubation periods, samples were withdrawn and analyzed by TLC. The water content of the reaction mixtures was determined by Karl Fischer titration (Mázor, 1971).

**Thin-layer chromatography:** The identification of amino acids liberated during the hydrolysis of peptides and the products of synthetic reactions was carried out on precoated silica plates, and fluorescent precoated silica plates, using n-butanol-acetic

acid-water (4:1:1 v/v) as a solvent. For the identification of products the silica plates were dried and sprayed with ninhydrin (2%) and placed in a 70 °C oven for 30 min.

## Results

We have applied different supports [Silochrome aldehyde, Silochrome activated with p-benzoquinone, Polyethylene terephthalate (Sorsilen), Akrix P 100 activated with p-benzoquinone, and Akrix C 100 activated with carbodiimide] to immobilize CPA. These experiments were successful, and all enzyme forms remained active. The activity of the different immobilized enzyme varied between 1.54 and 127.68 U/g dry gel. The polyacrylamide polymer (Akrix C 100) possessing carboxylic functional groups after activation by a water-soluble carbodiimide proved to be the best support for the immobilized CPA. First, the optimal conditions for gaining the highest enzymatic activity, and after that the catalytic properties of the immobilized Akrix C 100-CPA were studied and compared with the soluble enzyme. The optimum pH of the catalytic activity of the immobilized, and soluble CPA were the same, while the optimum temperature of the immobilized CPA was about 20°C higher than that of the soluble enzyme.

We have investigated the kinetic behaviour of the soluble and immobilized CPA and found that the  $K_{Mapp}$  of immobilized CPA was somewhat higher (1.65 mM) than that for soluble enzyme (1.07 mM). Diffusional effects and possible chemical modifications of the enzyme may be invoked to explain the differences in  $K_{Mapp}$ .

The thermal stability and its pH-dependence of immobilized CPA were also compared to these of the soluble enzyme. The stability of the immobilized enzyme was higher than the soluble. The effect of urea on the conformational stability of CPA was also studied, and we could conclude that the immobilization enhanced the resistance of CPA against urea.

We have carried out experiments to investigate the storage and the operational stability of the immobilized CPA. 70-80 % of the original activity was preserved, or remained practically unchanged in different storage buffers up to 30 days. The operational stability of the immobilized enzyme was good, after 30 runs, the Akrix C 100-CPA catalytic activity stayed constant.

CPA can cleave amino acids from the C terminal of peptides and proteins, therefore we have used it for C-terminal amino acid determination. All forms of immobilized CPA, and the soluble CPA were tested in a C-terminal amino acid analysis experiments. Different peptides ranging from dipeptides to heptapeptides were used as models. It was observed that the rates of amino acid liberation depended on the peptide and on the type of support used for the immobilization of the enzyme. The most favourable results were obtained with Akrix C 100-CPA.

The application of organic media allows the use of hydrolytic enzymes for synthetic purposes to catalyse esterification, transesterification, peptidformation etc. The stability and the hydrolytic activity of soluble CPA, and Akrix C 100-CPA were investigated in the presence of different water-miscible and water-immiscible organic solvents. Increasing amounts of water-miscible polar solvents such as acetonitrile, ethanol and 1,4-dioxane resulted in slight decrease in the activity of CPA, probably causing small changes in the hydration shell of the enzyme. Dimethyl sulfoxide exerted dramatic effects on the enzyme stability when it was present at high concentrations. The activity of CPA decreased strongly with increasing amount of water-immiscible organic solvents.

The behavior of Akrix C 100-CPA in the above-mentioned solvents was analyzed. The immobilized biocatalyst was more protected against unfavorable direct contact of organic solvents. The immobilization really helped to stabilize the enzyme. The amount of water present in the solid enzyme preparation i.e. the water forming a tightly bound hydration shell around the enzyme molecules, was found sufficient for the higher activity of the immobilized enzyme preparation.

We have examined condensation reactions (peptid synthesis, N-acylation of amino acids) in organic media with CPA. Considering the hydrolytic reaction CPA has specificity for aromatic, and large aliphatic amino acids at the C-terminal end of proteins. These amino acids were chosen for synthetic reactions too.

To characterize the synthetic reaction, L-Phe was used as model substrate. Usually acetonitrile was chosen as organic solvent because it has been found to be one of the best for carrying out the peptide synthesis reactions. The peptid synthesis was followed as a function of water content, temperature and pH. The effects of the substrate and enzyme concentrations were also studied during the synthesis of Phe-Phe. The optimal conditions were: water content of the reaction mixture 10 %, temperature 30°C,



and pH 5.5. With various concentrations of L-Phe, the initial velocity changed, but the velocity did not give a simple saturation profile, but higher than 1.2 mM concentration showed an apparent substrate inhibition. The highest Phe-Phe yield, 43 % was achieved after 24 hours. The Phe-Phe synthesis was carried out with different immobilized forms of CPA too.

N-protected amino acids are very important in a peptide synthesis, esterification, and transesterification. Numerous classical methods are available for the manipulation of protecting groups under the mildest possible conditions. Synthesis of N-acyl-L-Phe derivatives was catalyzed by CPA enzyme in organic media. According to the dipeptide synthesis, acetonitrile was the most suitable organic solvent to carry out the N-protection (N-acylation) of amino acids using various aromatic and aliphatic ( $C_1$ - $C_5$ ) organic acids as acyl donors. Both, the dipeptide synthesis, and the N-protection of amino acids are really N-acylation reactions, but the optimal conditions (water content 8 %, 37°C, pH 6.5) obtained for N-protection showed small alterations from our previous observations for Phe-Phe synthesis. The most surprising difference was that the substrate L-Phe inhibition appeared at a totally different concentration. For N-acylation the optimal L-Phe concentration was almost nine times higher, 10 mM, and the mentioned substrate inhibition appeared only above this concentration. The highest product yield was 55.2 % after 72 h, which did not increase during longer incubation.

Our results demonstrate that CPA is a suitable enzyme to catalyze synthesis of dipeptides, and N-acylation of amino acids in nonconventional (buffered organic solvent containing media). The synthesis of N-protected amino acids with immobilized CPA is the subject of further investigations.