

A szénsav-anhidráz enzim kinyerése és vizsgálata

OTDK-dolgozat

Készítette: Bednár András Biomérnöki BSc II. évfolyam

Témavezető: Bélafiné Dr. Bakó Katalin

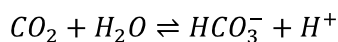
Pannon Egyetem; Mérnöki Kar; Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutató Intézet

TARTALOMJEGYZÉK

1	Bevezetés.....	1
2	Irodalmi áttekintés.....	2
2.1	A szénsav-anhidráz enzimről	2
	A szénsav-anhidráz enzim előfordulása	2
	Az enzim fajtái	3
	Működése	5
	A pH hatása	5
	A hőmérséklet hatása.....	6
	Az inhibitorok szerepe.....	6
	Az enzim felhasználását akadályozó tényezők.....	7
2.2	A C ₃ -as fotoszintézis és a szénsav-anhidráz szerepe	8
	A növényi anyagcsereutak áttekintése.....	8
	A C ₃ -as növények leveleinek anatómiája	9
	A színtestek (kloroplasztiszok) felépítése	10
	A fotoszintézis szakaszai.....	11
	A fény szakasz.....	11
	A sötét szakasz	12
	Fotorespiráció.....	13
	A szénsav-anhidráz szerepe a fotoszintézisben	14
	Az eleddig használt feltárási eljárások összefoglalása	15
2.3	Az enzimaktivitás meghatározásának háttere.....	16
	A reakcióra jellemző „k” állandó meghatározásának menete	19
	Az enzim aktivitásának meghatározása.....	19
3	Kísérleti anyagok, eszközök és eljárások	20
3.1	Felhasznált anyagok	20
3.2	Készülékek	20
3.3	Metódusok.....	21
	A növényi minta előkészítése.....	21
	A reakció végrehajtásának környezeti körülményei.....	21
	Aktivitásmérés fotometriás eljárással.....	22
	Az enzim aktivitásának vizsgálata pH-metriás módszerrel.....	22
4	Eredmények.....	24
	A fotometriás eljárás során nyert eredmények	24
4.1		24
4.2	A pH-metriás módszer eredményei	26

	A nyers minta „k” állandójának és aktivitásának meghatározása foszfát-pufferben, homok felhasználása nélkül.....	26
	A nyers minta „k” állandójának és aktivitásának meghatározása Tris-pufferben, homok felhasználása nélkül.....	28
	A nyers minta „k” állandójának és aktivitásának meghatározása Tris-pufferben, homok felhasználásával.....	29
	A nyers minta tízszeres hígításának vizsgálata.....	30
5	Összefoglalás.....	32
6	Irodalomjegyzék.....	33

Az ipari forradalom következtében az emberiség energia illetve nyersanyagigénye ugrásszerűen megnőtt, ezt a megnövekedett igényt azonban a kezdetleges technológiai megoldások illetve a hiányos tudásanyag miatt nem új technológiák fejlesztésével, hanem a rendelkezésre állók léptéknövelésével érték el. Mivel ezek a technológiák nagyrészt a földben – akkor még – nagy mennyiségben megtalálható kőszén kitermelésén, majd elégetésén alapultak, a levegőbe rengeteg CO₂ gáz került, mely erős üvegházhatást okozó jelege miatt nagyban hozzájárult a globális felmelegedéshez. A kialakult helyzeten az ipari fejlődés sem segített, hiszen bár a megszületett gépek generációról generációra hatékonyabbak lettek, a kitermelni szükséges energiamennyisége továbbra is meredeken növekedett, ami a CO₂ kibocsátás további emelkedését hozta. A megjelent új technológiák, mint például a belsőégésű motorok további gázképződést hoztak, még inkább rontva a helyzetet. Mára lehetőség nyílt arra, hogy a nagyobb méretű ipari létesítményekben, például széntüzelésű erőművekben lecsökkentsék, vagy teljesen kiszűrjék a környezetbe bocsátott szén-dioxidot [1], ám ezeknek a megoldásoknak a használata gazdaságilag nem kedvező, hiszen az eladott termékek árát akár a többszörösére is növelhetik. Vizsgálataink során egy majdnem minden élő szervezetben megtalálható enzimet, a szénsav-anhidrázt nyertük ki, majd mértük meg aktivitását. A keresett enzim a

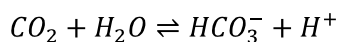


reakciót katalizálja. A katalízis olyan mértékű, hogy sokak szerint ez az egyik leggyorsabb ma ismert enzim [2-4]. A klasszikus eljárásokhoz képest egy sokkal egyszerűbb feltérési módszert alkalmaztunk, melyet megfelelő hatékonysággal sikerült használni. A kinyert enzimszuspenzió aktivitását két módszerrel, pH-metriás és fotométeres eljárással állapítottuk meg. A vizsgálat során megvizsgáltunk több lehetséges reakció és feltérési közegként használható puffertis. Az enzim aktivitását kétféle módszerrel számszerűsítettük, az egyik a klasszikusnak nevezhető Wilbur-Anderson féle aktivitási egység egy általunk módosított változata volt, valamint meghatároztuk a reakciók lefutásának sebességi állandóit.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A SZÉNSAV-ANHIDRÁZ ENZIMRŐL

A szénsav-anhidráz egy olyan metalloenzim, amely az élő szervezetekben a vízben oldott CO_2 szénsavvá illetve annak visszaalakulását katalizálja a



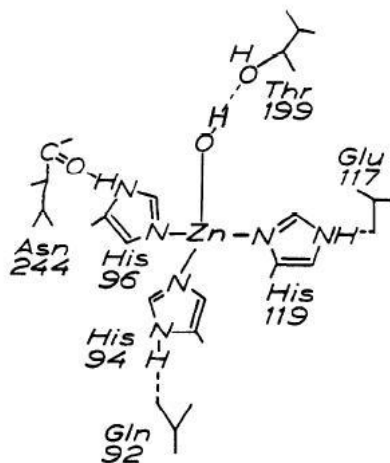
egyenlet szerint [5].



1. ábra: A humán szénsav-anhidráz enzim

A SZÉNSAV-ANHIDRÁZ ENZIM ELŐFORDULÁSA

A szénsav-anhidráz egy olyan enzim, melyet minden állati, fotoszintetizáló növényi illetve néhány nem fotoszintetizáló baktériumban megtaláltak [6]. Noha a szénsav-anhidráz előfordul az előbb említett szervezetekben, a kutatások szerint ezek az enzimek bár ugyan azt a feladatot látják el az egyes szervezetekben, fejlődésük teljesen külön ment végbe. Az egyetlen közös pont az enzim aktív centrumában található cink-ion.



2. ábra: A szénsav-anhidráz aktív centruma a középén megtalálható cink-ionnal

AZ ENZIM FAJTÁI

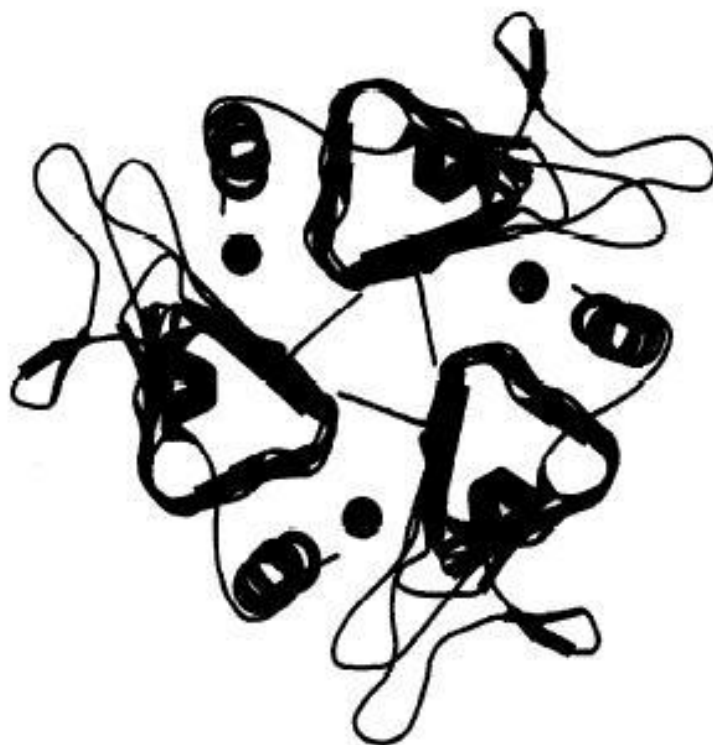
A kutatások alapján öt különálló szénsav-anhidráz családot különböztethetünk meg egymástól: α , β , γ , δ és ζ [4, 7-10]. A szénsav-anhidráz enzimek közül az első három alfajt vizsgálták részletesen. Megállapítható ugyanakkor, hogy mind az öt fajta biológiailag ugyan azt a funkciót látja el, felépítésükben mégis csak annyi a közös, hogy a központi fémion- az ζ kivételével - mindegyikükénél cink. Ez a tulajdonságuk arra enged következtetni, hogy ezeknek az enzimeknek csupán az őse közös, ám mióta az állati, növényi illetve prokarióták elváltak egymástól a törzsfelődés során, ezek az enzimek is teljesen külön fejlődtek.

Minden állati sejtben α típusú szénsav-anhidráz található, de ebből a típusból egyáltalán nem találtak a magasabb rendű növényekben [5]. Az α típus megtalálható még ugyanakkor néhány fotoszintetizáló egysejtűben és egyes baktériumokban is.

Az α típusú szénsav-anhidráz enzimet főleg az emberi szervezetben vizsgálták részletebben, ugyanakkor az egyéb kutatások alapján megállapítható, hogy az összes α típusú szénsav-anhidráz hasonló szerkezeti felépítésű [11, 12]. A molekula alakja gömbszerű, melynek méretei 5X4X4 nm körüli érték. A vizsgálatok szerint az enzim egy 24 aminosavból álló terminális régiótól eltekintve egyetlen szálasnak mondható. A másodlagos szerkezetet nagyrészt tíz darab, csavarodott β -redő határozza meg, melyek a molekulát két részre osztják. A β -redők közül két pár párhuzamos, míg a többi antiparallel lefutású. Az aktív centrum egy, a molekula közelében található kúp alakú résben található, melynek közepén megtalálható a reakciókat katalizáló cink-ion. Az ion három nitrogénatomhoz koordinálódik, ám a kapcsolódás tetraédes szerkezete lehetővé teszi, hogy a negyedik ligandum egy H₂O molekula vagy OH⁻ ion legyen. A ligandumok hidrogénkötésekkel kapcsolódnak az enzim külső, indirekt részeihez, A ligandumok, és a hozzájuk kapcsolódó indirekt ligandumok kevés

kivételtől eltekintve az összes α - szénsav-anhidráz molekulában azonosak. A cink-ionhoz kapcsolódó közvetlen és közvetett ligandumokon kívüli fehérjeszálak közül 17 az összes α - szénsav-anhidrázban azonosak, mivel ezek egy része a katalitikus működésben, míg mások a fehérjeszerkezet stabilitásáért felelősek [5, 13, 14].

A β - szénsav-anhidráz szerkezetét egyelőre nem határozták meg, míg a γ - szénsav-anhidrázé a vizsgálatok alapján nagyban különbözik az α - szénsav-anhidráztól. Minden alegységet hét, bal irányú β -hélix határoz meg, melyekben körönként egy háromszálas redőt tartalmaz. Ebből fakadóan van három majdnem teljesen lapos β -redő, melyekből kettő hét, míg a harmadik nyolc párhuzamos szálat tartalmaz. α -hélix keresztmetszete háromszög alakú. A β -hélixek végén található egy rövid α -hélix, és egy hosszabb, C-terminális α -hélix. A cink-ionokat az alegységek között találhatjuk meg. Az ionokhoz kapcsolódó vízmolekula által az ionkhoz koordinálódó molekulák egy torzított tetraéderes formát mutatnak, mely forma így nagyfokú hasonlóságot mutat a már tárgyalt α - szénsav-anhidráz központi szerkezetével. Mivel a szerkezetnek csak a jellege hasonló, így feltételezhetjük, hogy a különféle szénsav-anhidráz enzimek egymástól függetlenül fejlődtek, ugyanakkor biológiai funkciójukból fakadóan az általuk katalizált reakciók ugyan azok. Így mondhatjuk, hogy a különféle szénsav-anhidráz változatok az enzimek párhuzamos koevolúciójának szép példái lehetnek.



3. ábra: A γ szénsav-anhidráz

Megállapították továbbá, hogy ha az enzim központjában található cink-iont eltávolítva bár elvesztette funkcionalitását, a működésképtelen enzimet tartalmazó oldathoz megfelelő ionokat adagolva azok a megfelelő helyre koordinálódnak, újra működésbe hozva az enzimet. Ha az oldathoz nem cink-ionokat, hanem valamilyen más fémet adnak, azok is képesek koordinálódni az enzim centrumában, ám a funkcionalitást csupán a Co-ionokkal szerzi vissza, ám azt is csak részlegesen.

MŰKÖDÉSE

A kutatások alapján megállapítható, hogy a szénsav-anhidráz által katalizált reakciót két ionizáló csoport hatásának köszönhetjük. Ezek egyike, a cinkhez kötött OH⁻ csoport felelős a CO₂ és HCO₃⁻ közötti átalakulásért. A másik csoport szerepe az, hogy a katalízis helye és a közvetítő közeg között fenntartsa a protontranszfert. Ez a csoport egy His-64-es, mely a központi cink-ion és az aktív centrum bejárata között található meg [4, 13].

A további kutatások kimutatták, hogy a CO₂/HCO₃⁻ átalakulás két félreakcióként megy végbe, ahogyan az



egyenletből is látszik.

Molekulárisan elmondható, hogy a cink-ionhoz kapcsolódott H₂O a fém hatására polarizálódik, így lehetségessé válik, hogy az enzimhez koordinálódott szén-dioxid molekulát nukleofil jelleggel megtámadhassa, így megkapva a szénsavat. Mivel a keletkezett szénsav gyorsan disszociálódik, ezért a reakció kezdődhet előlről.

A pH HATÁSA

Mint minden reakcióban, a szénsav-anhidráz katalizált hidratáció-dehidratáció is nagymértékben függ a közeg pH értékétől. Az irodalmi értékek alapján az enzim működésének pH optimuma a szén-dioxid hidratálásakor pH=7-nél, míg dehidratálásnál a 7,5-ös értéknél mozog. A későbbiekben ismertetett kísérletek során ezért a pH értékeket oly módon állítottuk be, hogy a reakció kezdetekor az 8,3 míg a végén 7,2 legyen, így ezek átlaga jól közelíti az optimális értéket.

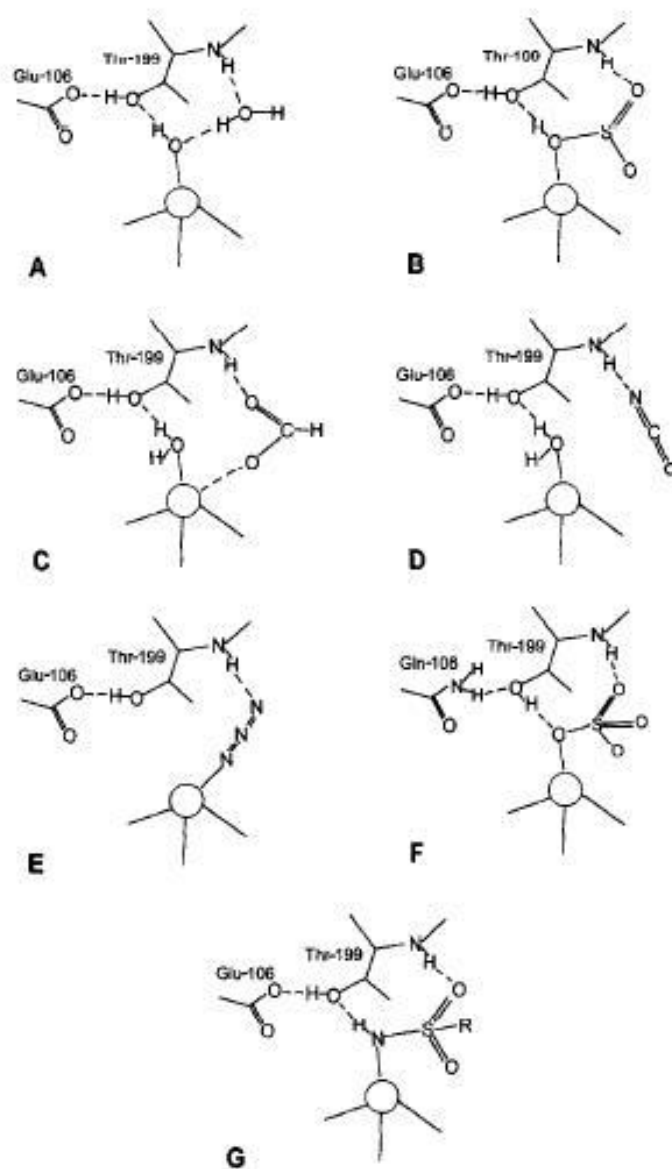
A HŐMÉRSÉKLET HATÁSA

Bár a hőmérséklet enzimre gyakorolt hatása nem elhanyagolható, jelen kutatásunkban nem térünk ki ennek vizsgálatára, az összes, az enzimet is érintő reakciót 23°C-on végeztük.

AZ INHIBÍTOROK SZEREPE

A szénsav-anhidráznak többféle inhibítora is létezik (4. ábra), ezek nagy része a központi fémionnal kapcsolatosan akadályozzák az enzim működését: bizonyos anionok egyszerűen hozzákapcsolódnak a pozitív töltésű központi fémionhoz, gyakorlatilag kiszorítva onnan a reakció véghezviteléhez szükséges OH^- -iont. A szénsav-anhidráz által katalizált reakcióból látható, hogy a szénsav disszociációja során keletkező karbonát-ionok is gátolják az enzimet, vagyis a reakcióban szerepet kap a termékinhibíció is.

Az enzim inhibítorainak másik jelentős csoportja a különböző szulfonamidok, melyek az anionokhoz hasonlóan a negatív töltésű funkciós csoportjukkal a fémionhoz kapcsolódva gátolják az enzim működését. Természetesen sok egyéb inhibítorra találhatunk példát, ám mivel a mi szempontunkból ezek lényegtelenek, ezért a későbbiekben ezekkel nem foglalkozunk [15, 16].



4. ábra: Példák a szénsav-anhidráz inhibitoraira

AZ ENZIM FELHASZNÁLÁSÁT AKADÁLYOZÓ TÉNYEZŐK

A szénsav-anhidráz enzim hátrányai nagyrészt annak biológiai eredetéből fakadnak. Hiszen a természetben, az élő szervezetekben előforduló enzimek nem állandó mennyiségben vannak jelen, hanem folyamatosan termelődnek és mennek tönkre, emellett természetesen az adott feladattól függően is változhat azok mennyisége. Ebből fakadóan az enzimek élettartama nem örök, limitált ideig látják el feladatukat. Jelen esetben ez azért jelent problémát, mert a szénsav-anhidráz enzim izolálása jelenleg bár megoldható, de egyszerűnek nem nevezhető

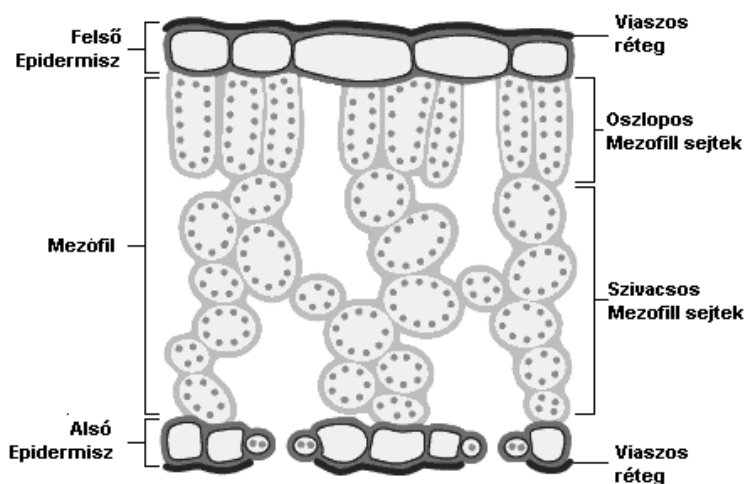
folyamat, emiatt rendkívül kis mennyiség is drága. A helyzetet rontja a már említett folyamatos degradálódás is, ami azt eredményezi, hogy az amúgy is drágán beszerezhető enzim folyamatos pótlásra szorul. Kutatások folytak arra nézve, hogy hogyan is lehetne az enzim élettartamát meghosszabbítani, az eddigi eredmények szerint az enzim hordozón való rögzítése megnöveli annak felezési idejét, ám csökkenti annak aktivitását [17-19].

2.2 A C₃-AS FOTOSZINTÉZIS ÉS A SZÉNSAV-ANHIDRÁZ SZEREPE

A keresett enzim növényből történő kinyeréséhez szükséges annak ismerete, hogy az adott anyag pontosan hol is helyezkedik el a szervezeten belül. Ennek megértéséhez a következőkben rövid áttekintést nyújtunk a fotoszintézisről, valamint az általunk keresett enzim kapcsolatáról.

A NÖVÉNYI ANYAGCSEREUTAK ÁTTEKINTÉSE

Fotoszintézisnek nevezzük azon biológiai folyamatokat, melyek során a fotoszintetizáló sejtek a levegőben/vízben található szén-dioxidot napfény hatására cukrokká alakítják. Ezen folyamatnak több típusa ismert, úgy mint C₃, C₄, CAM. A három út közötti különbségek abból fakadnak, hogy a fotoszintetizáló élőlényeknek alkalmazkodnia kellett bizonyos környezeti körülményekhez, mely az utak kialakulásához vezetett. A C₃ út ezek közül a legősibb és így legegyszerűbb, a C₃-as utat használó élőlények a hűvösebb, csapadékban gazdagabb területeken élnek, míg a C₄-es és CAM típusúak a szárazabb, melegebb, akár sivatagos területeken vannak előnyben. Az utak közötti különbségek abban mutatkoznak meg, hogy a levegő szén-dioxid tartalmát milyen módon kötik meg, ugyanis míg a C₃-as élőlények egyszerűen hagyják, hogy a gáz beoldódjon sejtjeikbe, a C₄ és CAM típusban kénytelenek különféle kerülőutakon megtenni ezt. Az utak közötti különbségek a nevükből is láthatóak: A C₃-nál a szén-dioxid megkötése egy 3 szénatomos, a C₄-nél egy 4 szénatomos láncon történik, míg a CAM során egy sav alakul ki belőle.



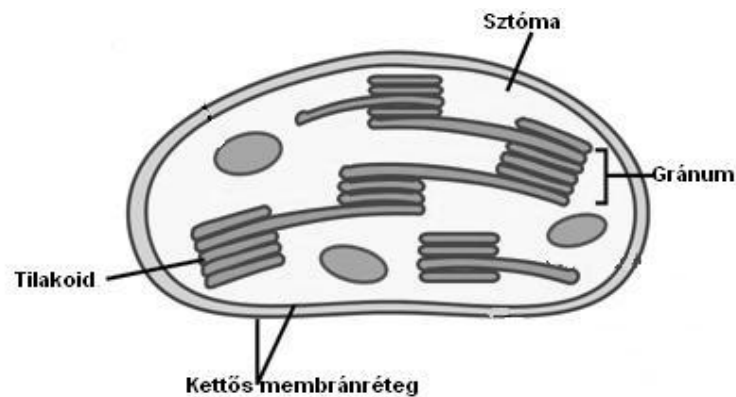
5. ábra: A C_3 -as növények leveleinek anatómiája

A címben említett növények leveleinek felépítése egyszerű, ám az általuk végzett fotoszintézis megértéséhez fontos annak ismerete. A levelek több sejtrétegből állnak, melyek a következők: A levél felső – gyakorlatilag nap felé néző – oldalán egy viaszos külső réteggel rendelkező, úgynevezett epidermisz (bőrszövet) található. Ez a szövetréteg nem rendelkezik kloroplasztiszokkal, tehát nem képes a fotoszintézisre. Ezeknek a sejteknek az a szerepe, hogy a levél belső részét védjék a káros hatásoktól. Hasonló epidermisz réteg található a levél alsó felén is, a két réteg közötti különbség abban mutatkozik meg, hogy az alsó oldalon sokkal több gázcserenyílás található. A legkülső, viaszos réteg feladata az, hogy megakadályozza a párologtatást. Enélkül a réteg nélkül ugyanis a levélben található víz nagy része a napfény hatására hamar elpárologna, és megfelelő utánpótlás nélkül a növény kiszáradna. E réteg jelenlétének ugyanakkor vannak negatív hozadécai is: Nemcsak a víz párolgását, hanem a növény által végzett gázcserét is akadályozzák, a növények ezért rendelkeznek az úgynevezett gázcserenyílásokkal. Ezek két, vese alakú fotoszintetizáló sejtből állnak, melyeknek sejtfa a nyílás belső és külső oldalán eltérő vastagságú. Ennek eredményeképpen, napfény hatására a fotoszintetizáló zárósejtekben cukor képződik, így a kevesebb cukrot tartalmazó (hiszen ezek a sejtek nem képesek a fotoszintézis útján történő cukorelőállításra) bőrszövet sejtjei között ozmózisnyomás-különbség jön létre, melynek hatására víz áramlik a zárósejtekbe, így alakja oly módon változik, hogy az egymással szembefordított sejtek között rés keletkezik, mely lehetővé teszi a gázcserét. Kis víztartalom

esetén természetesen ennek ellenkezője játszódik le: a zárósejtek kiegyenesednek, lezárva ezzel a gázok útját.

A levél bőrszövevei között található a táplálékképző alapszövet (parenchima) melyet két részre bonthatunk: a levél felső szélé felőli oldala az oszlopos, míg az alsó a szivacsos parenchima. Az oszlopos sejtek végzik a fotoszintézis jelentős részét, ám közöttük rések nem találhatóak. A szivacsos réteg fotoszintetikusán kevésbé aktív, de a sejtek közötti rések lehetővé teszik a levél fonákján található gázcserenyílások és az oszlopos parenchimasejtek közötti gázáramlást. A levél egyéb részeire jelen esetben nem térünk ki, a folyamat átlátásához ennyi is elég.

A SZÍNTESZTEK (KLOROPLASZTISZOK) FELÉPÍTÉSE



6. ábra: A növények sejtjeiben megtalálható színtesztek felépítése

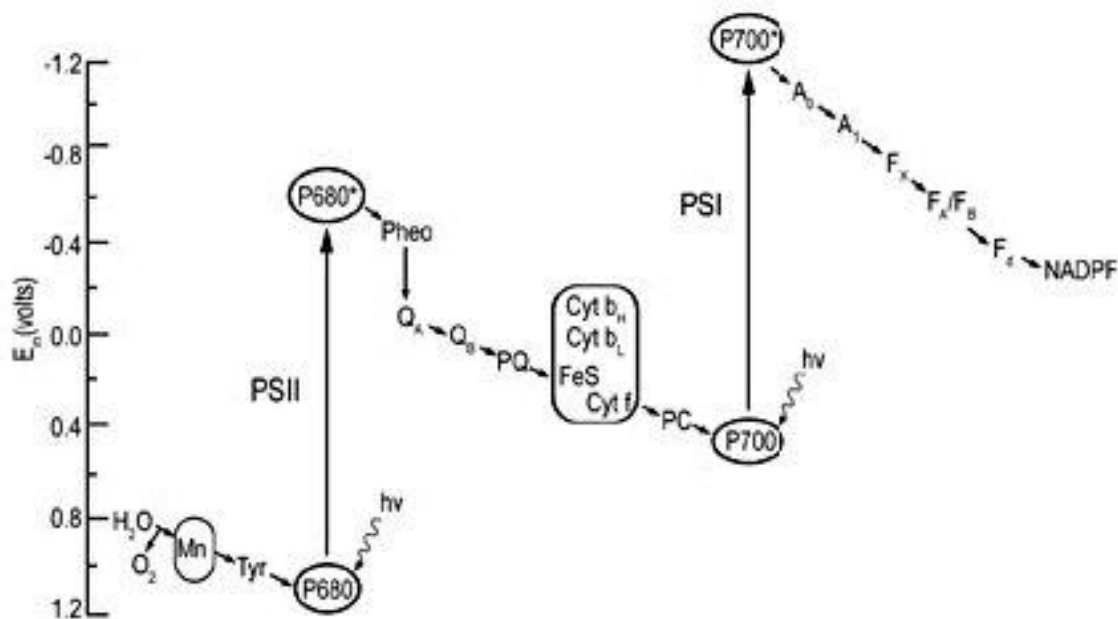
A fotoszintetikus aktivitáshoz szükségesek az úgynevezett színtesztek, melyekben a folyamat végbemegy. Ezek felépítése a következő: A sejtiszervet két rétegből álló membrán határolja, a belső hártán belül található a sztróma, ami gyakorlatilag a sejt nedvnek felel meg. A harmadik, legbelső hártarendszer az úgynevezett tilakoid membrán, mely a gránumot alkotja. A gránum felépítése az egymásra helyezett tányérokra emlékeztet, a gránumtilakoidokból kialakult tornyokat a sztrómatilakoid egymással összeköti.

A FOTOSZINTÉZIS SZAKASZAI

A növények fotoszintetikus aktivitását két részre, az úgynevezett fény és sötét szakaszra bonthatjuk. Nevükből sejthető, hogy az egyik folyamathoz fény szükséges, míg a másikhoz nem.

A FÉNY SZAKASZ

A fotoszintézis fényszakasa a tilakoid membránokhoz rögzített, úgynevezett fotokémiai rendszerek (PS I, II) segítségével zajlik. A gránumtilakoidhoz rögzített pigmentekből álló antennakomplexek felfogják a beérkező fényenergiát, majd a folyamatos megvilágítás hatására gerjesztődnek. A gerjesztés hatására elektronjaik egy magasabb energaállapotba jutnak, mely energiát az elektron alapállapotba kerülésekor át tudják adni a szomszédos molekulának egészen addig, amíg el nem jut az energia a PS II-ig. A beérkező energia hatására a fényrendszerben gerjesztett elektron azonban nem alapállapotába jut vissza energialeadás körben, hanem egy elektrontranszportlánc segítségével elszállítódik. Az elektronját elvesztett fényrendszer ekkor a fotolízis nevű folyamat során vizet bont, így a felszabaduló elektronnal vissza tudja állítani alapállapotát. A reakció során H^+ ionok és O_2 keletkezik. Az említett elektrontranszport végén található $NADP^+$ $NADPH$ -vá redukálódik.

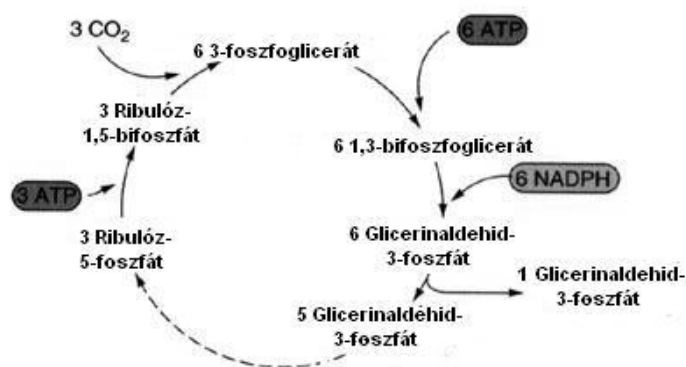


7. ábra: A fotoszintézis fényszakaszának vázlatos képe

Az elektrontranszport során felszabaduló energia segítségével ADP-ból ATP keletkezik. Ezt a folyamatot fotofoszforilációnak nevezik, ismert ciklikus és nem ciklikus változata is, melyek között az jelenti a különbséget, hogy ciklikus esetben nem képződik NADPH.

A SÖTÉT SZAKASZ

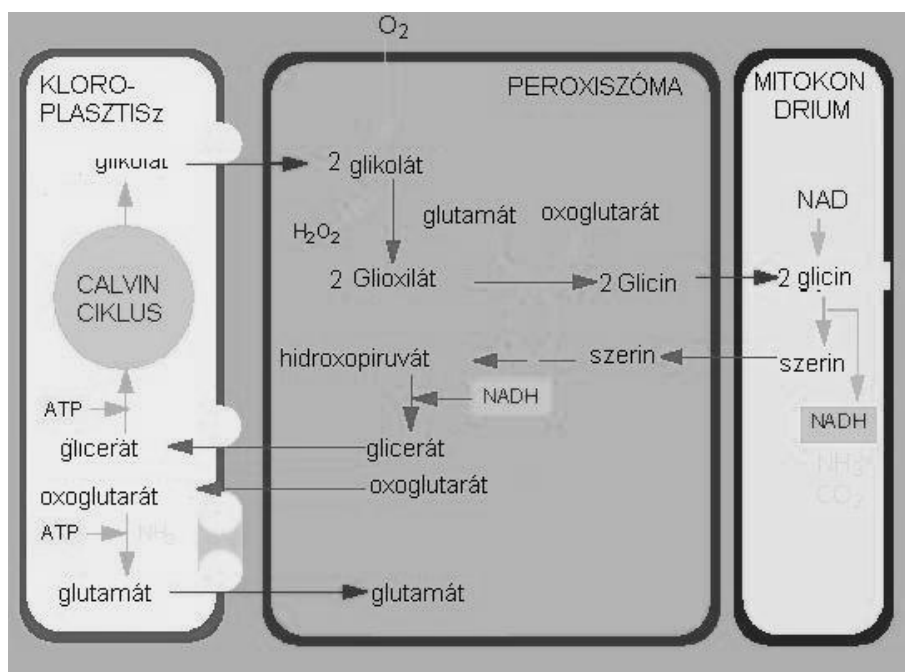
A fotoszintézis sötét szakasza során a fényszakaszban ATP és NADPH formájában tárolt energia segítségével megtörténik a CO₂ fixációja. A C₃-as fotoszintézis során ez oly módon megy végbe, hogy az oldott szén-dioxid megkötődik a ribulóz-1,5-bifoszfáton a Rubisco enzim segítségével, majd az így keletkezett 6 szénatomos vegyület lebomlik két darab glicerinsav-foszfát molekulára. Ezek a molekulák ATP és NADPH befektetése árán gliceraldehid foszfáttá alakulnak. 12 ilyen molekulánként keletkezik egy glükózmolekula, a maradék pedig ismételt ATP felhasználás során ismét ribulóz-1, 5-bifoszfáttá alakul, újraindítva ezzel a kört. (8. ábra)



8. ábra: A fotoszintézis sötét szakasza (Calvin-ciklus)

FOTORESPIRÁCIÓ

Bizonyos körülmények között – nagyon erős napsütés, szárazság – a növények gázcsereenyílásai a túlzott folyadékvesztés elkerülése végett bezáródnak, megakadályozva ezzel a növény számára a szén-dioxid felvételét és a keletkezett oxigén leadását. Bár a Rubisco feladata a széndioxid redukciója, az enzim képes az oxigént is felhasználni szubsztrátként, mely azt eredményezi, hogy számottevő hozadék nélkül oxidálódik a ribulóz bifoszfát. A szén-dioxiddal végrehajtott reakcióval ellentétben itt a ribulóz-1,5-bifoszfátból egy 3 szénatomos 3-foszfoglicerát, valamint egy két szénatomos foszfoglitolát molekula keletkezik. Mivel a szén oxidálódik, ezt a reakciót fotorespirációnak nevezik, mely több módon csökkenti a fotoszintézis hatékonyságát. Először is, a szén oxidációja teljesen ellentétes a fotoszintézis lényegével, mely redukálja ugyan ezt a molekulát. Másodsorban a keletkező molekulák közül a foszfoglitolát haszontalan, sőt mi több mérgező, melyet a sejtnak energiabefektetés árán kell visszaalakítani ribulóz-bifoszfáttá.



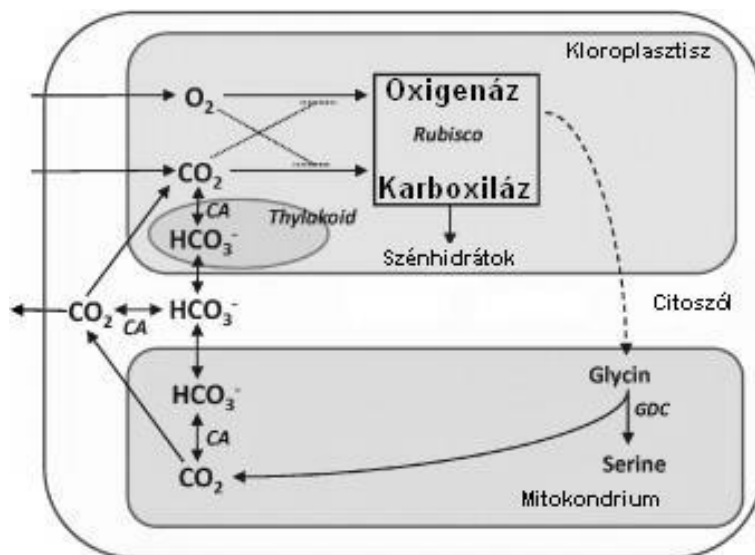
9. ábra: A fotorespiráció folyamata

Ez az újrahasznosítás a peroxiszómában, egy direkt az erre a célra létrejött sejtszervben történik. Ezek a sejtszervek a mitokondriumok és a kloroplasztiszok között helyezkednek el, feladatuk az oxidáció két szénatomos termékeinek szállítása a további átalakításához. A kloroplasztiszokban a foszfoglukolát defoszforillálódik, majd a peroxiszómába kerül, ahol egy további oxigénmolekula felhasználásával glioxiláttá alakul, a reakció további terméke egy hidrogén-peroxid molekula, melyet a kataláz nevű enzim vízre és oxigénre bont.

A glioxilát ezután kötődik egy glicinhez, majd a mitokondrium mátrixába kerül, ahol két ilyen molekulából szén-dioxid és ammónia keletkezése közben egy szerin molekula alakul ki. A szerin visszakerül a peroxiszómába, ahol deaminálódik gliceráttá, majd továbbmegy a kloroplasztiszba, ahol foszforillálódik, és ismét felhasználhatóvá válik a Calvin-ciklus számára. Ezen reakciósorozat nagyban lecsökkenti a fotoszintézis hatékonyságát.

A SZÉNSAV-ANHIDRÁZ SZEREPE A FOTOSZINTÉZISBEN

A légkörben, és ezzel egyetemben a növények mezofil sejtjeiben igen alacsony a CO_2 koncentrációja, ezért szükség van valamilyen mechanizmusra a koncentráció növelésére. Mivel a sejtnedvben a szén-dioxid oldott formában, valamint egyéb karbonátionok formájában van jelen, ezért már pusztán azzal is növelhető a CO_2 mennyisége, ha a CO_2 -t hidratálva karbonátokat alakítunk ki. Ugyanakkor a Rubisco enzim csak a vízben oldott CO_2 -t



10. ábra: A szénsav-anhidráz enzim szerepe a fotoszintézisben (C3)

képes felhasználni. További feladata az enzimnek az, hogy a sejtnedvben oldott CO_2 -t a kloropalsztisz bázikus közegébe egyszerűbb hidratált formában átjuttatni a kloroplasztisz membránján keresztül [20].

A keresett enzim ennek megfelelően több helyen is megtalálható a kloroplasztiszokon belül: A sztrómában található enzim alakítja át a karbonátokat CO_2 -dé, míg a tilakoid membránjához rögzített enzimek a membrán két oldala között található protongradiens hatására növelik a karbonát formában tárolható szén mennyiségét, mely szenet a gránumokon belül tárolnak.

AZ ELEDIG HASZNÁLT FELTÁRÁSI ELJÁRÁSOK ÖSSZEFOGLALÁSA

A következőekben azon, szénsav-anhidráz előállítására vonatkozó módszereket foglaljuk össze, melyek növényi alapanyagokat használnak. Azért fontos ezt a megkülönböztetést megtenni, mivel a tradicionálisnak nevezhető – vérből történő – előállítási módszerek teljesen mások, hiszen a vértetek felbontása úgymond egyszerűbbnek nevezhető feladat, mivel itt nem kell a szövetet felbontani, a sejtek külön állnak, valamint fontos kiemelni azt is, hogy a vértetek nem rendelkeznek a növények nehezen áthatolható sejtfalával.

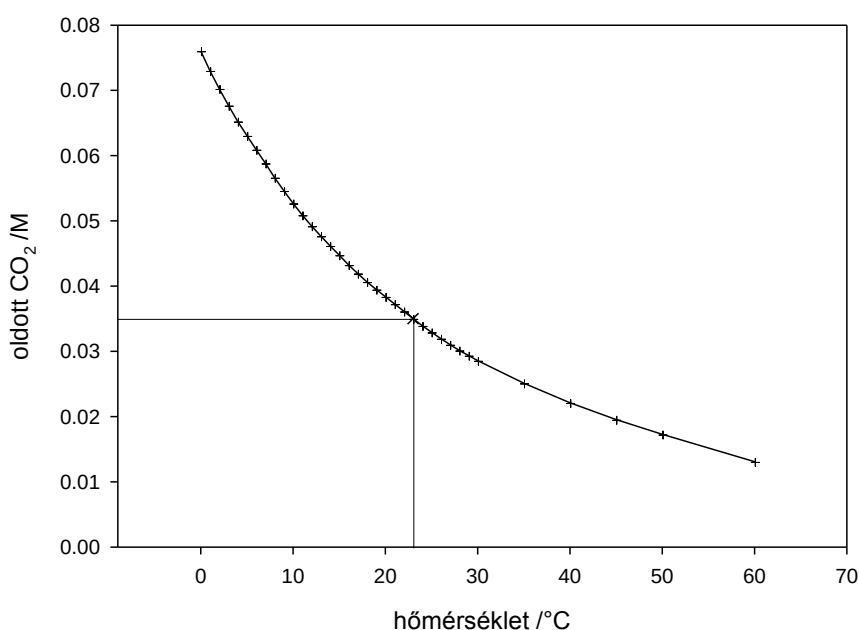
A sejtek feltárására több módszer is ismeretes, amelyek során a növényi mintát először mossák, majd egy nagyobb méretű homogenizátorban meghatározott ideig, valamilyen puffer jelenlétében darálják. Az így kapott viszkózus folyadékot először leszűrik, majd a leszűrt oldatot meghatározott ideig centrifugálják. Bár a módszer igen egyszerű, hátránya, hogy a homogenizátor csak korlátozott mértékben képes a sejszintű rombolásra, valamint a szűrés során úgyszintén fellép némi veszteség [21-23].

A másik, igen gyakran használt módszer során a növényi alapanyagot folyékony nitrogénnel fagyasztják, majd mozsárban porrá őrlik. A módszer igen hatásosan végez sejszintű feltárást, ám a hozzá szükséges anyagoknak mind a beszerzése, mind használata bonyolult, nagy körütekintést igényel, valamint rendkívül időigényes [24-29].

Egy további módszernél Triton X-100t alkalmaznak a feltárásnál, mely detergensként segít a sejtfalak feltárásánál. [30].

2.3 AZ ENZIMAKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSÁNAK HÁTTERE

Mivel a katalitikus reakciókban az anyagok átalakulásának az egyensúlyi állandója nem, csupán annak sebessége változik, ezért fontos információ a szén-dioxid adott oldószerben – jelen esetben víz – különböző hőmérsékleten és nyomáson való oldhatósága. A Henry-törvénynek megfelelően a CO_2 tiszta vízben való oldhatósága is növekszik a hőmérséklet függvényében, a legmagasabb értéket $0\text{ }^\circ\text{C}$ -on éri el [31].



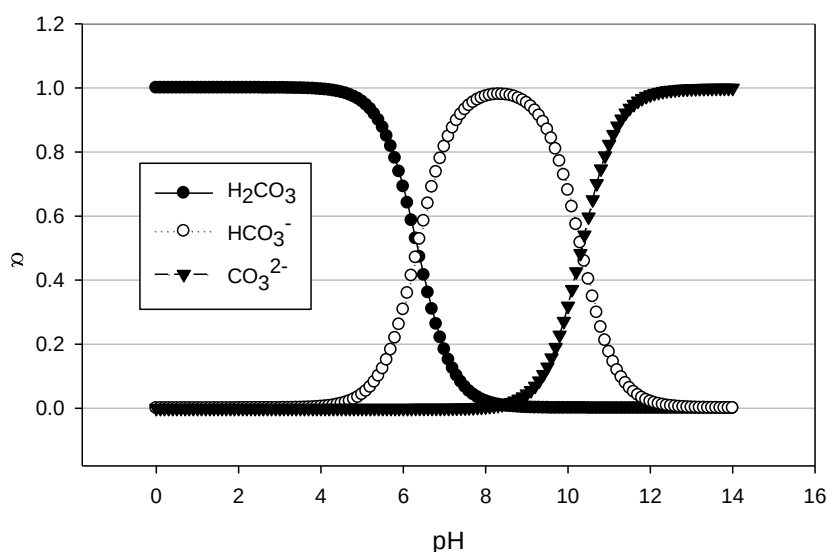
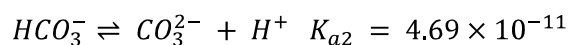
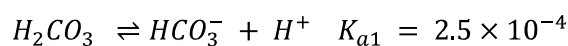
11. ábra: A CO_2 oldhatósága a hőmérséklet függvényében, 1 atm. nyomáson

Egyensúlyban lévő rendszer esetén a szén-dioxid, a belőle keletkezett szénsav, valamint a szénsav deprotonálódásából származó termékek mennyisége állandó. A 12. ábrán látható, hogy a 4 és az alatti pH értékeken csak H_2CO_3 található a rendszerben, míg 8-9 közötti értéken gyakorlatilag csak HCO_3^- .

Belátható tehát, hogy ha a ~4-es pH-jú szénsav-oldatot egy ~8-a pH-jú pufferhez öntjük – mely törekszik a pH-t állandó értéken tartani – akkor a rendszerben található H_2CO_3 spontán deprotonálódik HCO_3^- -tá. Ez azt eredményezi, hogy a rendszerben felborul a vízben oldott szén-dioxid/szénsav egyensúly, mely visszaállni törekszik azáltal, hogy az oldott CO_2 szénsavvá alakul.

A reakciók egyensúlyi állandói a következők:

$$\frac{[H_2CO_3]}{[CO_2]} = 1.70 \times 10^{-3} (k_h)$$



12. ábra: A szénsav és származékainak eloszlása a pH függvényében

Ezen reakcióállandókból kialakítható az 12. ábra.

A szén-dioxid hidratálódásának sebessége a spontán deprotonálódáshoz képest rendkívül lassú. Ezt a hidratálódási reakciót katalizálja az általunk vizsgált enzim. Az előzőek alapján kijelenthetjük ugyanakkor, hogy a reakció folyamán keletkező HCO_3^- ha csak kis mértékben is, de csökkenti az oldat pH-ját, mely csökkenés sebessége azonos a szén-dioxid hidratációjával [32].

A folyamat kinetikájának vizsgálatához szükséges annak ismerete, hogy pontosan mi is történik a rendszerben. Kezdetben, a különválasztott oldatok közül a CO_2 -vel telített vizet vizsgálva megállapíthatjuk, hogy abban a Henry-törvénynek megfelelően kialakul a vízben oldott szén-dioxid – szénsav egyensúly. Ez a $K_h = 1,7 \cdot 10^{-3}$ Henry állandó és a szén-dioxid 23°C-on vett oldhatóságának (0,035 M) figyelembevételével azt jelenti, hogy 4,5 cm³ telített vízben $1,575 \cdot 10^{-4}$ mol oldott szén-dioxid, valamint $2,68 \cdot 10^{-7}$ mol H_2CO_3 található. Figyelembe véve a 12. ábra tett megállapításainkat azt mondhatjuk, hogy az oldat ekkor savas

kémhatású, ezért a szénsavtól eltérő karbonátszármazékok elhanyagolható mértékben vannak jelen [21].

A reakcióelegy összeállításakor a következő folyamatok játszódnak le: mivel az oldatot hígítjuk, ezért az oldatban megtalálható szén-dioxid és szénsav koncentrációja egyaránt csökken, a reakcióelegybe bejuttatott CO_2 -dal telített víz, valamint a reakcióközeg és az enzimszuszpenzió között fenntartott mennyiségi arányok miatt az elegyben a CO_2 kezdeti koncentrációja mindig 0,01 M. Ami azonban még fontosabb, hogy a puffer hatásának köszönhetően a bázikus pH-n a szénsav azonnal deprotonálódik, ugyanis a 8-9 közötti tartományban a szénsav-származékok majdnem egésze HCO_3^- -t jelent. Ennek következményeképpen felborul a vízben oldott szén-dioxid – szénsav egyensúly, mely fokozatosan elkezd visszaállni oly módon, hogy a vízben oldott szén-dioxid hidratálódik. Mivel a rendszerben megtalálható puffer igyekszik megtartani a pH-t, ezért az elegy mindvégig abban a tartományban marad, ahol a keletkezett szénsav azonnal deprotonálódik, így folyamatos utánpótlásra van szükség belőle, melyet a rendszer a már említett módon a szén-dioxidból pótol [33]. A folyamat egészen addig tart, amíg el nem fogy a kezdetben a rendszerbe juttatott oldott szén-dioxid. Az oldatban található szén-dioxid mennyiségét meghatározhatjuk oly módon, hogy a pH értékekre kapott görbék szélsőértékeit átalakítjuk. Mivel tudjuk, hogy a reakció elején mennyi az oldatban található CO_2 mennyisége, ezt tekintjük a görbe maximumának – mely maximumot úgy kapjuk, hogy levonjuk belőle az oldatok összeöntésekor létrejövő hirtelen pH csökkenést, hiszen az csak az oldatban jelen lévő szénsav deprotonálódásából származik.

A pH változása pH-mérő műszerrel követhető legegyszerűbben.

A másik lehetséges módszer az indikátorok pH-függvényében történő színváltozásán alapszik, melyet fotometriásan lehet rögzíteni. Indikátorként pl. a brómtimolkék lehet alkalmas, mivel annak átcsapási tartománya 7,6-6-os pH értékek között található. Bár megfigyelték, hogy az anyag kismértékű inhibíciós hatást fejt ki a szénsav-anhidrázra, annak mértéke nem olyan nagy, hogy az aktivitás kimutatását megakadályozná [33].

A REAKCIÓRA JELLEMZŐ „k” ÁLLANDÓ MEGHATÁROZÁSÁNAK MENETE

A szén-dioxid szénsavvá történő átalakulása elsőrendű [32], tehát leírható egy exponenciális egyenlettel, melyben az egyetlen változó maga az idő. Az egyenlet minden időpillanatban megadja az oldatban található CO₂ mennyiségét, melyből egyértelműen megadható az oldatba eddig bekerült szénsav mennyisége is. Az egyenletet a

$$c_{t,CO_2} = c_{0,CO_2} e^{-kt}$$

formában írhatjuk fel, ahol c_{t,CO_2} a pillanatnyi, c_{0,CO_2} a kezdeti, míg k a reakció sebességére jellemző állandó. A reakciók végrehajtásánál ügyelni kell arra, hogy a kezdeti koncentráció állandó legyen, amennyiben ez teljesül, úgy a pillanatnyi koncentráció csak a k állandótól függ.

A k állandó meghatározását olyképpen végeztük, hogy a reakciók során kapott adatsorokat egy azonos formájú, de általunk meghatározott függvény azonos időpillanathoz tartozó értékével összehasonlítottuk, majd a legkisebb négyzetek módszerével csak a k állandót változtatva numerikusan addig közelítettük az eredeti adatsort, amíg az eredeti és számított adatpontok különbségének négyzetösszege minimálisra nem csökkent. 4-5 iterációs ciklus elegendő pontosságot nyújt, az általunk használt 100 ciklus biztosította az elérhető legnagyobb pontosságot.

AZ ENZIM AKTIVITÁSÁNAK MEGHATÁROZÁSA

Az aktivitásmérés során a klasszikusnak nevezhető Wilbur-Anderson féle aktivitási egység[34, 35] egy általunk módosított változatát használtuk. Az aktivitás megállapításához meghatároztuk azt az időt, mely a reakció 20%-os előrehaladásától 80%-ig tartott mind a katalizálatlan és a katalizált reakciók alatt, majd a kapott időkből az alábbi képlet segítségével kiszámítottuk az aktivitást.

$$WAU = \frac{(t_0 - t)}{t}$$

Az egyenletben található t_0 idő a katalizálatlan, míg t a katalizált reakció során eltelt időt jelenti. A kapott szám abban az esetben összehasonlíthatóvá teszi a jelenlegi illetve a későbbiekben mérendő adatokat, ha a reakcióelegyet illetve a mérés körülményeit nem változtatjuk. Az egyenletben található t_0 idő a katalizálatlan, míg t a katalizált reakció során eltelt időt jelenti.

3 KÍSÉRLETI ANYAGOK, ESZKÖZÖK ÉS ELJÁRÁSOK

3.1 FELHASZNÁLT ANYAGOK

Kísérleteink során a felhasznált anyagok köre a következőkre terjedt ki: A puffernek Tris-HCl-t (Calbiochem) valamint K-foszfátot (Reanal) használtunk. A feltárás során a puffer mellett szilíciumhomokot adtunk az elegyhez. A fotometriás nyomonkövetési módszerhez brómtimolkék indikátort (Sigma) használtunk. Az enzim kinyerését friss spenótból (*Spinacia oleracea*) végeztünk, melyet a feltárás megkezdéséig lefagyasztva tároltunk.

3.2 KÉSZÜLÉKEK

A kísérletsorozatban felhasznált eszközöket elkülöníthetjük a feltárás valamint az aktivitásmérés során használt eszközökre. A feltárás során egy homogenizátort (13. ábra) használtunk, mely a vágófej eltérő kialakítása miatt már homok nélkül is sejtszintű roncsolást képes végrehajtani, ám emellett kibírja a beleadagolt homok által okozott romboló hatást is. A feltárás során szükséges volt a minták centrifugálása is, amit egy Sigma 4K10 típusú centrifugával végeztünk.



13. ábra: Az általunk használt homogenizátor

Az enzim aktivitásának mérésének két módszerét használtuk, ezek közül az egyik pH mérésen alapult. A kémhatás mérésén alapuló aktivitás meghatározására egy Hanna Instruments HI9318 típusú pH-mérőt használtunk.

A fotometriás mérésekhez egy HACH DR-3900 típusú fotométert használtunk, mely műszer fontos képessége, hogy képes az abszorbancia időbeni változását – bizonyos időbeli felbontásban – rögzíteni.

3.3 METÓDUSOK

A NÖVÉNYI MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE

A feltárás során több módszert is kipróbáltunk, melyek közül kiválasztottuk az optimálisnak tűnőt. Ezen módszerek között szerepelt az enzimes feltátás, mely értékelhető eredmény nélkül zárult, valamint egy nagyteljesítményű homogenizátor bevonásával végzett roncsolás, melyet a következőképpen variáltunk: A mintához adott pufferek között K-foszfátot és Tris-HCl puffert alkalmaztunk, mindkét változatban 0,025 M-os, pH=8,3 értéknél, valamint változtattunk azon is, hogy a keverékhez adtunk-e homokot, avagy sem. A leveleket először apró darabokra vágtuk, majd 2 ml-nyi 0,025M-os Tris-HCl puffert adtunk hozzá grammonként. Az így kapott keverékhez 4 g kvarchomokot adtunk, majd az egészet a homogenizátorba raktuk, és a 4 percig járatuk. Az így kapott viszkózus folyadékot 12.000-es fordulatszámon, 10 percig centrifugáltuk, a folyadékfázist dekantáltuk. Az összegyűjtött folyadékot közvetlenül használtuk az enzim aktivitásának meghatározásához. Az előkészített oldatot ezután két részre osztottuk: az egyik felét meghagytuk aktív mintának, míg a másik felét az oldatban található fehérjék kicsapódásáig forraltuk. Erre az eljárásra azért volt szükség, hogy az inaktív, tehát katalízátlan és a katalizált reakcióelegyek között csupán az oldatban található enzimek aktivitása jelentse a különbséget, az oldatokban azonban minden anyag ugyan az legyen, így ha valami módosítja a reakció lefutását, az mindkét oldattípusban ugyan úgy megjelenik.

A REAKCIÓ VÉGREHAJTÁSÁNAK KÖRNYEZETI KÖRÜLMÉNYEI

Az aktivitás és a reakciósebességi állandó meghatározását légköri nyomáson, 23°C-on végeztük. A reaktorokat – a küvetákat is – a reagensek bemérése után azonnal légmentesen lezártuk, megakadályozandó a légköri CO₂ beoldódását, valamint a reaktorok légterében lévő

CO₂ távozását. Minden mérést legalább háromszor ismételtünk, ez a szám a reprodukálhatóság függvényében természetesen növekedhetett.

AKTIVITÁSMÉRÉS FOTOMETRIÁS ELJÁRÁSSAL

Mivel előzetes kísérletek alapján tudjuk, hogy a reakció a kezdeti pH=8,3 tól ~6-ig csökken, ezért a fotometriás méréshez kézenfekvőnek tűnik egy olyan indikátor használata, melynek átcsapási tartománya ezeken a határokon belül van. Az általunk választott indikátor a brómtimolkék lett, mivel átcsapási tartománya pontosan a már említett pH értékek közé esik. A mérési hullámhossz meghatározását oly módon végeztük, hogy az enzimből (0,3 ml) pufferből (1,2 ml) és desztillált vízből (0,6 ml) készült vakkal szemben két mintát mértünk: Az egyik mintával a reakció kezdeti szakaszát modelleztük: az elegyben a vak összetétele mellé indikátort cseppentettünk. Ezzel elértük azt, hogy az oldatnak olyan kék színe legyen, mintha a reakció még nem kezdődött volna el – és persze ennek színe nem változott meg az idővel. A második mintába a desztillált víz helyett szén-dioxiddal telített vizet kevertünk, majd megvártuk, míg a reakció végbemegy, kialakul az indikátor által generált sárgás szín. Az így nyert oldatot fotometráltuk. A hullámhossz-pásztázásokból megállapítottuk, hogy a mérésre legalkalmasabb hullámhossz a 616 nm-es tartomány, mivel az egész hullámhossztartományon elvégzett pásztázás során megállapítható volt, hogy ezen az értéken a legnagyobb az abszorbanciák közötti különbség a reakció elején és végén.

A hullámhossz értékének meghatározása után a méréseket a következőképpen végeztük: az előkészített küvetába egyszerre beleengedtük a három komponenst: az indikátorral előre elkevert puffert (0.025 M Tris-HCl, 1,2 ml) az enzimsuszpenziót (0,3 ml), valamint a szén-dioxiddal telített oldatot (0,6 ml), majd ezt gyorsan összeráztuk, behelyeztük a fotométerbe, és azonnal elindítottuk a mérést. A félfolyamatos rögzítés során 10 másodpercenként mentettük az abszorbanciaadatokat. A kapott értékekből a már ismertett numerikus módszerrel határoztuk meg a k állandó értékét.

AZ ENZIM AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA pH-METRIÁS MÓDSZERREL

A pH mérésen alapuló eljárások közül a kinetika felvételéhez szükséges görbéket egy Hanna Instruments HI-9318 típusú pH mérőt használtunk, melyet számítógépre kötve a kapott adatokat másodpercenként rögzítettük. A kísérleti oldat összetétele arányaiban nem változott: 12 ml puffer, 6 ml CO₂-os oldat, és 3 ml enzimsuszpenzió. A megnövelt méretek a reaktor méretei miatt indokoltak. A mérés során a reaktorba előszűr beletöltöttük a felhasznált puffert

oly mértékig, hogy a pH elektród már elmerüljön benne, és így folyamatosan képes legyen rögzíteni a bekövetkező változásokat. A puffer betöltése után elindítottuk a mérést, majd egyszerre a reaktorba vezettük az enzimet tartalmazó oldatot és a CO_2 -dal telített vizet. Mivel a mérés ekkor már folyik, a kialakuló pH-idő görbén pontosan meghatározható a reakció kezdetének ideje. Az oldatban található szén-dioxid mennyiségét meghatározhatjuk oly módon, hogy a pH értékekre kapott görbék szélsőértékeit átalakítjuk. Ez abban nyilvánul meg, hogy mivel tudjuk, hogy a reakció elején mennyi az oldatban található CO_2 mennyisége, ezt tekintjük a görbe maximumának – mely maximumot úgy veszünk, hogy levonjuk belőle az oldatok összeöntésekor létrejövő hirtelen pH csökkenést, hiszen az csak az oldatban jelen lévő szénsav deprotonálódásából származik. Mivel tudjuk azt is, hogy a reakció végén az összes oldott CO_2 eltűnik, ezért a görbe minimuma lehet a nulla pont. Így egy olyan görbéhez jutunk, mely minden időpillanatban megmutatja nekünk az oldatban található oldott CO_2 mennyiségét. Ha ezekre a görbékre illesztünk egy függvényt, akkor kialakítható egy olyan egyenlet, mely csak egy, a reakcióra jellemző állandóban különbözik egymástól. Ezen állandók ismeretében meghatározható a kinyert enzim hatékonysága.

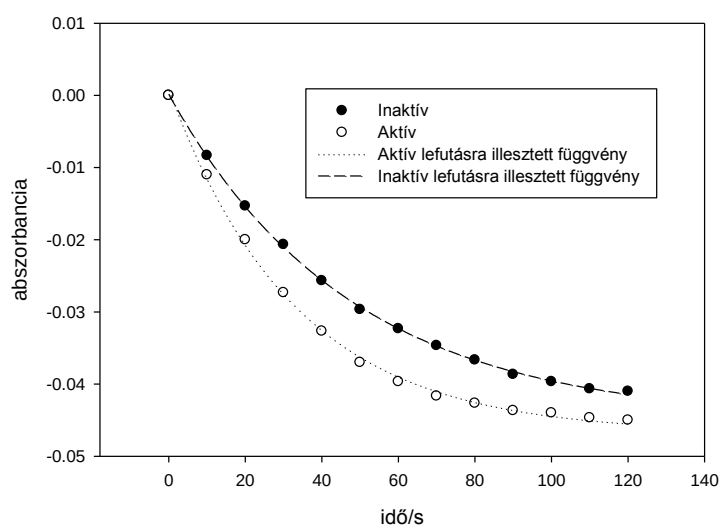
4 EREDMÉNYEK

4.1 A FOTOMETRIÁS ELJÁRÁS SORÁN NYERT EREDMÉNYEK

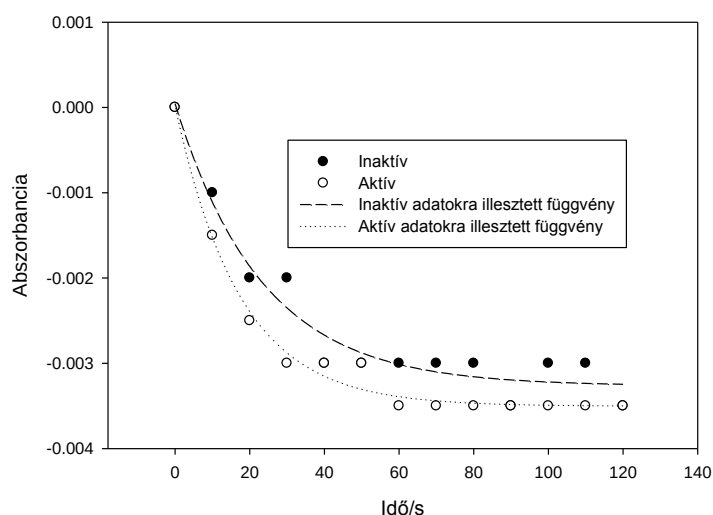
Mindenekelőtt egy fotometriás eljárással kívántuk meghatározni a növényi mintából nyert preparátum szénsav-anhidráz aktivitását. Ehhez brómtimolkék indikátort használtunk. Méréseket végeztünk az eredeti minta, annak tízszeresére, illetve százszorosára hígított változatával is. A 14. ábra az eredeti oldat 100-szoros hígításának aktív és inaktív lefutását szemlélteti az idő függvényében ábrázolva. A mért abszorbanciaadatokat a jobb átláthatóság érdekében nullára rendeztük. A mért pontokra függvényeket illesztve megállapítottuk, hogy az inaktivizált enzimet tartalmazó oldat sebességi állandója $k=0,0212 \text{ 1/s}$, míg az aktív enzimet tartalmazó oldattal ez az állandó $k=0,0303 \text{ 1/s}$. A két állandó hányadosa $\sim 1,43$ -nak adódott.

Egy másik mérés során felvett adatokat a 15. ábra mutatja. Bár a tendenciák az elvártnak megfelelően alakulnak, látható hogy ebben az esetben a mért adatok és az illesztett görbék között jelentős eltérések vannak. Az inaktív lefutás sebességi állandójára $k=0,043 \text{ 1/s}$ -ot, míg az aktív lefutásra ugyan ez az érték $k=0,0577 \text{ 1/s}$ -lett. Az enzim WA aktivitása 0,95-nek adódott.

Az általunk használt aktivitásmérési és nyomonkövetési módok közül ez hozta a legkevésbé megbízható eredményeket, ugyanis a mérések reprodukálhatóságát nagymértékben csökkentette több tényező is. Ezen tényezők között szerepelt az időbeli felbontás gyengesége – a műszer legkisebb mérési intervalluma 10 másodperc – valamint azon tény, hogy az általunk használható fotométer nem rendelkezik átfolyósos reaktorrall, így a reakció beindítása csak oly módon vált lehetségessé, hogy az elegyet még a fotométeren kívül összeállítottuk, majd amilyen gyorsan csak lehetett, behelyeztük a küvettát a fotométerbe, majd elindítottuk a mérést.



14. ábra: A fotometriás eljárás során a minta 100X-os hígításával kapott görbék



15. ábra: A fotometriás eljárás során a minta 100X-os hígításával kapott görbék egy másik mérés során

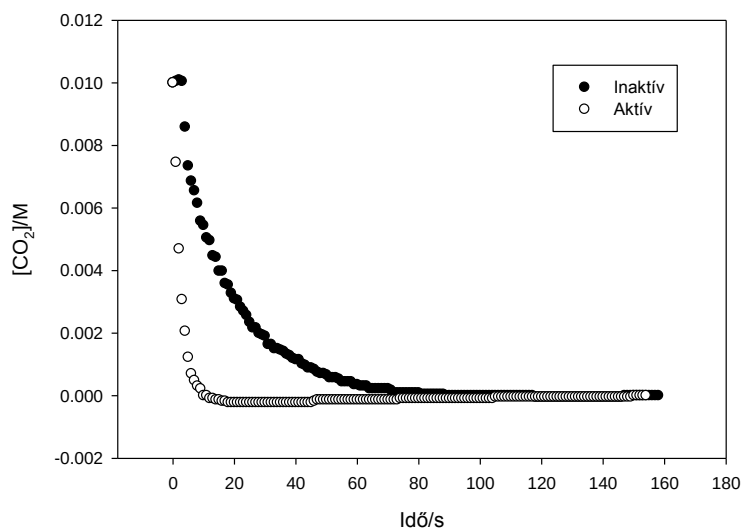
A mérési eredményeink alapján úgy tűnt, hogy ez a módszer nem megfelelő a reakció nyomkövetésére, mivel a katalizált reakció csupán néhány másodperc alatt teljesen lefut, így teljesen az egyéni „ügyességünktől” függött az, hogy a maximális, induló értékek hol helyezkednek el. A készítmény 10X-es, majd 100X-os hígításakor a kapott eredmények jobban használhatónak tűntek, ám még így sem találtuk elég megfelelőnek őket a pontos számítások elvégzéséhez.

4.2 A pH-METRIÁS MÓDSZER EREDMÉNYEI

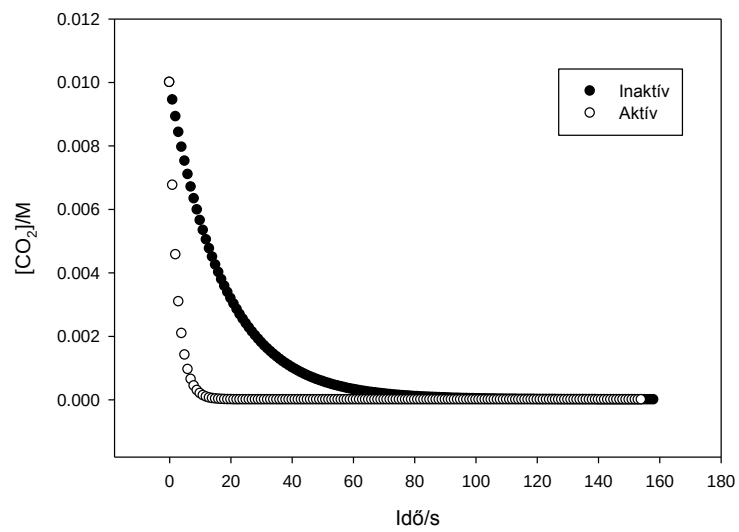
Az enzim aktivitását a fotometriás eljárással megegyező oldatösszetétel mellett végeztük (1 rész enzim, két rész CO₂-es víz, 4 rész puffer) kétféle módon fejeztük ki. A pH-változást az idő függvényében másodpercenként rögzítettük, majd a kapott görbe felhasználásával kiszámoltuk az oldatban pillanatnyilag megtalálható szén-dioxid mennyiségét. Az oldott CO₂-idő függvényből már meghatározhatóak a reakcióra jellemző sebességi állandók, melyeket a katalizálatlan reakció sebességi hányadosával osztva egy olyan értéket kapunk, mellyel – amennyiben mindig megtartjuk a reaktorba adagolt reagensek arányát – jellemezhetjük a katalizált reakció sebességét. A minta Wilbur-Anderson egységekben (WAU) kifejezett ativitását a kapott görbékől visszszámolt időegységek alapján határoztuk meg.

A NYERS MINTA „k” ÁLLANDÓJÁNAK ÉS AKTIVITÁSÁNAK MEGHATÁROZÁSA FOSZFÁT-PUFFERBEN, HOMOK FELHASZNÁLÁSA NÉLKÜL

A mérésnél mind a feltárás során, mind a reakció végrehajtása során 0,025 M-os K-foszfát puffert használtunk fel. A reakciót 23 °C-on végeztük. Eredményeink alapján a vak, valamint az aktivitással rendelkező 3 ml mintára kapott k értékek rendre 0,057 1/s és 0,3915 1/s, ezeknek hányadosa pedig ~6,86 lett. A mérés során kapott eredményeket a 16. ábraán, míg a belőlük képzett függvényeket a 17. ábraán láthatjuk.



16. ábra: A foszfát pufferben, homok nélkül végzett feltárás során nyert adatok

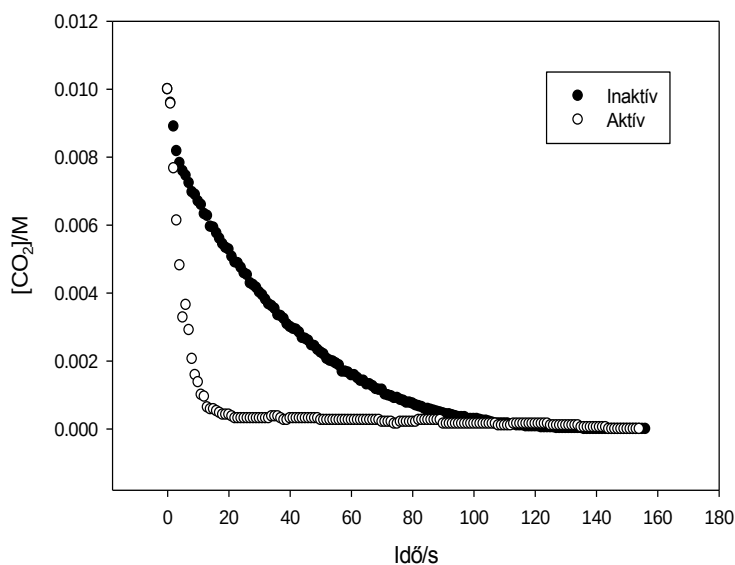


17. ábra: A foszfát pufferben, homok nélkül végzett feltárás során kapott eredményekből kialakított függvények

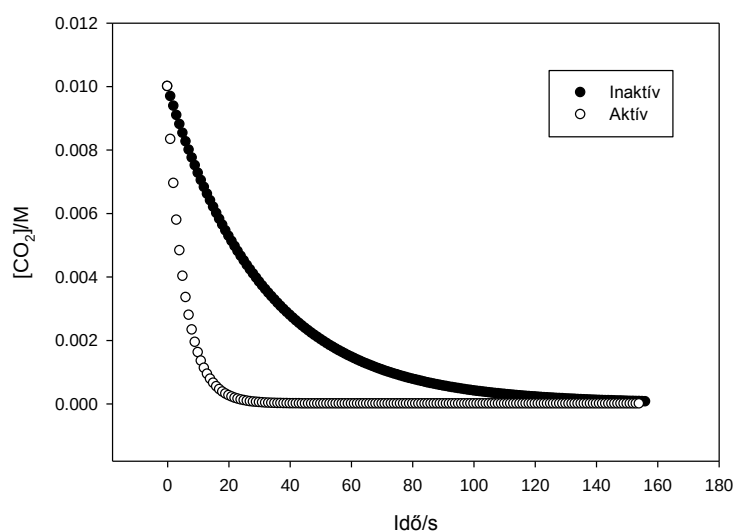
A bemért 3 ml minta aktivitására $WAU=6,37$ -t kaptunk, mely érték, mint ahogy a későbbiekben látni fogjuk, a vizsgált módszerek közül – azonos körülmények között – a legalacsonyabb hatékonyságot mutatta.

A NYERS MINTA „K” ÁLLANDÓJÁNAK ÉS AKTIVITÁSÁNAK MEGHATÁROZÁSA TRIS-PUFFERBEN, HOMOK FELHASZNÁLÁSA NÉLKÜL

A mérés során a felhasznált puffer 0,025 M-os Tris-HCl volt, a feltárás során az oldathoz nemadtunk homokot. A mért, illetve a belőlük képzett adatokat a 19. ábrailletve a 20. ábra mutatja be. A mérés során a 3 ml-nyi aktív minta felhasználásával készült mérésből kapott k állandó értéke 0,182 1/s lett, mely a vakra kapott 0,03012 1/s értéket figyelembe véve, a két adat hányadosa $\sim 3,75$ lett.



18. ábra: A Tris-HCl pufferben, homok nélkül végzett feltárás során nyert eredmények

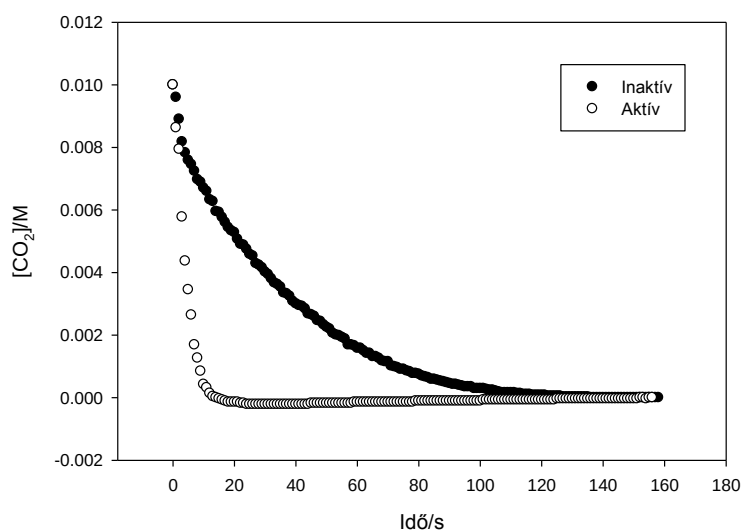


19. ábra: A Tris-HCl pufferben, homok felhasználása nélkül végzett feltárásból származó adatokból képzett függvények

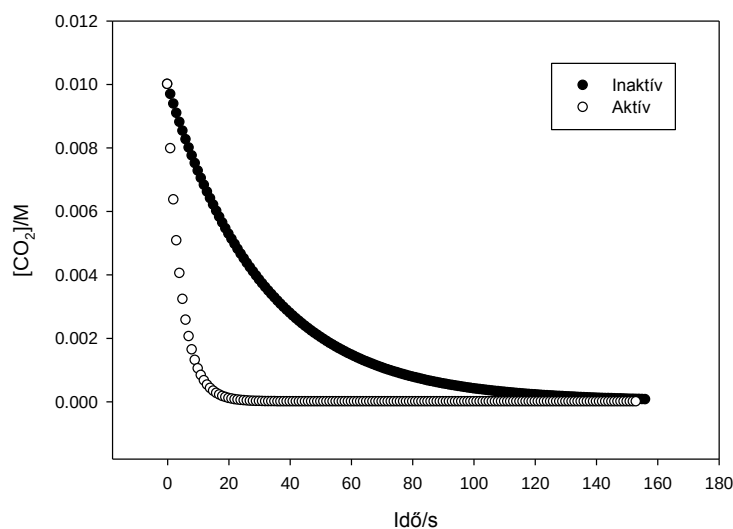
A mérések átlagából megállapítottuk a 3 ml minta aktivitását, mely a Tris pufferben végzett feltárás során $WAU=6,52$ -nek adódott. Adott körülmények között megállapítható, hogy a felhasznált puffer megváltoztatásával mind az aktivitás, mind a reakciósebességi állandó – ha csak kis mértékben is – megnövekedett.

A NYERS MINTA „k” ÁLLANDÓJÁNAK ÉS AKTIVITÁSÁNAK MEGHATÁROZÁSA TRIS-PUFFERBEN, HOMOK FELHASZNÁLÁSÁVAL

Ezen az oldaton a feltáráson és centrifugáláson kívül nem hajtottunk végre egyéb változtatást, a későbbiekben a töményített oldaton végzett aktivitásvizsgálatokhoz nyújt kiindlóponthoz a töményítés hatásfokának megállapításához. A katalizálatlan, valamint a 3 ml készítmény segítségével katalizált reakcióból származó görbe a 20. ábraán látható, míg a belőlük képzett függvényeket a 21. ábra szemlélteti. A katalizálatlan reakció k értékére $k \sim 0,03012$ 1/s adódott, ami az irodalmi 0,0358-as értékkel jól összeegyeztethető [32]. Ebből megállapíthatjuk, hogy a számításhoz használt módszer megfelel céljainknak. A katalizált reakcióra vonatkozó k állandó 0,1481-nek adódott. Ez azt jelenti, hogy a k állandók hányadosa $\sim 7,51$ -et ad, melyből megállapíthatjuk, hogy az eddig vizsgált feltárási módszerek közül ez a leghatékonyabb.



20. ábra: A Tris-HCl pufferben, homok felhasználásával végzett feltárás során nyert eredmények

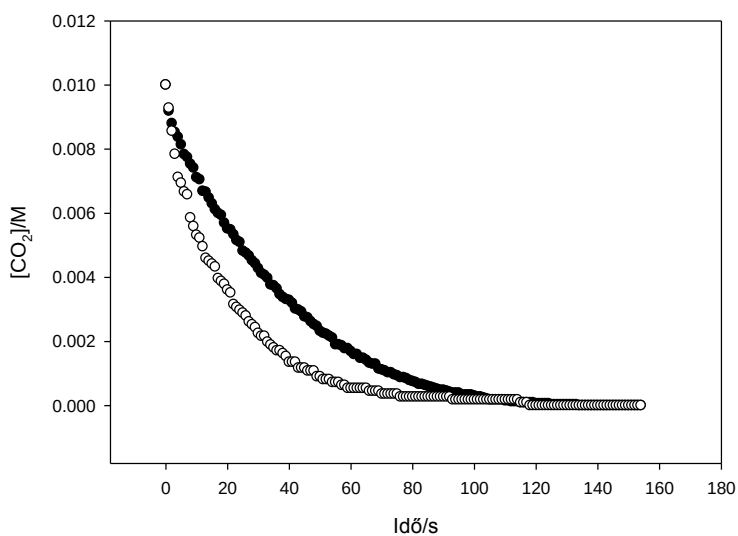


21. ábra: A Tris- HCl pufferben, homok felhasználásával végzett feltárásból származó eredményekből kialakított függvények

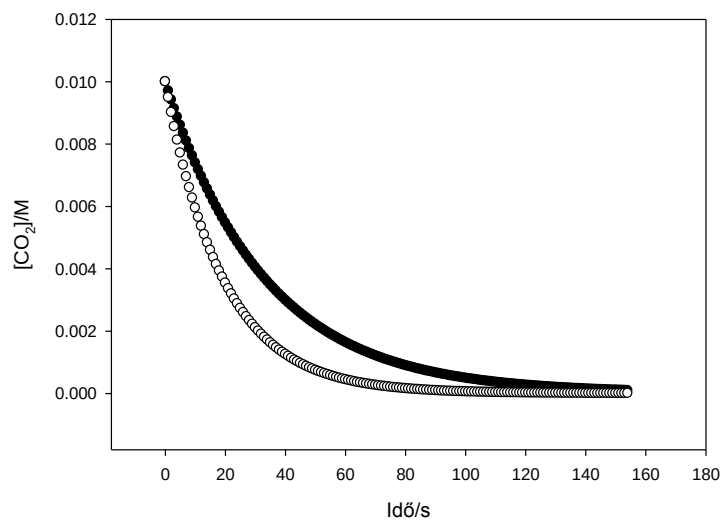
A mérések alapján kiszámolható a 3 ml minta WAU értéke, mely 8,39 lett. Látható, hogy az eddig végzett kísérletek közül ez a módszer mutatta a legnagyobb hatékonyságot, a homok hozzáadásával a kinyert enzim aktivitása majdnem 30%-kal megemelkedett.

A NYERS MINTA TÍZSZERES HIGÍTÁSÁNAK VIZSGÁLATA

Az eredeti készítmény tízszerez hígításával készített oldattal kiszámolt k értéke 0,0518 1/s, lett, a reakcióállandók hányadosa $\sim 1,7$. (21. ábra és 23. ábra).



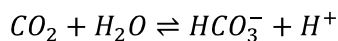
22. ábra: A Tris-HCl pufferben, homok felhasználásával végzett feltárás során nyert minta 10Xeos hígításával nyert adatok



23. ábra: A Tris-HCl pufferben, homok felhasználásával végzett feltárással nyert minta 10X-es hígításából származó adatokból képzett függvények

A nyers minta tízszeres hígításából származó mérési adatok segítségével elvégeztük a hígított minta WAU értékének meghatározását is. A kérdéses érték 0,85 lett, mely az eredeti minta 8,39-es értékének valóban közel tizede. Tehát megállapítható, hogy ez az aktivitásmérési módszer megbízhatóan alkalmazható az enzim aktivitásának a meghatározására.

Ebben a kutatásban a szénsav-anhidráz enzim szerepével, kinyerésével foglalkoztunk. Az enzim a szén-dioxid reverzibilis hidratációját katalizálja óriási sebességgel. A keresett enzim a



reakciót katalizálja. A katalízis olyan mértékű, hogy sokak szerint ez az egyik leggyorsabb ma ismert enzim. A klasszikus eljárásokhoz képest egy sokkal egyszerűbb feltérési módszert alkalmaztunk, melyet megfelelő hatékonysággal sikerült használni.

Kísérleteink során spenót levelek felhasználásával készült extraktum szénsav-anhidráz aktivitásának meghatározását végeztük el. A nyersanyag feltérását változtatott körülmények között végeztük, melyek között szerepelt a feltérési közegként használt puffer (Tris-HCl, K-foszfát), valamint az, hogy a homogenizált oldathoz adtunk-e szilíciumhomokot avagy sem. Az aktivitásmérést szobahőfokon (23°C) végeztük el, a kísérletek során a reakció időbeni lefutását rögzítettük. A kapott adatokból meghatároztuk a kinyert oldatban megtalálható enzim aktivitását valamint a reakcióra jellemző állandókat. Megállapítottuk, hogy a vizsgált módszerek közül a Tris-HCl pufferben, szilíciumhomok felhasználásával végzett feltérás bizonyult a leghatékonyabbnak.

Megállapítottuk továbbá, hogy az aktivitás mérési módszer megfelelő a szénsav-anhidráz készítmény jellemzésére. A növényi nyersanyagból történő kinyerés pedig – optimalizálás után – alkalmas lehet egy ipari felhasználású enzimkészítmény előállítására is.

1. Wang, M., et al., *Post-combustion CO₂ capture with chemical absorption: A state-of-the-art review*. Chemical Engineering Research and Design, 2011. **89**(9): p. 1609-1624.
2. Khalifah, R.G., *Reflections on Edsall's carbonic anhydrase: paradoxes of an ultra fast enzyme*. Biophysical Chemistry, 2003. **100**(1-3): p. 159-170.
3. Gilmour, K.M., *Perspectives on carbonic anhydrase*. Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology, 2010. **157**(3): p. 193-7.
4. Chegwiddden, W.R. and N.D. Carter, *Introduction to the carbonic anhydrases*. EXS, 2000(90): p. 14-28.
5. Lindskog, S., *Structure and mechanism of carbonic anhydrase*. Pharmacology & therapeutics, 1997. **74**(1): p. 1-20.
6. Breton, S., *The cellular physiology of carbonic anhydrases*. JOP, 2001. **2**(4 Suppl): p. 159-64.
7. So, A.K.C., et al., *A Novel Evolutionary Lineage of Carbonic Anhydrase (Class) Is a Component of the Carboxysome Shell*. Journal of Bacteriology, 2004. **186**(3): p. 623-630.
8. Smith, K.S. and J.G. Ferry, *Prokaryotic carbonic anhydrases*. FEMS microbiology reviews, 2000. **24**(4): p. 335-66.
9. McConnell, I.L., et al., *A quantitative assessment of the carbonic anhydrase activity in photosystem II*. Biochimica et biophysica acta, 2007. **1767**(6): p. 639-47.
10. Cuesta-Seijo, J.A., et al., *Structure of a dimeric fungal alpha-type carbonic anhydrase*. FEBS letters, 2011. **585**(7): p. 1042-8.
11. Bernstein, R.S. and R. Schraer, *Purification and properties of an avian carbonic anhydrase from the erythrocytes of Gallus domesticus*. The Journal of biological chemistry, 1972. **247**(4): p. 1306-22.
12. da Costa Ores, J., et al., *Purification of carbonic anhydrase from bovine erythrocytes and its application in the enzymic capture of carbon dioxide*. Chemosphere, 2012. **88**(2): p. 255-9.
13. Mikulski, R.L. and D.N. Silverman, *Proton transfer in catalysis and the role of proton shuttles in carbonic anhydrase*. Biochimica et biophysica acta, 2010. **1804**(2): p. 422-6.
14. Esbaugh, A.J. and B.L. Tufts, *The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates*. Respiratory physiology & neurobiology, 2006. **154**(1-2): p. 185-98.
15. Steiner, H., B.H. Jonsson, and S. Lindskog, *The catalytic mechanism of human carbonic anhydrase C: inhibition of CO₂ hydration and ester hydrolysis by HCO₃⁻*. FEBS letters, 1976. **62**(1): p. 16-20.
16. Conroy, C.W. and T.H. Maren, *Effect of pH on the ocular distribution of a topical carbonic anhydrase inhibitor*. Experimental eye research, 1995. **61**(2): p. 213-22.
17. Esbaugh, A.J., K.M. Gilmour, and S.F. Perry, *Membrane-associated carbonic anhydrase in the respiratory system of the Pacific hagfish (Eptatretus stouti)*. Respiratory physiology & neurobiology, 2009. **166**(2): p. 107-16.
18. Wanjari, S., et al., *Immobilization of carbonic anhydrase on chitosan beads for enhanced carbonation reaction*. Process Biochemistry, 2011. **46**(4): p. 1010-1018.
19. Zhang, S., et al., *Activity and stability of immobilized carbonic anhydrase for promoting CO₂ absorption into a carbonate solution for post-combustion CO₂ capture*. Bioresource technology, 2011. **102**(22): p. 10194-201.
20. Fridlyand, L.E. and V.L. Kaler, *Possible CO₂ concentrating mechanism in chloroplasts of C₃ plants. Role of carbonic anhydrase*. General physiology and biophysics, 1987. **6**(6): p. 617-36.

21. Chersi, A., M. Cortivo, and C. Rossi, *Studies on carbonic anhydrase from spinach leaves - Isolation and properties*, in *BIOCHEM., AND PHYSIOL. ASPECTS* 1969, NASA: Washington DC. p. P 131-140.
22. Tobin, A.J., *Carbonic anhydrase from parsley leaves*. The Journal of biological chemistry, 1970. **245**(10): p. 2656-66.
23. Pocker, Y. and S.Y. Ng, *Plant carbonic anhydrase. Properties and carbon dioxide hydration kinetics*. Biochemistry, 1973. **12**(25): p. 5127-34.
24. Jacobson, B.S., F. Fong, and R.L. Heath, *Carbonic anhydrase of spinach: studies on its location, inhibition, and physiological function*. Plant physiology, 1975. **55**(3): p. 468-74.
25. Moskvina, O.V., et al., *Carbonic anhydrase activities in pea thylakoids*. Photosynthesis research, 2004. **79**(1): p. 93-100.
26. Hatch, M.D. and J.N. Burnell, *Carbonic anhydrase activity in leaves and its role in the first step of C(4) photosynthesis*. Plant physiology, 1990. **93**(2): p. 825-8.
27. Rengel, Z., *Carbonic Anhydrase Activity in Leaves of Wheat Genotypes Differing in Zn Efficiency*. Journal of Plant Physiology, 1995. **147**(2): p. 251-256.
28. Lazova, G.N., T. Naidenova, and K. Velinova, *Carbonic anhydrase activity and photosynthetic rate in the tree species Paulownia tomentosa Steud. Effect of dimethylsulfoxide treatment and zinc accumulation in leaves*. Journal of Plant Physiology, 2004. **161**(3): p. 295-301.
29. Li, X., et al., *Activity and distribution of carbonic anhydrase in leaf and ear parts of wheat (Triticum aestivum L.)*. Plant Science, 2004. **166**(3): p. 627-632.
30. McConnell, I., et al., *A quantitative assessment of the carbonic anhydrase activity in photosystem II*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2007. **1767**(6): p. 639-647.
31. Green, D.W. and R.H. Perry, *Perry's Chemical Engineers' Handbook (8th Edition)*, 2008, McGraw-Hill.
32. Ho, C. and J.M. Sturtevant, *The Kinetics of the Hydration of Carbon Dioxide at 25 Degrees*. The Journal of biological chemistry, 1963. **238**: p. 3499-501.
33. Wilbur, K.M. and N.G. Anderson, *Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase*. The Journal of biological chemistry, 1948. **176**(1): p. 147-54.
34. Anderson, N.G. and K.M. Wilbur, *Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase*. The Anatomical record, 1948. **101**(4): p. 685.
35. Rickli, E.E., et al., *Carbonic Anhydrases from Human Erythrocytes: PREPARATION AND PROPERTIES OF TWO ENZYMES*. Journal of Biological Chemistry, 1964. **239**(4): p. 1065-1078.