

Gyümölcsök konvekciós szárításának modellezése

Modeling of the Convective Drying of Fruits

Modelarea cineticii uscării convective a fructelor

ANDRÁS Csaba Dezső, SZÉP Al. Sándor, BARTÓK Simon

Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem Kolozsvár,
Műszaki Tudományok Intézete-Csíkszereda

ABSTRACT

Fruit sample with different shapes and sizes was drayed in a laboratory convective dryer at constant temperature and constant initial air humidity. Measuring mass loss evolution, we estimate the moisture dependency vs. time and by data analysis we established the exponential kinetic model, specifying their parameters. Graphical method was used also to determine the temperature and shape factor on the drying parameter for different species of fruits (birch, pear and apple). The results were evaluate in 3D graphics model.

Keywords: fruits, convective drying, kinetic model, kinetic parameters

ÖSSZEFOGLALÓ

Megszabott formájú és méretű, különböző fajtájú gyümölcsminták szárítási sebességét mértük egy konvekciós laboratóriumi berendezésben állandó hőmérsékleten és állandó belépő nedvességtartalommal. A minták tömegváltozásából kiszámított nedvesség-idő összefüggésekhez exponenciális modelleket illesztettünk, meghatározva azok paramétereit. Grafikus módszerrel meghatároztuk a hőmérséklet és az alakotényező hatását a különböző állagú gyümölcsök (alma, birs, körte) szárítása esetén. Az eredmények kiértékelésére 3D grafikai modellt használtunk.

Kulcsszavak: konvekciós szárítás, gyümölcs, kinetikai modell, kinetikai paraméter

1. BEVEZETÉS

A vízakaktivitás csökkentésének egyik régóta ismert módszere a szárítás. A kontakt és a hőszugárzáson alapuló szárítás mellett a konvekciós szárítást kíméletesebb volta és nagyobb hatékonysága következtében sok területen alkalmazzák [1]. Ilyen terület az élelmiszeripar, ahol az alapanyagok tartósításától kezdve egészen a termékek minőségének biztosításáig megtaláljuk a technológiai folyamatokban [1,2]. Az ipari szárítóberendezések termelékenységéhez kötött méretezésében nagy jelentősége van a szárítási kinetikának. Ez nem csak a fűtőközeg minőségétől függ, hanem a szárítandó anyag állagától, geometriájától, valamint a hő-, illetve a komponenstranszport sebességétől is [3-5]. Kutatásunk fő célja meghatározni a gyümölcsök konvekciós szárítását leíró matematikai modellt, a forma, a hőmérséklet illetve a növényfajta függvényében egyedi részecskék szárítása esetén.

2. ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS MÉRÉSI PARAMÉTEREK

Méréseinket ugyanazon körülményeken, ugyanannyi időtartamon tárolt jonatan alma, császárkörte és birsalma mintákkal végeztük egy laboratóriumi szárítóban. A konvekciós laboratóriumi, keresztáramlású kamra 610×180×180 mm méretű. A hőmérséklet mérését két pontban végeztük, a kamrába beáramló szárító levegő és a mintatartó feletti tér hőmérsékletét mérve. A kénessavas felületi kezelés után meghatároztuk a minták nedvességtartalmát (De Longi recirkulációs szárítószelekrényt alkalmazva a tömegállandóság meghatározására). A formákat kézi műanyagformázóval alakítottuk ki. A szárítást kocka, henger illetve téglatest alakú mintákkal végeztük izoterm körülmények között, 24, 45, 85 °C hőmérsékleten, állandó abszolút nedvességtartalmú levegővel. A stacionárius állapot tbeálltával, a mintákat a kamrában lévő mintatartóra helyeztük, beindítva a kro-

nométert és a háromtizedes pontosságú mérleget. Meghatározott időintervallumban leolvastuk a minták tömegét és a két hőmérő kijelzését.

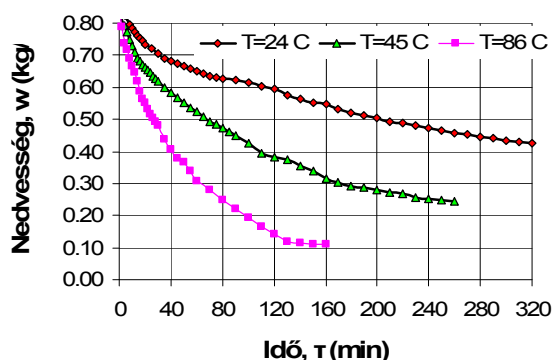
A mért tömegvesztés segítségével, alkalmazva az (1) összefüggést, meghatároztuk a minták adott pillanatban elért nedvességét.

$$w = \frac{m^0 w_{sz} - \Delta m}{m^0 (1 - w_{sz})} \quad (1)$$

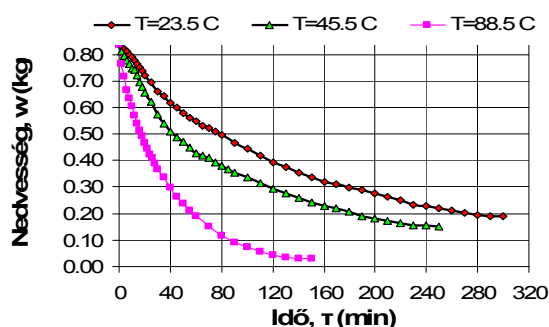
ahol: w_{sz} - a szárítószekrényben mért nedvesség, kg/kg nedves anyag,
 m^0 - a minta kezdeti tömege, g,
 Δm - a mért tömegváltozás, g.

3. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉS

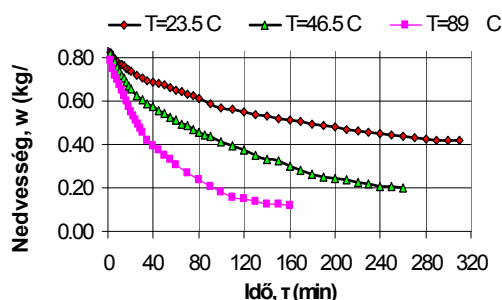
A mérési eredményeket legelőször nedvesség-idő kinetikai görbék formájában dolgoztuk fel. Az 1-3. ábrán bemutatott görbék a hőmérséklet hatását tükrözik a különböző formájú alma minták szárítási sebességére, míg a 4-6 ábrákon az alakhatás hatása van feltüntetve, izoterm szárítási körülmények között. Az ábrákról jól kivehető, hogy a hőmérséklet hatása mindegyik gyümölcs esetén a vártnak megfelelő. Az ábrákból (különösképp a 8. ábrából) megállapítható, hogy leggyorsabban az alma, majd ezt követően a körte és leglassabban a birs minták száradtak. Ez a gyümölcsök különböző állagának következménye. Elemezve az alakhatás hatását a szárítási görbék formájára (egyúttal a becsült szárítási sebességre), megállapíthatjuk, hogy a henger és kocka alakú minták lassabban száradtak, míg a téglatest alakú gyümölcsök gyorsabban veszítették a nedvességet. Ez az egységnyi tömegre vonatkoztatott felület méretével magyarázható, t.i. a téglatest alakú minták fajlagos felülete meghaladta a henger illetve a kocka alakúakét.



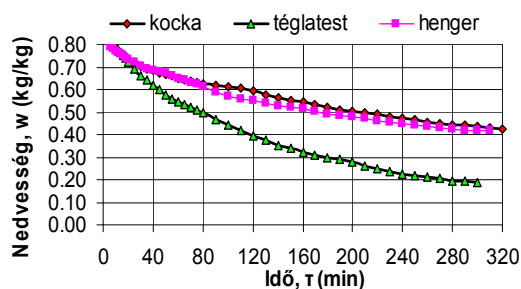
1. ábra
A 21×21×10 mm téglatest alakú
alma szárítási görbéi



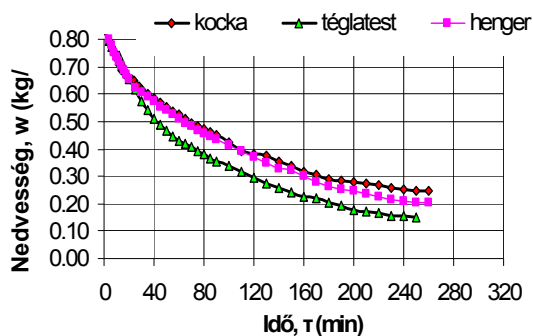
2. ábra
A 26×18 mm henger alakú alma szárítási görbéi



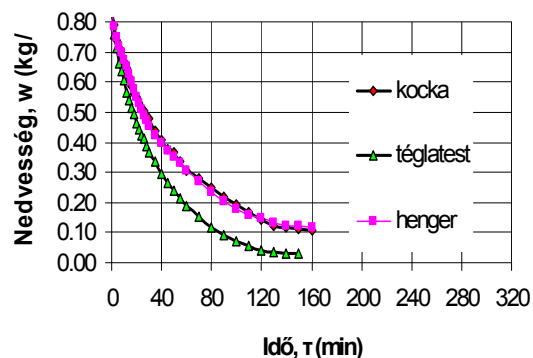
3. ábra
A 13×13×33 mm -es téglatest alakú
alma szárítási görbéi



4. ábra
Különböző alakú almaminta szárítási görbéi,
T=25 °C



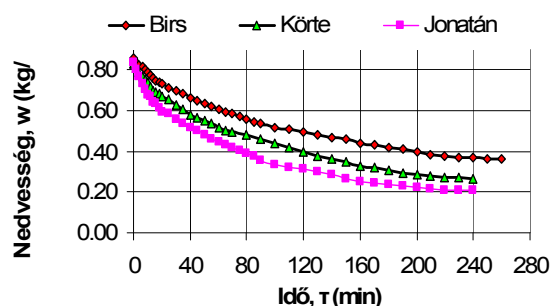
5. ábra.
Különböző alakú almaminta szárítási görbéi,
 $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$



6. ábra.
Különböző alakú almaminta szárítási görbéi,
 $T=85\text{ }^{\circ}\text{C}$

4. A MATEMATIKAI MODELL

Elemelve a szárítási szakirodalmat, azt tapasztaltuk, hogy a mérési eredményeink sem a nedves szemcsehalmoz [3] vagy nedves porózus anyag [6], sőt még a gélek [6] szárítási viselkedéséhez sem hasonlóak. Viselkedésükben, vagyis a nedvesség-idő görbék alakjában inkább egyéb növényi, sejtes felépítésű termékek szárítására utalnak, nagy hasonlóságot mutatva a zöldség- és gombaszeletek szárítási viselkedésével [7, 8]. Ezen megállapítás arra utal, hogy a gyümölcszsárításkor nagyon nehezen lehet elválasztani a nedvesség felületi párolgásának, folyadék belső diffúziójának és a gőzzé alakult nedvesség diffúziójának szakaszait, ami azt jelenti, hogy az állandó sebességű szárítási zóna nagyon rövid idő alatt megszűnik, és a változó sebességű szárítás dominál mindaddig, amíg a zsugorodott sejtfal áteresztőképessége lesz a sebesség meghatározó. A görbék alakjából azt feltételezhetjük, hogy a mérési intervallumban nincs egy olyan szakasz sem, ahol a sebességegyenlet lineáris lenne, kivéve a kezdeti sebesség nagyon rövid szakaszát. A konvekciós gyümölcszsárítási kinetika nagyon sokféle sebességegyenletet alkalmaz. Ezekből ad egy rövid áttekintést az 1. táblázat.



7. ábra.
 $A\ 20\times 19\times 19\text{ mm}$ kockaszerű gyümölcsök
szárítási görbéi, $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$

1. táblázat. Konvekciós szárítási sebességegyenletek

Egyenlet megnevezése	Sebességegyenlet	Forrás
Newton	$W = \exp(-kt)$	[7, 9-14]
Page	$W = \exp(-kt^n)$	[7, 9-14]
Exponenciális	$W = a \exp(-kt)$	[7, 9-14]
Logaritmikus	$W = a \exp(-kt) + c$	[9-14]
Hatvány	$W = 1 + at + bt^2 + ct^3$	[9-11, 13, 14]

Alkalmazva a Page-féle exponenciális modellt, meghatároztuk a (2) sebességegyenletet:

$$\frac{dw}{d\tau} = a \cdot e^{-b\tau} \quad (2)$$

ahol: w – a minta nedvessége (kg nedvesség/kg nedves anyag),
 τ – szárítási időben,
 a, b – modell-állandók.

Nemlineáris numerikus illesztési módszert alkalmazva (Statistica for Windows® 6.0) meghatároztuk minden egyes minta esetében a (2) modellnek megfelelő állandók értékét. Ezek – amint a 2 és 3. táblázatokból jól látható – hőmérséklet- és alaktényező-függőek.

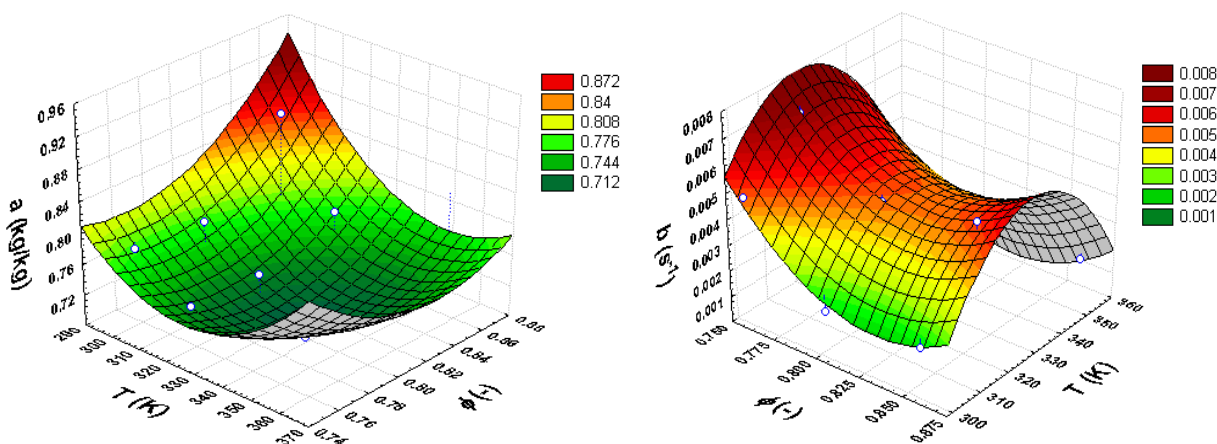
2. táblázat. A hőmérséklet hatása a kinetikai állandókra különböző alakú almaminták esetében.

φ alaktényező	$a = f(T)$	$b = f(T)$
0,806	$a = 4 \cdot 10^{-5} T^2 - 0,0238 T + 4,7085$	$b = -0,0002 T + 0,055$
0,76	$a = 5 \cdot 10^{-5} T^2 - 0,0349 T + 6,5201$	$b = -5 \cdot 10^{-6} T^2 + 0,003 T - 0,4585$
0,8594	$a = -0,0007 T + 0,965$	$b = -0,0002 T + 0,0508$

3. táblázat. Az alaktényező hatása a kinetikai állandókra almaszárítás esetében különböző hőmérsékleten.

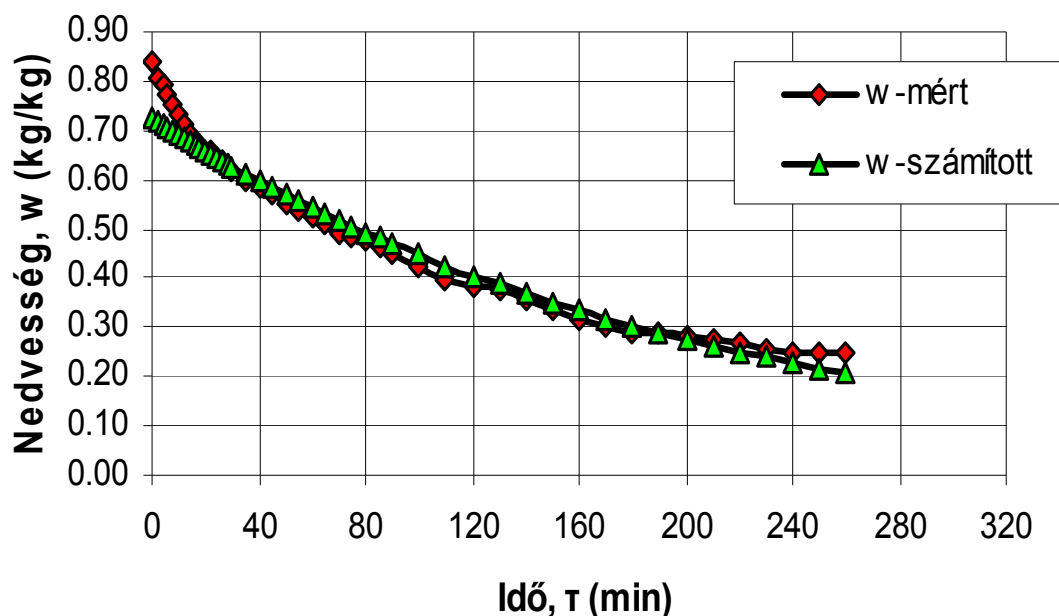
Hőmérséklet, K	$a = f(\varphi)$	$b = f(\varphi)$
298	$a = 1,8221 \varphi^2 - 3,1469 \varphi + 2,1184$	$b = -0,7157 \varphi^2 + 1,1881 \varphi - 0,4947$
318	$a = 3,4572 \varphi^2 - 5,4748 \varphi + 2,8926$	$b = -0,613 \varphi^2 + 1,0078 \varphi - 0,4189$
358	$a = 2,4084 \varphi^2 - 4,2694 \varphi + 2,6074$	$b = -2,0679 \varphi^2 + 3,4514 \varphi - 1,4516$

A 2. illetve a 3. táblázatban feltüntetett hatások együttes ábrázolásából (8. ábra) jól kivehető, hogy míg a preexponenciális állandó egy lokális minimumot eredményez, addig a b változása egy nyereg típusú felületnek megfelelően történik.



8. ábra
A hőmérséklet és az alaktényező befolyása a modell állandóira.

Ennek a kétféle típusú hatásnak köszönhetően a (2) összefüggésből és a 2. illetve a 3. táblázatban meghatározott állandókat definiáló összefüggésekből kialakított modell a kezdeti és végső szárítást kevésbé pontosan írja le, mint a szárítási intervallum többi részét. Ennek ellenére állíthatjuk, hogy a Page-féle kinetikai modell megközelítően jól leírja az alma szárítási kinetikáját. (9. ábra).



9. ábra

A mért és a modell alapján számított értékek összehasonlítása alma esetében.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

- A kísérletek azt bizonyították, hogy a hőmérséklet és a gyümölcsfajta mellett az alaktényezőnek is nagy szerepe van a szárítás kinetikájára;
- A klasszikus száradási kinetikai modellek közül – a belső diffúzió illetve a háromstádiumos modell közül egyik sem írja le pontosan a folyamatot, így a szárítási sebesség matematikai leírására a zöld-ségfélék, gyümölcsök és gombák szárítását leíró exponenciális modell a legmegfelelőbb;
- Az alma esetében meghatározott modell a kezdeti (indukciós) illetve a végső szárítási (belső diffúzió által kontrollált) szakasz kivételével jó megközelítéssel írja le a folyamat kinetikáját, amit a kísérleti és a modellből számított görbék átfedése bizonyít;
- A birsalmának a legkisebb a száradási sebessége, a körte és a jonatán alma száradási görbéi viszonylag közel állnak egymáshoz;
- Míg az a preexponenciális állandó alaktényező és hőmérséklet függése egy minimumot mutató felületet ír le, addig a b időállandó értéke egy nyeregfelületen változik.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] L. Imre: Szárítási kézikönyv. Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1974, 166-244. p.
- [2] R.T. Toledo: Fundamentals of Food Process Engineering. Chapman & Hall, New York, 1994, 210–221.
- [3] J. Beke: Terményszárítás. Agroinform Kiadóház, Budapest, 1997, 45–62. p.
- [4] Z. Gyaraky: A zöldség- és gyümölcsfeldolgozás előkészítő műveletei. Mezőgazdasági Könyvkiadó, Budapest, 1977, 56–70. p.
- [5] E. Szenes: Gyümölcsök és zöldségek szárítása, aszalása. Integra-Projekt Kft, Budapest, 1994.
- [6] S. Tomas, D. Skansi, M. Sokele: Convection drying of porous material. *Ceramics International*, 20 (1): 1994, 9–16.
- [7] A. Vega-Gálvez, R. Lemus-Mondaca, C. Bilbao-Sainz, F. Yagnam, A. Rojas: Mass transfer kinetics during convective drying of red pepper var. Hungarian *Capsicum annuum* L.: Mathematical modeling and evaluation of kinetics parameters. *Journal of Food Process Engineering*, 31(1): 2008, 120–137.
- [8] M. Javanmard, J. Endan, K.A. Abbas, F. Arvin: Development of a semi-industrial multi fruit dryer system using simultaneous intelligent control, *American Journal of Applied Sciences*, 7 (2): 2010, 160–166.
- [9] H.O. Menges, C. Ertekin: Mathematical modeling of thin layer drying of Golden apples. *Journal of Food Engineering*, 77 (1), 2005, 119–125.
- [10] D. Velic, M. Planinic, S. Tomas, M. Bilic: Influence of airflow velocity on kinetics of convection apple drying. *Journal of Food Engineering*, 64 (1): 2004, 97–102.
- [11] S. Jokić, D. Velić, M. Bilić, J. Lukinac, M. Planinić, A. Bucić-Kojić: Influence of process parameters and pre-treatments on quality and drying kinetics of apple samples, *Czech Journal of Food Science*, 27 (2), 2009, 88–94.
- [12] R.K. Goyal, A.R.P. Kingsly, M.R. Mannikantan, S.M. Ilyas: Mathematical modeling of thin layer drying kinetics of plum in a tunnel dryer. *Journal of Food Engineering*, 79 (1): 2007, 176–180.
- [13] E. Meisami-asl, Sh. Rafiee, A. Keyhani, A. Tabatabaeefar: Mathematical modeling of moisture content of apple slices (var. Golab) during drying, *Pakistan Journal of Nutrition*, 8 (6): 2009, 804–809.
- [14] S. Seiedlou, H.R. Ghasemzadeh, N. Hamdami, F. Talati, M. Moghaddam: Convective drying of apple: mathematical modeling and determination of some quality parameters. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12: 2010, 171–178.

Kalcium-karbonát előállítása papíripari tömítőanyag használatra

Synthesis of Calcium Carbonate Particles as Loading Material for Paper Industry

Obținerea carbonatului de calciu utilizabil ca umplutură în industria hârtiei

Dr. HARJA Maria¹, Dr. SZÉP Al. Sándor², Dr. BARBUTA Marinela³,
Dr. CIOCÎNTĂ Ramona Carla¹, Dr. CIOBANU Maria¹

¹ „Gh. Asachi” Műszaki Egyetem, Vegyész- és Környezetmérnöki Kar,
Iași, Bd. Prof. dr. docent D. Mangeron 73, RO-700050

² Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem Kolozsvár, Műszaki Tudományok Intézete,
Csíkszereda, Szabadság tér 1, RO-530104, alszep@sapientia.siculorum.ro

³ „Gh. Asachi” Műszaki Egyetem, Építésmérnöki Kar,
Iași, Bd. Prof. dr. docent D. Mangeron 47, RO-700050,

ABSTRACT

Calcium carbonate is the most widely used mineral in the paper-, plastics-, paints- and coatings industries, both as a filler – and due to its special white color – as a coating pigment. The precipitated calcium carbonate (PCC) has also a great market as food additive. From the well known three polymorphic crystalline forms – calcite, aragonite and vaterite – the first one present great interest as filler in the paper industry. The crystal shape, size and morphology are fundamental in all technical applications. From this reason, we are investigated experimentally the effect of temperature, reactive concentrations and ratio, also the rotation speed on the particle size of PCC formed by double exchange. The particle size distribution was determined using a laser technique, the morphology of the calcium carbonate particles was investigated with scanning electronic microscopy (SEM). The synthesized and characterized PCC was used as paper filler by loading. The obtained paper properties were determined in relation to the used PCC characteristics.

ÖSSZEFOGLALÁS

A kalcium-karbonát egyike a leggyakrabban felhasznált papír-, műanyag- és – fehér színének köszönhetően, – festékipari tömítő- és pigment-nyagoknak. Ugyanakkor a szintetikus, kicsapott kalcium-karbonát, nagy piacnak örvend, mint élelmiszeripari adalékanyag. A három jól ismeret kristálmódosulathoz – kalcit, aragonit és vaterit – az első a legfontosabb, mint papíripari tömítő anyag. Bármely ipari alkalmazásban fontos szerepe van a kristály típusának, alakjának és méretének. Épp ezért vizsgáltuk a különböző paraméterek hatását – hőmérséklet, reagens koncentráció és arány, keverő fordulatszám – a cserebomlási reakcióban kicsapódott kalcium-karbonátra. A kristálméretet és eloszlást lézertechnikával, míg a kicsapódott kalcium-karbonát alakját pásztázó elektronmikroszkópos technikával határoztuk meg. A keletkezett (és jellemző) kalcium-karbonátot papír előállításra használtuk, végül meghatároztuk a különböző kalcium-karbonát mintából előállított papír minőségi tulajdonságait.

Kulcsszavak: kalcium-karbonát, morfológia, részecskeméret, cserebomlási reakció, papírtömítő

1. BEVEZETÉS

A kalcium-karbonát a papír-, a műanyag-, a festék- és bevonatok iparban legszélesebb körben alkalmazott ásványi anyagok egyike. Főleg töltőanyagként, és sajátos fehér színe következtében, mint pigment használják [1-3]. A papíriparban, ahol a magas fényerő és a fényszórás jellemzőit értékelik, olcsó töltőanyagként alkalmazzák, főleg a fényes, sima papír előállításában [4-6]. Ugyanakkor a kalcium-karbonát a festékipar kedvelt pigmentje, hisz több mint 30%-os részaránya is lehet a festékben. Ugyancsak széles körben alkalmazzák ragasztók töltő- illetve tömítőanyagaként [7, 8]. A kalcium-karbonát leggyakoribb kristályváltozatai a kalcit és aragonit. A vaterit kevésbé stabil polimorf változat, amely általában kis mennyiségben keletkezik [9]. A kalcit

a környezeti hőmérsékleten és nyomáson termodinamikailag stabilabb, mint az aragonit. Hasonló kristályszerkezetűek, mivel a kalcium-ionok szinte ugyanabban a rácspozícióban (001) találhatók mindkét változat esetében [10]. A fő különbséget a két polimorf változat között a karbonát-ionok helyzete adja.

A papíriparban szuszpenzió előállítására a kalcit kristályformát kedvelik. Ezt a kristályváltozatot a természet nagy bőségben szolgálja mészkő, márvány és kréta formájában. E három közül a kréta messze a legpuhább és a legkönnyebben alakítható töltőanyag.

A töltőanyagként alkalmazott természetes kalcium-karbonát minősége javult az évek során, hisz a termelők képesek a kívánt, szűk szemcseméret-tartományba beillő és kevés kvarchomokot tartalmazó mellékanyag előállítására. Vegyi úton azonban sokkal stabilabb alakú, szűkebb szemcse-méret-tartományú, egynemű töltőanyagot lehet előállítani. Épp ezért a természetes kalcium-karbonát féleségek mellett egyre nagyobb mennyiségben használják a kicsapott kalcium-karbonátot (PCC). Számos tanulmány kimutatta, hogy a PCC tulajdonságai, mint például a részecskeméret és alak, erősen függ a kicsapási folyamat paramétereitől [2, 11-13]. A nagymennyiségű kicsapott kalcium-karbonát előállítása két módszeren alapszik [14-18]. Egyik a cserebomlási reakció, amelyben a kalcium-klorid vagy kalcium-nitrát oldatot nátrium-karbonát vagy ammónium-karbonát oldattal kezelik, a másik pedig a mésztej illetve az oltott mész szuszpenzió széndioxiddal való telítése.

A PCC előállítása történhet egyéb, vízben oldódó kalcium-sók alkalmazásával is különböző szerves adalékanyagok jelenlétében [1, 19-22]. Az oltott mész szuszpenzióra alapuló módszer esetében, a körülményektől függően, a csapadék lehet kalcit, aragonit vagy vaterit. Formájukat tekintve, a részecskék lehetnek akár rozetta, romboéderes, vagy más formájúak. Amikor a csapadék aragonit kristályos kalcium-karbonát, akkor a részecskék általában tűszerű formát öltenek. Meg kell jegyezni, hogy bár e módszer elég egyszerű – ha jó minőségű mészkővel dolgozunk –, ellenben a kristálméret és kristályféleség elég nehezen szabályozható.

Ebben a tanulmányban a kalcium-karbonát nanorészecskék szintéziséhez vegytiszta kalcium-klorid és nátrium-karbonát vizes oldatát használtuk. Kísérleteink során vizsgáltuk a reaktív adagolási aránynak és a koncentráció hatását a nukleáció kezdetére valamint a keletkezett kristályok morfológiájára, meghatározott keverési intenzitáson és hőmérsékleten. Ugyanakkor követtük az irodalomban jelzett aggregáció megjelenését is [23] különböző reakciókörülményeken.

A kicsapásos módszerrel előállított kalcium-karbonát nanorészecskéket laboratóriumszintű papírgyártáshoz alkalmaztuk, meghatározva a részecskék morfológiájának és méretének hatását a papír minőségére.

2. KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

A kísérleteink két célt követtek, egyrészt a kalcium-karbonát nanorészecskék előállítási körülményeinek meghatározását, másrészt felmérni a jellemzett töltő anyag alkalmasságát a papír előállítására és befolyását annak tulajdonságaira.

A kalcium-karbonát szintézise: a kalcium-karbonát szintézisére cserebomlási reakción alapuló módszert alkalmaztunk. A szintézist laboratóriumi üstreaktorban végeztük, az 1. táblázatban feltüntetett körülményeken. A keletkezett kalcium-karbonát jellemzésére IR-spektrometriás, termogravimetriás és vegyi elemzési módszereket alkalmaztunk. Mivel a papír előállításában fontos szerep hárul a részecskék alakjára és annak méretére, elektronikus mikroszkópiával (SEM Vega Tescan a 30 kV) meghatároztuk a kalcium-karbonát alakját és méretét. A szemcseméret-eloszlást, az aglomerátumok roncsolása után, egy SALD-7001 típusú lézeres difraktométerrel határoztuk meg.

A papír előállítása és jellemzése: A papír előállításra a Valley Hollander típusú homogénezőbe 30 °SR minőségre beállított cellulóz szuszpenzióba, keverés közben, beadagoltuk a lemerített kalcium-karbonátot, biztosítva a paszta-minta szárazanyagra számított 30%-os CaCO_3 -tartalmát. Majd a Rapid-Köthen típusú készülékben előállítottuk a 70 mg/m² fajlagos tömegű papírt, és jellemeztük azt.

1. táblázat. A kalcium-karbonát előállítási körülményei.

Minta	Reakció paraméter			Fordulatszám min ⁻¹	Reagens arány
	$C_{CaCl_2}^0$ g/L	$C_{Na_2CO_3}^0$ g/L	T, °C		
A1	80	90	80	500	0,88
A2	250	90	80	500	2,77
A3	80	190	80	500	0,42
A4	250	190	80	500	1,31
A5	165	140	55	100	1,17
A6	250	190	30	100	1,31

Anyagok: cellulóz szuszpenzió, kalcium-karbonát

Mérések: Az előállított papírlapokat 24 órán át 50% relatív nedvességű környezetben előkezeltük, majd ezt követően meghatároztuk a kalcium-karbonát összetételt az 1999 TAPPI vizsgálati módszerek szerint (TAPPI Standard - T413). A papír fényességét és áttetszőségét az L&W Elrepho 2000 típusú spektrofotométerrel mértük az ISO 2471 szabvány szerint. A papír szilárdsági tulajdonságai közül az önszakadási hosszúságot az Instron-műszerrel az ISO 1924 szabvány szerint, az átszűrési tényezőt Schopper-Dale készülékkel az ISO 2758 szabvány szerint mértük.

3. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKEELÉS

A laboratóriumi körülmények között előállított és kondicionált papírlapok fizikai és mechanikai tulajdonságait mérve, meghatároztuk a főbb jellemzőket (lásd a 2. táblázatot).

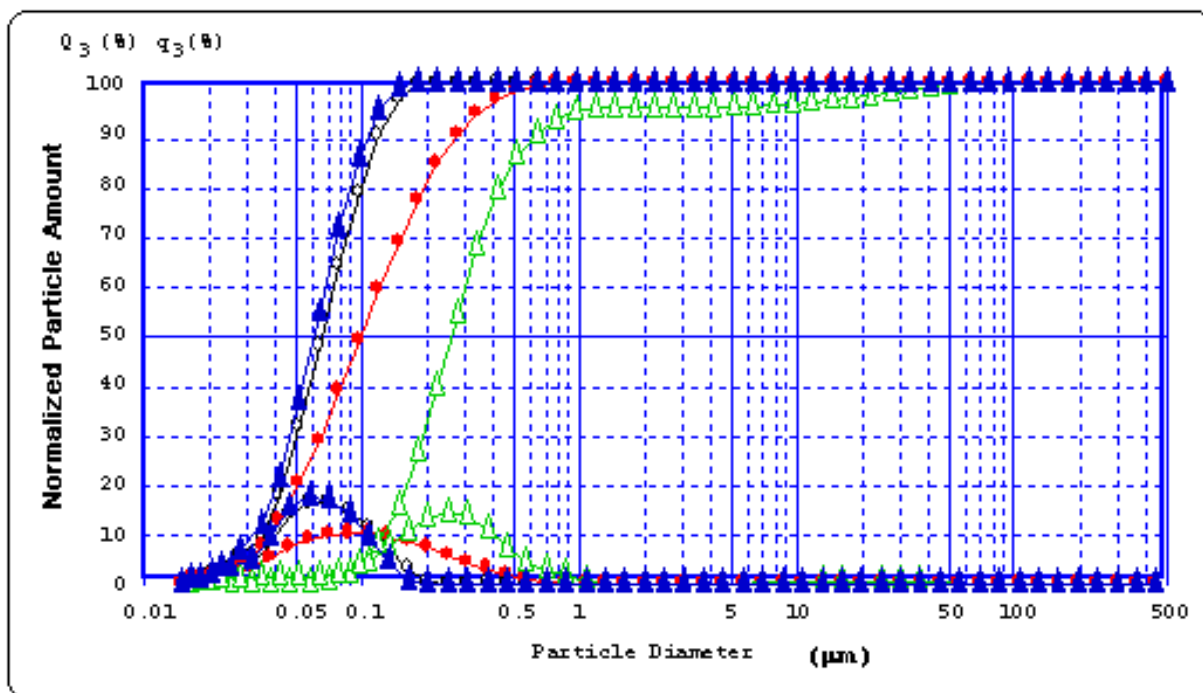
2. táblázat. A papír jellemzői.

Minta	Fajlagos tömeg g/m ²	Vastagság mm	Sűrűség kg/m ³	CaCO ₃ %	Fehérség %	Áttetszőség %	Önszakadási hossz, m	Átszűrési tényező kPa.m ² /g
A0	72,12	0,10	655	0,37	82,56	82,36	6526	3,81
A1	72,72	0,12	606	7,63	87,98	85,26	5692	3,61
A2	71,39	0,12	595	7,90	91,00	87,52	4912	3,39
A3	72,30	0,12	602	7,92	91,40	85,33	4615	3,61
A4	72,19	0,12	602	7,85	89,70	86,56	5565	3,50
A5	71,21	0,12	593	7,76	89,40	83,82	4030	3,24
A6	71,67	0,12	645	8,00	89,80	87,15	3875	2,99
ISO	70 ±4%	0,089±4	714	15	89,00	88,00	>3000	

Elemelve a 2. táblázatban feltüntetett adatokat látható, hogy a fajlagos tömeg és a vastagság kivételével a szabványok előírásainak megfelelnek. A kisebb sűrűség azzal magyarázható, hogy a kísérleti körülményeken a cellulózpasztában megtartott kalcium-karbonát csak a 8%-ot érte el. A papír fehérsége is függött a töltőanyag minőségétől, a legnagyobb fehérséget az A2 és A3 mintákból származó kalcium-karbonát biztosította. A papír áttetszőségét illetően a legjobb minőséget az A2 minta, a legrosszabbat az A5 minta biztosította.

A szakadás hossz szempontjából a legjobb papírsáv az A1-es, míg a leggyengébb az A6-os mintára jellemző.

Mint várható volt, a papír minőségét a kalcium karbonát szemcsemérete befolyásolta. A szemcseméret eloszlás eléggé változó, amint ezt az 1. ábra is tükrözi. A 3. táblázatban feltüntetett adatok szerint látható, hogy az A5 és A6 minták esetében, amelyeket alacsonyabb fordulatszámon állítottunk elő, az átlagos szemcseméret nagyobb, mint a többi, magasabb fordulatszámon nyert PCC esetében.

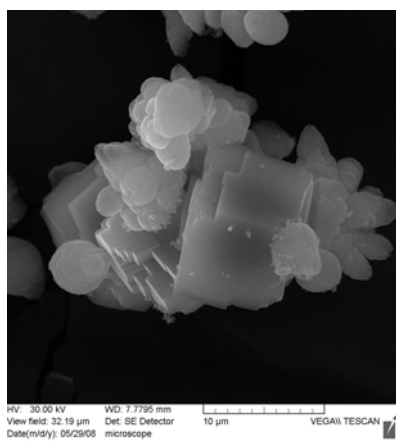


1. ábra
A kalcium-karbonát minták szemcseméret-eloszlása.

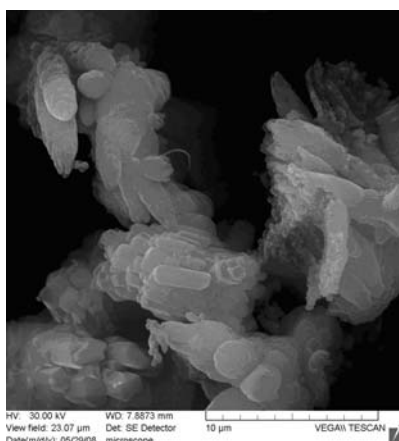
2. táblázat. A karbonát minták szemcseméret jellemzői.

Minta	D _{medián} (μm)	D _{modusz} (μm)	D _{átlag} (μm)	Szórás (%)	D _{25%} (μm)	D _{50%} (μm)	D _{75%} (μm)
A1	0,066	0,058	0,065	0,213	0,047	0,066	0,093
A2	0,101	0,108	0,102	0,331	0,059	0,101	0,176
A3	0,262	0,250	0,310	0,493	0,179	0,262	0,394
A4	0,061	0,058	0,060	0,203	0,044	0,061	0,084
A5	0,490	0,203	0,954	0,726	0,212	0,490	0,582
A6	0,474	0,466	0,476	0,045	0,445	0,474	0,506

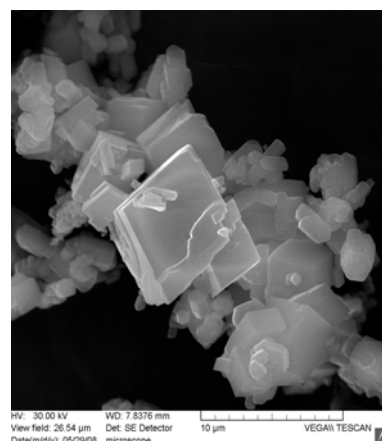
Laboratóriumi körülmények között szintetizált kalcium-karbonát 0,5 μm alatti részecske méretet mutat. A papír előállításban a töltőanyag másik nagyon fontos jellemzője, a részecskék alakja. A papírgyártók sajátos elvárásait elég nehéz biztosítani, mivel a részecskék alakját nagyon sok paraméter befolyásolja, köztük nagy fontossággal bír az oldatok koncentrációja, a keverés intenzitása, a hőmérséklet, a reagensek aránya [24], kristálynövekedést befolyásoló segédanyagok és azok koncentrációja [6]. A szintézis paramétereinek befolyását elemezve, meghatároztuk a különböző körülményeken előállított részecskék alakját. Ahogy a 2. ábrán lévő képek is mutatják, a laboratóriumi körülményeken előállított részecskék nem csak gömb alakúak, hanem a gömb alakú részecskék mellett tartalmaznak romboéderes részecskéket is. Ez főleg a 3. ábrán, az A1 és A4 minták SEM képein jól látható. Meg kell jegyezni azonban, hogy annak ellenére, hogy nem minden részecske gömbszerű, a bemutatott minták esetében jó mechanikai tulajdonságú papírt sikerült előállítani. Az A5 minta esetében, amikor alacsony áttetszőséget mértünk, a SEM képek azt mutatják, hogy itt az agglomerátumok dominálnak (lásd a 4. ábrát). Meg kell jegyezni azonban, hogy annak ellenére, hogy nem minden részecske gömbszerű, a bemutatott minták esetében jó mechanikai tulajdonságú papírt sikerült előállítani. Az A5 minta esetében, amikor alacsony áttetszőséget mértünk, a SEM képek azt mutatják, hogy itt az agglomerátumok dominálnak (lásd a 4. ábrát).



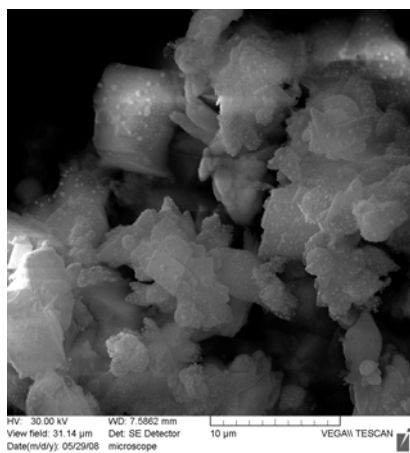
A1



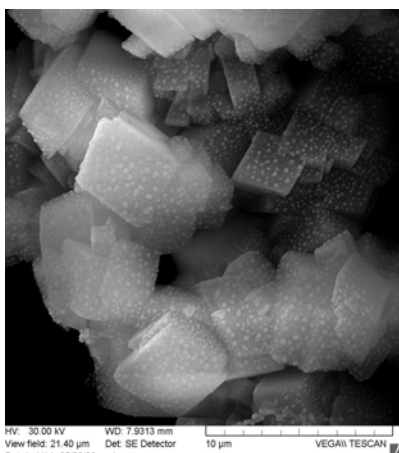
A2



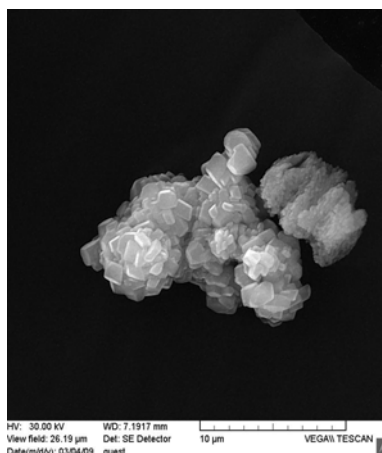
A3



A4

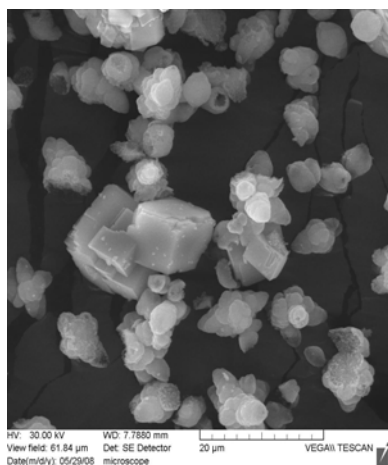


A5

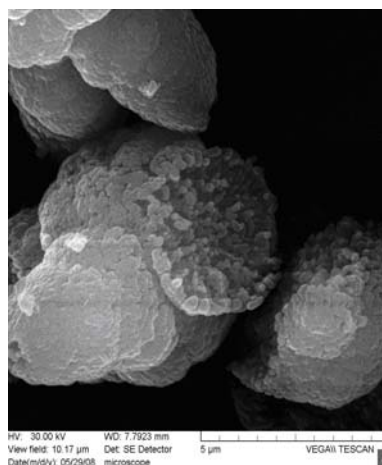
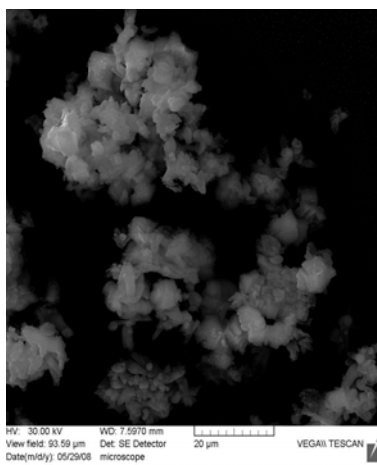


A6

2. ábra
A minták SEM képei



3.ábra
A minták SEM képei.



4. ábra
Az A5 minta SEM képe.

Méréseink az mutatják, hogy nem egyedül a koncentráció a befolyásoló tényező, hanem a reagensek aránya is fontos a részecskék alakjára és méretére nézve. Így, ha a $[Ca^{2+}]/[CO_3^{2-}]$ arány kisebb, mint 0,5 vagy $[Ca^{2+}]/[CO_3^{2-}] > 2$ a részecskék rombusz alakúak, egy körüli arány estében (0,88-1,31), 80 °C hőmérsékleten szemcse keveréket kapunk, míg 1,17 kalcium/karbonát arány esetében 50 °C hőmérsékleten romboédes és gömbszerű nanorészecskéket sikerült előállítani.

KÖVETKEZTETÉSEK

- A kettős csere módszer sikeresen alkalmazható PCC előállításra.
- A programozott kísérleti körülmények között keletkezett kalcium-karbonát átlagos szemcsemérete kisebb, mint 0,5 mikrométer.
- A kísérleti feltételek függvényében a keletkezett kalcium-karbonát részecskék alakja változik, kezdve a romboédesestől egész a gömb alakúig.
- Az eredmények azt mutatják, hogy a gömb alakú részecskék nem mások, mint aggregát kalcium-karbonát nanorészecskék.
- A PCC morfológiája függ a reagens aránytól, pontosabban a kalcium és karbonát ionok koncentrációjától. Amikor a $[Ca^{2+}]/[CO_3^{2-}] < 0,5$ vagy $[Ca^{2+}]/[CO_3^{2-}] > 2$, akkor a romboédes forma dominál. Egy körüli érték esetében (0,88-1,31) 30 °C hőmérsékleten a gömb alakú részecskék, 80 °C hőmérsékleten a keverék dominál.
- Abban az esetben, amikor a részecskék mérete elüt a gömb alaktól, a cellulóz paszta tömítő anyag retenciója kicsi, de amikor az agglomerátumok dominálnak, a papír áttetszősége alacsony.
- A PCC alkalmazásával jó fehérség és áttetszőség érhető el.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] C. Wang, J. Zhao, X. Zhao, H. Bala, Z. Wang, *Powder Technol.*, 2006, 163, 3, p. 134-138.
- [2] G. Wu, Z. Wang, S. Zhu, J. Wang, *Powder Technol.*, 2007, 172, 2, p. 82-88.
- [3] M. Harja, I. Crețescu, L. Rusu, R.C. Ciocîntă, *Rev. Chim.*, 2009, 60, 12, p. 1258-1263.
- [4] J. Chen, L. Xiang, *Powder Technol.*, 2009, 189, p. 64-69.
- [5] L. Hu, P. Dong, G. Zhen, *Mater. Lett.*, 2009, 63, p. 373-375.
- [6] M. Harja, R.C. Ciocîntă, I. Crețescu, M. Apostolescu, M. Bărbuță, *Rev. Chim.*, 2009, 60, 10, p. 1025-1031.
- [7] P. Obrocea, E. Bobu, *Bazele fabricării hârtiei*, 1993, vol. I, Lit. Univ. Tehn. Gh. Asachi Iași.
- [8] H. Gerteiser and M. Laufmann, *The Effect of Natural Ground CaCO₃ on Wood-free Papermaking Process and Paper Quality*, Pira Sem., London, 1987.
- [9] G. Falini, S. Albeck, S. Weiner, L. Addadi, *Science*, 1996, 271, p. 67.
- [10] F. Lipmann, *Sedimentary Carbonate Minerals*, Springer-Verlag, Berlin, 1973.
- [11] H. Kawaguchi, H. Hirai, K. Sakai, S. Sera, T. Nakajima, Y. Ebisawa, K. Koyama, *Colloid Polym. Sci.*, 1992, 270, p. 1176.
- [12] Haria-Bala, X. Ding, Y. Guo, Y. Deng, C. Wang, M. Li, Z. Wang, *Mater. Lett.*, 2006, 60, p. 1515-1518.
- [13] C. Shivkumara, P. Singh, A. Gupta, M.K.S. Hegde, *Mat. Res. Bul.*, 2006, 41, p. 1455-1462.
- [14] A.J. Xie, Y.H. Shen, C.Y. Zhang, Z.W. Yuan, X.M. Zhu, Y.M. Yang, *J. Crystal Growth*, 2005, 285, p. 436-443.
- [15] P. Wan, H. Tong, Z. Zh, X. Shen, J. Yan, J. Hu, *Mat. Sci. Eng. A.*, 2007, 458, p. 244-248.
- [16] F. Guo, Y. Li, H. X. Xu, G.Q. Zhao, X.J. He, *Mater. Lett.*, 2007, 61, p. 4937-4939.
- [17] M. Harja, L. Rusu, R.C. Ciocîntă, A.I. Simion, *Env. Eng. Manag. J.*, 2010, 1, (accepted, in print).
- [18] L. Istrati, M. Harja, G. Ciobanu, L. Gavrilă, *Actes du troisième Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée CoFrRoCA*, Slănic Moldova, Roumanie, 2004, p. 559-560.
- [19] A.M. Belcher, X.H. Wu, R.J. Christensen, P.K. Hansma, G.D. Stucky, D.E. Morse, *Nature* 1996, 381, p. 56.
- [20] R. Lakshminarayanan, S. Valiyaveetil, G.L. Loy, *Cryst. Growth Des.*, 2003, 3, p. 953.
- [21] P.K. Ajikumar, R. Lakshminarayanan, S. Valiyaveetil, *Cryst. Growth Des.*, 2003, 20, p. 1.
- [22] N. Wada, K. Yamashita, T. Umegaki, *J. Colloid Interface Sci.*, 1999, 212, p. 357.
- [23] S. Mann, B.R. Heywood, S. Rajam, J.D. Birchall, *Nature*, 1988, 334, 25, p. 692.
- [24] Al. Szép, M. Bucevschi, Gh. Mihăilă, *Studia Univ. Babeș-Bolyai, Chimia*, 1991, 1-2, p. 64.

Hemicelluláz enzimek stabilizálása nano-réteggel

Stabilization of Hemicellulase Enzymes with Nano-layer

Stabilizarea enzimelor de hemicelulază cu nano-strat

HEGEDÜS Imre¹, Prof. Dr. NAGY Endre¹, Dr. KUKOLYA József²,
Dr. BARNA Teréz³, FEKETE Csaba Attila³

¹Pannon Egyetem, Műszaki Informatika Kar, Műszaki Kémiai Kutató Intézet
Egyetem u. 2. P. O. Box 158, H-8200 Veszprém, Hungary

²Szent István Egyetem, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar, Genetika és Biotechnológiai Intézet,
Páter K. ú. 1, H-2001 Gödöllő, Hungary

³Debreceni Egyetem, Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék
Egyetem tér 1., Debrecen, Hungary

ABSTRACT

Hemicellulase enzyme molecules were conjugated with a polymer nano-layer in order to increase their stability. This enzyme nanobiocomposites (single enzyme nanoparticles, SENs) have a good stability under extreme conditions. At 80 °C after 6 hours SENs have 40% of its original activity but the natural enzymes lost their activity after a half an hour. Between pH = 1.5 and pH = 12.5 there are not any decrease in the activity of single enzyme nanoparticles.

ÖSSZEFOGLALÓ

Hemicelluláz enzim molekulákhoz nano-méretű polimer réteget kapcsoltunk stabilitásuk növelése érdekében. Ezek az enzim nanobiokompozitok (egyedi enzim nanorészecskék) még extrém körülmények között is megőrzik stabilitásukat. 80 °C-on a stabilizált hemicelluláz enzimek még 6 óra elteltével is megőrzik eredeti aktivitásuk 40 %-át, míg a természetes enzimek már fél óra alatt teljesen elveszítik aktivitásukat. pH = 1,5 és 13,5 között nem változik az egyedi enzim nanorészecskék aktivitása.

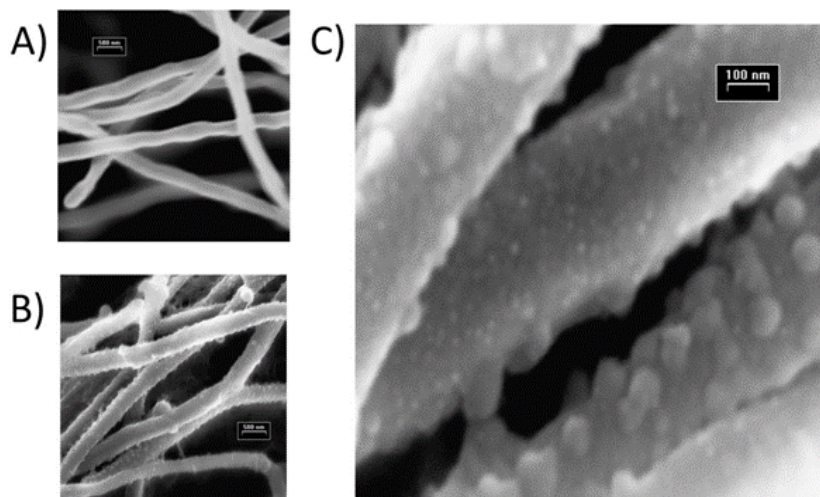
Kulcsszavak: egyedi enzim nanorészecskék, enzim stabilizálás, nano-bio-kompozitok, hőstabil enzimek, hemicelluláz enzimek

1. BEVEZETÉS

A hemicellulóz a növényi sejtfalak második legnagyobb mennyiségben jelen lévő komponense [1]. A legjelentősebb hemicellulóz a xilán, amely xilóz egységekből épül fel β -D-1,4-glikozidos kötésekkel. A másik jelentős hemicellulóz frakció a mannán, amely mannóz vagy mannóz és glükóz egységekből épül fel szintén β -D-1,4-glikozidos kötésekkel. A hemicellulázok összekapcsoló szerepet töltenek be a lignin és a cellulóz között [2].

A sejtfalat alkotó poliszacharidok lebontásához számtalan hidroláz funkciójú enzim szükséges. A cellulóz bontását végző enzimek működési elvéhez hasonlóan az endoxilanáz és az endomannanáz enzimek a xilánt és a mannánt a lánc belsejében hasítják. Az így képződő xilo- és mannooligoszacharidokat pedig β -xilozidáz és β -mannozidáz enzimek bontják tovább xilóz és mannóz végtermékekké. A különböző oldalláncok eltávolításához további enzimek szükségesek [3].

A cellulázok, illetve hemicellulázok ipari felhasználása leginkább a papíriparban történik. Egy másik felhasználási terület az oligoszacharidok szintézise [4].



1. ábra

A) *Thermobifida fusca* TM51 hifa-szerkezete A) *Sima* felszínű micélium (glükózon tenyésztve)
 B) Cellulóz jelenlétében celluloszóma-szerű struktúrák emelkednek ki a micélium felszínéből
 C) Celluloszómára emlékeztető szerkezetek nagyobb nagyításban

A biotechnológiában a legtöbbször a hőtűrő mikroorganizmusok enzimjeit használják fel [5]. Számos előnye van ugyanis annak, ha az anyagokat magasabb hőmérsékleten lehet reagáltatni egymással. A legfontosabb, hogy a hőmérséklet növelésével nő a reakciósebesség. Magasabb hőmérsékleten változik bizonyos szubsztátumok biológiai hozzáférhetősége és oldhatósága, csökken a viszkozitásuk, nő a diffúziós állandójuk. Különös jelentőségűek azok a reakciók, amelyek a kevésbé oldódó hidrofób anyagok átalakítását végzik. A termofil baktériumok 50-80 °C közötti tartományban szaporodnak a legjobban [6].

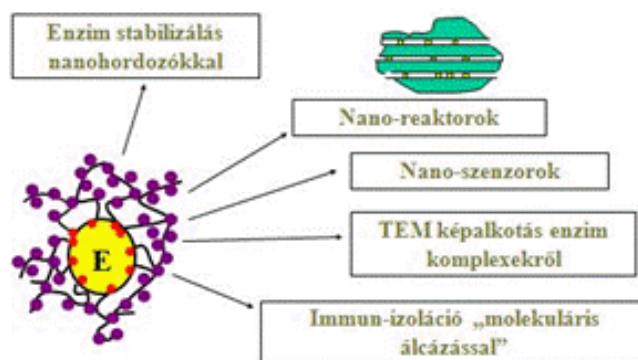
A *Thermobifida* fajok Gram-pozitív, a komposztban és a talajban előforduló baktériumok. A *Thermobifida fusca* a legintenzívebben kutatott faj ebben a törzsben és a termofil, cellulolitikus baktériumok modell organizmusa. A *Thermobifida fusca* komposztlakó termofil, aerob, összetett hidroláz rendszerrel rendelkező cellulózbontó baktérium [7]. Míg a celluláz enzim rendszeréről rengeteg adat áll rendelkezésre, a faj hemicelluláz enzim rendszere alig ismert, holott a hemicelluláz rendszer is éppen olyan összetett lehet, mint a celluláz rendszer. A hő a mezofil és termofil baktériumok oxidáló tevékenysége során termelődik. Megjegyzendő, hogy a *Thermobifida* nemzetséghez tartozó új fajt (*Thermobifida cellulolytica*) Magyarországon izolálták (Kukolya József, [8]).

A *Thermobifida fusca* baktériumok morfológiája sok szempontból hasonlít a gombákéhoz. A gombaformákhoz hasonló ún. pszeudo-hifát alkotnak és a spórákhoz hasonló alakzatokat is alkothatnak (1. ábra). Cellulóz jelenlétében a *Sima* felszínű pszeudo-hifa fonalak szemcséssé válnak, rajtuk a celluloszómához hasonló képletek jelennek meg. A *Thermobifida* fajok valójában nem alkotnak valódi celluloszómát, mert hiányzik belőlük a szkelettin kötő fehérje [8].

A hemicellulóz bontó enzimek a cellulázokhoz hasonlóan működésük folyamán meghatározott térbeli elrendeződést vesznek fel, adott arányban vannak jelen, és összehangolt a működésük. Ezért a celluláz enzimekhez hasonlóan a hemicellulázok is hiperstruktúrákat alkotnak, multifunkcionális szupramolekuláris enzimkomplexeikként működnek, amely komplexeket a kovalens kötésekkel gyengébb kémiai és fizikai kölcsönhatások stabilizálhatnak [9].

A *Thermobifida fusca* speciesből izolált hemicellulázok magas hőmérsékleten is képesek ugyan működni, azonban stabilitásuk nem túl jó, már szobahőmérsékleten is viszonylag rövid idő alatt elveszítik aktivitásukat. Cellulózbontó enzim komplexet már sikerült az egyedi enzim nanorészecske technológiával stabilizálni [13], és működésük is megmaradt viszonylag nagy szubsztátumok esetében is (szűrőpapír csík). Azt a feladatot tűztük ki, hogy hőstabil hemicellulóz bontó enzimeket vonunk be nanoréteggel és vizsgáljuk az enzimek stabilitását. Négy enzimet vizsgáltunk, ezek a β -mannozidáz, a mutáns β -mannozidáz, β -xilozidáz és endomannanáz nevű enzimek. A mutáns β -mannozidázt (E530S) helyhez kötött mutagenézissel módosították. Egy szertin aminosavat cseréltek ki, ezáltal a mutáns enzim elveszítette hidrolitikus aktivitását, azonban megmaradt a β -D-mannozidáz aktivitása és meglepő módon hidrolitikus aktivitása mutatkozott para-nitrofenil- β -D-glükuronidokkal szemben. A mutáns β -mannozidáz a régió- és sztereospecifikus oligoszacharid szintézis tanulmányozásához használható.

Az egyedi enzim nanorészecskék (1/B,2. ábra) különálló, néhány nanométeres, az enzim méretével összevethető vastagságú burokokban tartalmazzák az enzim molekulákat, amelyek a burokok stabilizáló hatása miatt stabilisabbak és aktivitásuk sem csökken jelentős mértékben [10, 11].



2. ábra

Az egyedi enzim nanorészecskék felhasználási lehetőségei

A J. Kim és munkatársai által kifejlesztett ún. egyedi enzim nanorészecskék (single enzyme nanoparticles, SENs) előállításának esetében minden egyes enzim-részecske néhány nanométer vastagságban szerves vagy szervetlen porózus anyaggal van körbevéve. Ez az újfajta eljárás eltér mind a mezopórus anyagokon, mind a szol-géleken való rögzítéstől. Az így átalakított enzim molekulák egy-két nagyságrenddel stabilisabb katalitikus aktivitást mutatnak és a szubsztátum szabad mozgása sem korlátozódik [11]. Az így kapott egyedi enzim nanorészecskék az enzim stabilizálás segítségével nano-reaktorok alkotó elemeiként használhatók [10]. Kifejlesztés alatt áll nano-szenzorokként, TEM képalkotó ágensekként, illetve immun-izolációt biztosító hatóanyag hordozóként történő alkalmazásuk (2. ábra).

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1 Anyagok

2.1.1 Vegyszerek

Akrilsav-klorid, 1,3-bisz-trisz-hidroximetil-metilamino-propán vagy Bis-Tris propane (Sigma), nátrium-bisz(2-etilhexil) sulfoszukcinát vagy aerosol OT (AOT) (Fluka), dinátrium-hidrogénfoszfát, kálium-dihidrogén-foszfát, calcium-klorid, 2-propanol, n-hexán (Spektrum-3d, Scharlau), metakriloxipropil-trimetoxiszilán (MAPS), 2,2-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) (Fluka), 3,5-dinitro-szalícilsav (Sigma), paranitrofenil- β -D-mannopiranozid, paranitrofenil- β -D-glükózid, paranitrofenil- β -D-xilopiranozid.

2.1.2 Enzimek

β -mannozidáz (*Thermobifida fusca* GH2 beta-mannosidase swiss_prot entry name: <http://www.expasy.org/sprot/userman.html> - ID_lineQ47RG4_THEFY), mutáns β -mannozidáz (E530S), β -xilozidáz (*Thermobifida fusca* GH43 beta-xylosidase: swiss-entry: Q47PG8_THEFY), endomannanáz (*Thermobifida fusca*). Az enzimeket a Debreceni Egyetem Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszékén illetve a Szent István Egyetem Mezőgazdasági Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén tisztították.

2.1.3 Műszerek

Az enzimek koncentrációjához, aktivitáshoz, valamint stabilitáshoz szükséges abszorbancia értékeket Biochrom 4060 spektrofotométerrel (Pharmacia) mértük. Az egyedi enzim nanorészecskék előállításához a polimerizációs lépésnél Vilber Lourmat UV-lámpát használtunk (365 nm). A kérgesített részecskék méreteloszlásának meghatározása Malvern Zeta-sizer műszerrel történt. Az elektronmikroszkópos felvételek JEOL-1200X transzmissziós elektronmikroszóppal készültek (gyorsító feszültség 80 kV).

2.2 Módszerek

2.2.1 Az egyedi enzim nanorészecskék előállításának módszere

Részletes leírást találhatunk korábbi publikációnkban [11]. Első lépésben a felszíni lizin aminosavak szabad amino csoportjait akrilsav-kloriddal módosítjuk. Kis mennyiségű felületaktív anyagot használva a módosított fehérjét ún. hidrofób ion-pár formában (hydrophobic ion-pairing) oldani lehet hexánban. A következő,

polimerizációs lépésnél az enzim szabad felszínére van szükség hexán fázisban, amihez elengedhetetlen az ion-pár képzéssel történő oldódás. Vinil csoportot és trimetoxiszilil csoportot egyaránt tartalmazó szilil monomereket adva a hexános reakcióelegyhez szabad gyökös vinil polimerizációt indítottak ultraibolya fénnel történő gyökképzéssel és lineáris polimereket kaptak, amelyek az enzim felszínéhez kapcsolódtak. A felületmódosítás után polimerizáció indul ki az enzimek felületéről, végül a polimer láncok térhálósodnak.

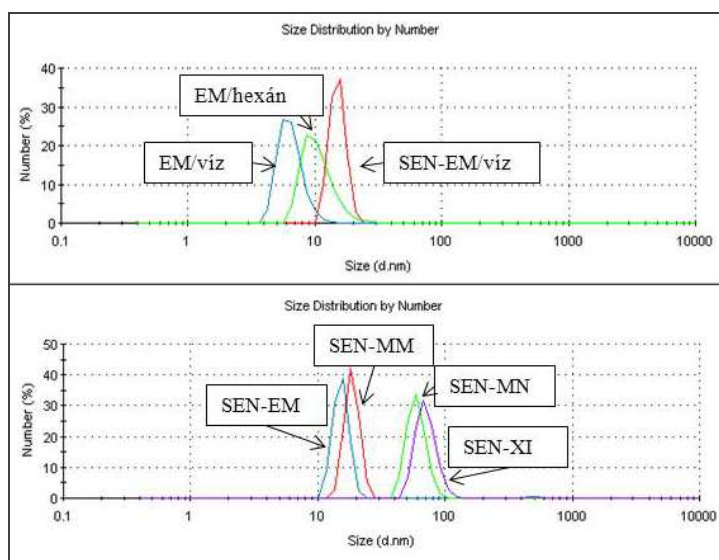
2.2.2 Aktivitásmérések

β -mannozidáz: a β -D-mannozidáz aktivitását, paranitrofenil- β -D-mannopiranozid (pNP- β -D-man, 5 mM törzsoldat) mesterséges szubsztrát mellett végezzük, foszfát-citrát pufferben (10 mM, pH=6,0), 50 °C-on, 1 ml reakció elegyben. A reakcióelegy 50 μ l szubsztrátumot, 940 μ l puffert és 10 μ l enzim oldatot tartalmaz (a 0,13 mM koncentrációjú enzim mintából 100 x-os hígítású, 1,3 μ M-os enzimtörzsoldatot készítünk, 10 mM foszfát-citrát pufferban (pH=6,0), ebből az enzim-törzsoldatból, veszünk ki 10 μ l-t az aktivitás méréséhez). A reakciót 2 perces, 50 °C-on történő előinkubálás után minden esetben az enzim hozzáadásával indítjuk el. A mintákat 5 perces reakcióidő után, 2 ml Na-Borát puffer (0,2 M, pH=10,0) hozzáadásával állítjuk le. A hidrolízis során felszabadult *para*-nitrofenolát ionok mennyiségét fotometriásan, 400 nm mért abszorbanciából számítjuk ki, felhasználva az ezen a hullámhosszon megállapított *para*-nitrofenolát moláris extinkciós koefficiensét: $\varepsilon = 17,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A mutáns β -mannozidáz (E530S) is rendelkezik aktivitással. Aktivitásának mérése: 930 μ l pH=6,00 citrát-pufferhez 20 μ l 20 mM-os paranitrofenil- β -D-glükuronidot (pNPp-Glucoside-ot) adunk és 50 μ l tömény enzimet.

β -xilozidáz: a β -mannozidáznál leírt aktivitásmérés használható itt is azzal a különbséggel, hogy az enzim szubsztrátja paranitrofenil- β -D-xilopiranozid (pNP-xyl).

Endomannanáz (*Thermobifida fusca*) aktivitás mérése: 740 μ l pH=7,00 foszfát pufferhez 250 μ l 0,5%-os mannánt adunk és 10 μ l endomannanáz enzim törzsoldatot. Az elegyet 50 °C-on 10 percig inkubáljuk, majd 1 ml Miller-reagenst adunk hozzá, és 10 percig 100 °C-on forraljuk. Miután lehűlt, 335 μ l 40%-os K-Na-tartarátot adunk hozzá és az oldat abszorbanciáját 575 nm-en vizsgáljuk.



3. ábra

Az endomannanáz enzim méreteloszlása a szintézis három lépése során (felül), valamint a négy termék méreteloszlása (alul). (EM= endomannanáz, MM=mutáns mannozidáz, MN=mannozidáz, XI=xilozidáz)

3. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

3.1 A kapott egyedi enzim nanorészecskék méreteloszlása

A β -xilozidáz enzimek monomer formában nem aktívak, legalább dimerizálódniuk kell, hogy aktivitásuk mutakozzon [12]. A vizes közegben oldott formában jelen lévő β -xilozidáz enzimek a kísérletek tanúsága szerint tetramer formában vannak jelen, a tisztítás során spontán felveszik a negyedleges struktúrát.

A 3. ábra felső részén az endomannanáz enzim méretének változását követhetjük nyomon a szintézis három lépése során. A diagramon a részecskék méreteloszlását láthatjuk, a méret logaritmikus skálával feltüntetett

függvényében. A vízben oldott natív enzimek mintegy 5 nm-es méreteloszlás maximumot mutatnak. A hidrofób ionpár módszerrel n-hexánban oldott enzimrészecskék mérete már nagyobb, 9 nm körüli, míg a polimer burokkal ellátott egyedi enzimrészecskék mérettartománya tovább nő, az átlagos méretük 18-20 nm körül van.

3.2 Az enzim nanobiokompozitok aktivitása

3.2.1 β -mannozidáz

Az utolsó mintákat még sikerült ultrahangkezeléssel kis mértékben diszpergálni, de csak max. 5%-a ment át szerves fázisba. A polimer réteg kialakításával nem volt probléma. A terméket ezután vizes fázisba (0,05 M citrát-puffer, pH = 6,0) extraháltuk és ennek aktivitását mértük. A beburkolt enzim termék koncentrációja mintegy 0,02 mg/ml. Az aktivitásméréshez a következő arányokat használtuk: 100 μ l beburkolt mannozidáz enzim, 30 μ l szubsztrátum, 870 μ l puffer (0,05 M citrát p., pH = 6,0). Reagáltatás 50 °C-on, 5 percig. Leállítás a leírás szerint 2 ml pH = 8,0-as pufferrel. A kapott elnyelés 400 nm-en 0,013. A számolt aktivitás az eredeti 47,8 %-a.

3.2.2 β -xilozidáz

Az enzim törzsoldat hígított részleteinek szonikálása után az eredeti enzim 15%-a megy át szerves fázisba. Szonikálás nélkül nem tapasztalható oldódás a hidrofób hexán, ami minden bizonnyal az enzimek összetapadása miatti nagy méretének köszönhető. A polimer réteg kialakítása után a terméket citrát pufferbe extraháltuk (0,05 M, pH = 6,0). Az aktivitás méréséhez használt térfogatok: szubsztrátum 30 μ l, enzim natív enzim esetén 5 μ l, beburkolt enzim esetén 100 μ l, továbbá pufferrel 1000 μ l-re hígítva. 1 percig 50 °C-on inkubáltam az elegyet. Leállítás a leírás szerint 2 ml pH = 8,0-as pufferrel. A beburkolt xilozidáz enzim aktivitása 55,3%-a az eredetinek.

3.2.3 Endomannanáz:

Az enzimet 5-8%-ban sikerült feldolgozni, azonban aktivitása meglehetősen jó, a natív enzim 63%-a.

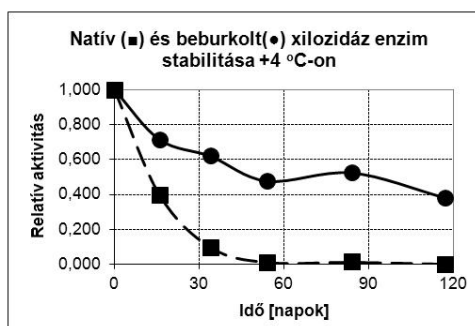
3.2.4 Mutáns β -mannozidáz:

Az eredeti enzim 19,72 %-át sikerült feldolgozni. Aktivitás mérések is folyamatban vannak, ugyanis a legújabb vizsgálatok azt mutatják, hogy mérhető a mutáns enzim aktivitása is.

3.3 Az egyedi enzim nanorészecskék stabilitása

A stabilitásra vonatkozóan csak kevés kísérletet végeztünk, illetve a híg oldatok miatt az aktivitás bizonytalansága tovább növelte a stabilitások meghatározásának hibáját. Habár az enzimek bírják a magasabb hőmérsékletet, alacsonyabb hőmérsékleten is viszonylag gyorsan elveszítik az aktivitásukat (nem stabilisak).

A beburkolt β -xilozidáz enzimet + 4 °C-on tartva 117 nap alatt 40%-ra csökkent az aktivitása, míg a natív enzim már 50 nap alatt teljesen elveszíti az aktivitását (ld. 4. ábra).



4. ábra

Beburkolt és kontroll β -xilozidáz enzimek stabilitása +4 °C-on.

KÖVETKEZTETÉSEK

A *Thermobifida fusca* baktérium fajból származó hemicellulóz bontó enzimekből is sikerült egyedi enzim nanorészecskéket előállítani (a különböző enzimek elektrodenz polimer réteggel való beburkoltságának elektronmikroszkópos detektálása még folyamatban van). Az így előállított enzimek is rendelkeznek mérhető aktivitással, amely a kiindulási enzimek aktivitásainak 48-65%-a.

A β -xilozidáz enzim csak dimer formában aktív. Vizes oldószerben a tetramer negyedleges struktúrák vannak jelen, az enzim spontán kialakítja ezt a struktúrát. Ha a hidrofób ionpárosodás módszer során monomerekké estek volna szét a tetramerek, akkor nem sikerült volna az egyedi β -xilozidáz nanorészecskéknek

aktivitását megmérni. Mivel ennek is sikerült aktivitását mérni, ez azt jelenti, hogy sikerült a dimert, vagy a tetramert beburkolni. A hidrofób ionpárosodás módszere ezek szerint megőrizheti a negyedleges struktúrákat, a gyenge, hidrogén hidakkal, illetve van der Waals kölcsönhatásokkal stabilizálódó finomabb kölcsönhatások is megőrződnek a preparálás során. A három lépés során, amelyek folyamán kialakulnak az egyedi enzim nanorészecskék, a hidrofób ionpárosodás alatt eshetnek szét monomerekké a tetramerek. Az első lépésben, a felületmódosítás során csak azok a primer amino csoportok módosulnak az egyes monomer enzimek felületén, amelyek a negyedleges szerkezetben is a felületen találhatók, azokon a helyeken pedig, ahol az enzim negyedleges szerkezetében a monomer enzim molekulák szorosan egymás mellett helyezkednek el, a módosítás sztérikus okok miatt nem következik be, ezért onnan polimer láncok sem tudnak kiindulni a szintézis második lépésében. Ezért a polimer burok csak ott alakul ki, ahol nem akadályozza a negyedleges struktúra kialakulását, illetve képes a kvaterner szerkezeteket is megőrizni, így finomabb struktúrák együttes beburkolására, stabilitásának megőrzésére is képes az egyedi enzim nanorészecskéket előállító módszer. (Az egyenként beburkolt monomer enzimek valószínűleg nem tudnak összeállni tetramerekké, mert az egyes enzimek felületei a burok által annyira lefedettek lennének, hogy nem tudnának kialakulni azok a kölcsönhatások, amelyek stabilizálnák az enzimek negyedleges szerkezetét.)

A Zeta sizer méretmeghatározó műszer segítségével kapott méreteloszlás grafikonokon különbség mutatkozik a β -xilozidáz és a mutáns β -mannozidáz, valamint az endomannanáz méretében. A β -xilozidáz enzim nagyobbak tűnik (50 nm körüli eloszlás maximummal), míg a mutáns β -mannozidáz és az endomannanáz esetében 15-20 nm körüli méreteloszlás látható. Érdekes, hogy a β -mannozidáz esetében hasonló (50 nm körüli) méretű enzim nanobiokompozitokat kaptunk. Ez valószínűsíthető, hogy a β -mannozidáz enzim a β -xilozidázhoz hasonlóan negyedleges struktúrákat vesz fel működése közben. Megjegyzendő, hogy az ilyen kis mérettartományú részecskék méreteloszlásának meghatározásához viszonylag tömény (≥ 1 mg/ml) oldatok szükségesek, egyébként a meghatározás bizonytalan. Ilyen töménységű oldatokat azonban még nem sikerült előállítanunk, ezért a méreteloszlásokból nem érdemes messzemenő következtetéseket levonni, csupán annak detektálására alkalmas, hogy jelen vannak a nanobiokompozit részecskék az oldatban. Komolyabb következtetéseket az elektronmikroszkópos felvételek elkészülte után mondhatunk.

Az egyedi enzimek relatív aktivitása megközelíti azokat az aktivitás értékeket, amelyeket más enzimek polimer réteggel történő beburkolása során kaptunk.

Az egyedi enzimek stabilitásának mérése még folyamatban van, az előzetes kísérleti eredmények azt mutatják, hogy stabilitásuk is összevethető a korábban ezzel a módszerrel előállított másfajta enzimek stabilitásával. A hűtőben (+ 4 °C-on) tárolt β -xilozidáz enzim aktivitása még 120 nap után is 40 %-a a kiindulásnak, míg a natív enzim 50 nap után gyakorlatilag teljesen elveszíti aktivitását.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

A kutatómunka az NKTH projekt keretében történt (NKTH TECH_08_A3/2-2008-0385).

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Badal, C.S., J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2003, 30, 279-291
- [2] Pauly, M., Keegstra, K., The Plant Journal, 2008, 54, 559–568
- [3] Fan, Z., Wagschal, K., Chen, W., Montross, M.D., Lee, C.C., Yuan L., Appl. Environ. Microbiol.; 2009, 75 (6) 1754–1757
- [4] Dhiman, S.S., Sharma, J., Battana, B., BioResources, 2008, 3(4), 1377-1402
- [5] Turner, P., Mamo, G., Nordberg, E., Microbial Cell Factories, 2007, 6 (9)
- [6] Haki, G.D., Rakshit, S.K., Bioresource Technology, 2003, 89 (1), 17-34
- [7] Wilson, D.B., The Chemical Record, 2004, 4 (2), 72-82
- [8] Kukolya, J., Nagy, I., Ládai, M., Oravecz, O., Máraligeti, K., Hornok, L., Int. J. Evol. Microbiol., 2002, 52 1193-1199 ()
- [9] Norris, V., den Blaauwen, T., Doi, R.H., Harshey, R.M., Janniere, L., Jiménez-Sánchez, A., Jun Jin, D., Levin, P.A., Mileyskaya, E., Minsky, A., Misevic, G., Ripoll, C., Saier, M., Jr., Skarstad, K., Thellier, M., Annu. Rev. Microbiol. 2007, 61, 309-329
- [10] Kim, J., Grate, J.W., Wang, P., Nanostructures for enzyme stabilization, Chemical Engineering Science, 2006, 61 (3), 1017-1026
- [11] Hegedűs I., Nagy E., Chemical Engineering Science, 2009, 64, 1053-1060
- [12] Tuncer, M., Ball, A.S., Folia Microbiol. 2003, 48 (2), 168–172
- [13] Hegedűs, I., Nagy, E., Műszaki Kémiai Napok '09 kiadványa, Veszprém, Multifunkcionális szupramolekuláris enzimkomplexek stabilizálása nanoréteggel, 2009, 7-13

A humán GITRL heterológ expressziója bakteriális rendszerben

Heterologous Expression of the Human GITRL in Bacterial System

Expresia heterologă a GITRL-ului uman în sistem bacterial

KOVÁCS Erika¹, Szabó Mária¹, SZILÁGYI László^{2,3},
MIKLÓSSY Ildikó², ÁBRAHÁM Beáta², LÁNYI Szabolcs²

¹Bukaresti Műszaki Egyetem, Alkalmazott kémia és Anyagtudományok Kar,
RO-060042, Bukarest, Splaiul Independenței 313, tel. 4021-402 96 24, fax 4021-402 39 34,
kovacserika@sapientia.siculorum.ro, www.upb.ro

²Sapientia EMTE, Műszaki és Társadalomtudományi Kar, Műszaki és Természettudományi Tanszék,
Csíkszereda, RO-530104, Szabadság tér 1, tel. 40-266-31 71 21, fax 40-266-37 20 99,
lanyiszabolcs@sapientia.siculorum.ro, www.sapientia.siculorum.ro

³Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biokémia Tanszék, Budapest, H-1117, Pázmány Péter sétány 1/C,
tel. 1 381-2171, fax 1 381-2172, szilagyi@elte.hu, www.elte.hu

ABSTRACT

The glucocorticoid-induced tumor necrosis factor (TNF) receptor (GITR) is a member of the TNF receptor superfamily. GITR is activated by its ligand, GITRL. The human tumor cells express high levels of GITRL, the presence of it can be used as a potential tumor marker. The coding sequence of the extracellular region of human GITRL (hGITRL) was isolated from human brain cDNA, and then was cloned into pETM52 expression vector. Heterologous expression of the hGITRL was realized in E. coli. Purification of the protein was realized by affinity chromatography.

ÖSSZEFOGLALÓ

A tumor nekrosis faktor receptor család egyik tagja a glükokortikoid által indukált tumor nekrosis faktor receptor (GITR), amelynek aktiválódása ligandumával, a GITRL-el történik. A humán tumor sejtek nagymértékben expresszálják a GITR ligandumát, ezért fel lehet használni potenciális tumor markerként. A humán GITRL (hGITRL) extracelluláris részét kódoló szekvenciát agyi cDNS-ből izoláltuk, majd pETM52 vektorba klónoztuk. A hGITRL heterológ expresszióját E. coli-ban valósítottuk meg, míg a tisztítás affinitás kromatográfiával történt

Kulcsszavak: hGITRL, tumor marker, pETM52 vektor, heterológ expresszió, affinitás kromatográfia

1. BEVEZETŐ

A tumor nekrosis faktor (TNF) receptor család tagjai több irányban befolyásolják a szervezet működését. A fontosabb hatásai közé tartozik az immunrendszer sejtjeinek [1] és a tumor sejtek [2] differenciálódásának, proliferációjának, aktivációjának és halálának szabályozása.

A tumor nekrosis faktor (TNF) receptor család egyik tagja a glükokortikoid által indukált tumor nekrosis faktor receptor (GITR, TNFRSF18), amely egy I típusú transzmembrán fehérje [3, 4], extracelluláris részén három ciszteinben gazdag ismétlődés található [3].

A receptort számos sejt expresszálja, T sejtek, természetes ölüsejtek [2, 4]. A receptor aktiválódása ligandumával, a GITRL-el történik [4], amely II típusú transzmembrán fehérje [5], a családba tartozó ligandumok közül a legkisebb. A GITRL-t antigén prezentáló sejtek, mint makrofágok, dendritikus sejtek [4] és tumor sejtek expresszálják [2, 6, 7, 8].

A fontosabb hatástani területek szerint beszélhetünk ennek a receptor/ligand kapcsolatnak az onkogenézisben betöltött szerepéről. Egér modellekben a receptor és a ligandum kapcsolódása következtében

a tumor sejtek növekedése, nagysága csökkent [6]. Emberben viszont a receptor aktiválódása a tumor sejtek növekedését, túlélését eredményezte [2, 7, 8]. Tehát elmondható, hogy a GITR/GITRL jelátviteli út emberben és egérben különböző hatást vált ki.

A tumorelles immunválasz legfontosabb résztvevői a citotoxikus T sejtek mellett a természetes ölkö-sejtek (NK) [9]. Az NK sejtek hiánya a tumorok gyorsuló növekedéséhez vezethet. A GITR kapcsolódása a humán tumor sejtek felszínén expresszált ligandumához, a GITRL-hez, megakadályozza a NK sejtek tumorelles hatását [2, 7, 8]. Tehát az NK sejtek, amelyek a ligandum receptorát, GITR-t expresszálják, nem ölik meg a tumoros sejteket, azok tovább növekednek [10].

Mivel a humán tumor sejtek nagymértékben expresszálják a GITRL-t [2, 7, 8, 10, 11], ezt fel lehet használni potenciális tumor markerként.

Jelen kutatás célja egy olyan bakteriális expressziós rendszer megépítése, amely lehetővé teszi a humán GITRL expresszióját aktív formában.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Az expressziós vektor megépítése

A humán GITRL (hGITRL) extracelluláris részét kódoló szekvencia izolálása agyi cDNS-ből az NcoI és BamHI restrikciós helyeket bejuttató oligonukleotidokkal végzett polimeráz láncreakcióval (Corbett Research Thermocycler) történt. Az agyi cDNS az ELTE Biokémia Tanszék ajándéka, amelynek szintézise reverz transzkripcióval történt mRNA izolálása után [12]. Az izoláláshoz alkalmazott oligonukleotidokat OligoExplorer 1.2 programmal terveztük. A forward primer, Go: 5'CGGCCATGGCTAAGTTTGGACCATTACC 3', a reverse primer, GITRL: 5'GCGGATCCTACA TGTGCTGAAGGGAATGAGG 3'.

A hGITRL izolálását és a kiválasztott expressziós vektorba való klónozását a [13] referenciában leírtak alapján végeztük, kisebb módosításokkal. A klónozáshoz a pETM52 vekort használtuk, amely H.B. (EMBL Laboratórium, Heidelberg) nagylelkű ajándéka [14].

Az amplifikálás során kapott hGITRL-t kódoló szekvenciát és a kiválasztott expressziós vektort BamHI és NcoI restrikciós enzimekkel emésztettük, hogy komplementer végek keletkezzenek. Az emésztési reakció során 25 µl DNS-t 1U NcoI és 1U BamHI restrikciós enzimekkel emésztettünk 1XBamHI puffer jelenlétében. Az emésztés 37°C-on 2 h tartott. Az emésztés eredményét 1%-os agaróz gélen ellenőriztük és izoláltuk az emésztett mintákat (Qiagen Gel Extraction Kit).

A kódoló szekvencia bejutása a pETM52 vektorba ligálással történt (T4 DNS ligáz, Fermentas). 10 µl ligálási terméket 100 µl kémiaileg kompetens *Escherichia coli* DH5α sejtekhez adtunk. A sejteket jégen történő inkubálás után (1 óra), 90 másodpercig 42°C-on tartottuk, majd 20 percet ismét jégen. A hűsokk után 900 µl Luria Bertani (LB) táplevest adtunk a sejtekhez, és 2 órát rázattuk 37°C-on 200 rpm-mel. Ezután kanamicin tartalmú LB-agar lemezen szélesztettük és inkubáltuk egy éjszakán át. A sikeresen transzformált telepekből négyet 3 ml kanamicin tartalmú LB táplevesben neveltünk 12 órát, majd kivontuk a plazmid DNS-t, plazmid izoláló kittel a gyártó utasításait követve. Az izolált rekombináns plazmidokat BamHI és NcoI restrikciós enzimekkel emésztettük, ellenőrizve, hogy az inzert vagy esetleg más fragmentum kapcsolódott be a plazmidba.

2.2. Az expresszió megvalósítása és az oldhatatlan zárványtest renaturálása

A rekombináns fehérje termelését *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) sejtekben valósítottuk meg 37°C-on, 20 µg/ml kanamicin tartalmú LB táplevesben. A T7 promóter indukciója Cv=0.5 mM koncentrációjú izopropil-β-D tiogalaktopiranoziddal (IPTG) történt OD600=0.8-nál. Indukálás után a sejteket még négy órát növesztettük.

A termelő kultúrát centrifugáltuk, a sejteket 30 ml 0,25 mg/ml lizozimes oldattal szuszpendáltuk és -20°C-on tartottuk egy éjszakán át. A minták feltárását a kioldás után szonikálással is elősegítettük, ezt követte a centrifugálás. A centrifugálás során keletkezett sejtüledéket 30 ml mosó oldattal (10 mM foszfát puffer, 0.1 M NaCl, pH 7.0) mostuk, a mosást háromszor megismételtük. Az oldhatatlan zárványtestet 10 ml 6 M guanidin-HCl-ban (Gu-HCl) oldottuk, kiegészítve 50 mM Tris-HCl pH 8.8-as pufferrel és 1 mM ditiotritollal (DTT).

2 ml szolubilizált fehérjét 60 ml refolding pufferbe (0.8 M Gu-HCl, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 5 mM CaCl₂, 0.5 mM EDTA, 5 mM redukált glutation és 0.5 mM oxidált glutation) csepegtettünk, 4°C-on az oldat folytonos kevertetése közben, 5 órán keresztül. A kihígított fehérje dialízise 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 pufferben történt. A fehérjék elválasztására és vizualizálására SDS (nátrium-dodecil-szulfát) - poliakrilamid gélelektroforézist alkalmaztunk.

2.3. A fúziós fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával

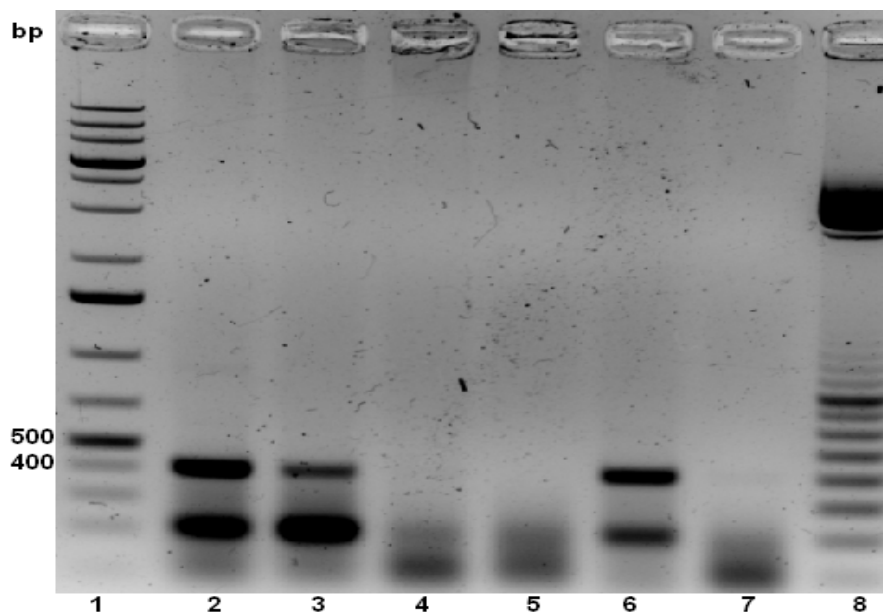
Fúziós fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával történt, mivel az expressziós vektor His₆-tag címkét tartalmaz. A renaturált fehérje tisztítása 3 ml Ni Sepharose oszlopon (Porfinity IMAC Ni-kötő gyanta, BioRad) történt. Az oszlopot 20 ml (50 mM Na-foszfát puffer, 300 mM NaCl, pH 8.0) oldattal hoztuk egyen-

súlyba. A dializált fehérje felvitele után az oszlopot 5 oszloptérfogatnyi kezdeti pufferrel mostuk. Az érdekelt fehérje oszlopról való eluálása 1 ml-ként 250 mM imidazol tartalmú pufferrel történt.

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

3.1. Az expressziós vektor megépítése

A humán GITRL extracelluláris részét kódoló szekvencia amplifikálása agyi cDNS-ből a Go és GITRL oligonukleotidokkal végzett polimeráz láncreakcióval történt. A Go-GITRL oligok olyan konstrukciót hoznak létre, amely az 59-es aminosavat kódoló kodontól tartalmazza a hGITRL génjét. Ezen primerek alkalmazásával a termelődött fehérje páratlan ciszteint tartalmaz (Cys78), amely egy potenciális jelölő pont, az immunológiai kísérletek nyomon követésére.



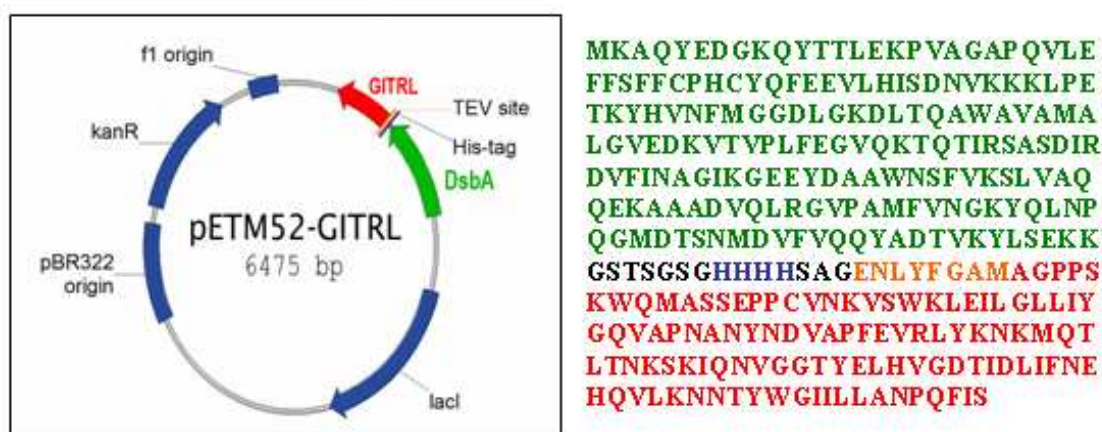
1. ábra

A hGITRL gén izolálásának eredménye 1%-os agaróz gélen 1. 1 kb DNA ladder, Fermentas; 2,3,4,6. Go-GITRL primerekkel izolált PCR termékek; 7. kontroll; 8. 100 bp DNA ladder, Pharmacia.

Az amplifikálás során kapott hGITRL-t kódoló szekvenciákat 1%-os agaróz gélen ellenőriztük, a DNS sávokat etidium bromiddal tettük láthatóvá, amelyet az 1. ábra mutat. Látható, hogy a molekulásúly-marker 400 bp vonalával egy szinten jelentek meg a ligandum extracelluláris részét kódoló szekvenciák.

Az izolált hGITRL gént a pETM52 expressziós vektorba klónoztuk. Az expressziós vektor kiválasztásánál figyelembe vettük, hogy előző tanulmányokban már leírták a hGITRL expresszióját bakteriális rendszerben, azonban a fehérje oldhatatlan zárványtest formájában termelődött [15, 16]. Ezért olyan expressziós vektort választottunk, amelyben található egy DsbA (disulfide-bond A oxidoreductase) rendszer. A DsbA egy periplazmatikus, oxidáló fehérje, amely katalizálja a diszulfid hidak létrejöttét, ugyanakkor egy dajka fehérje, amely a diszulfid hidakkal segíti a tekeredő fehérje szerkezetének kialakulását [14].

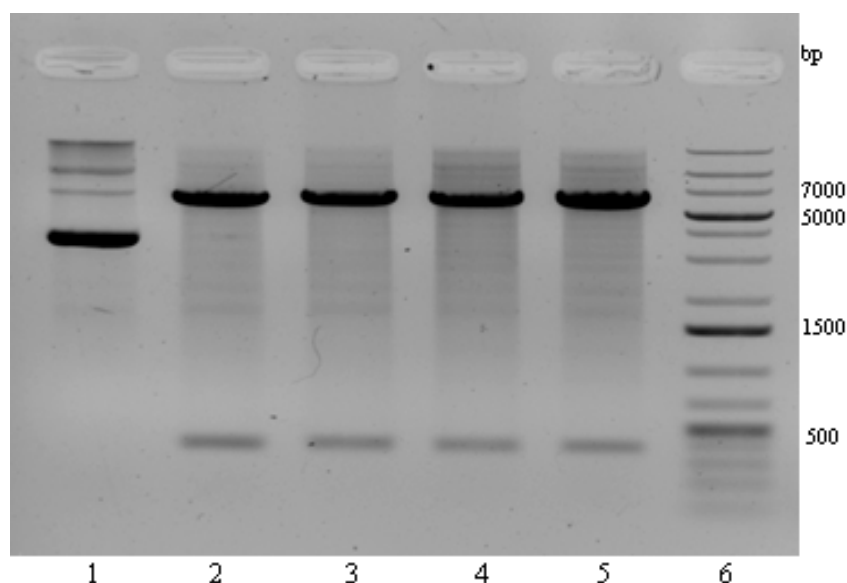
A pETM52 vektor felépítése lehetővé tette hGITRL gén fúzióját a DsbA szekvenciájához. A pETM52 leader szekvencia nélküli, ennek alkalmazásával a termelődött fehérje a citoplazmában halmozódik fel. A vektor tartalmaz még His₆-tag címkét, TEV (tobacco etch virus) proteáz hasító helyet, kanamicin rezisztenciáért felelős gént és IPTG-vel indukálható promótert.



2. ábra

A pETM52-hGITRL rekombináns vektor térképe és a fúziós fehérje szekvenciája

A létrejött rekombináns plazmidok sokszorosítása érdekében a ligálási terméket kémiai kompetens *E. coli* DH5 α sejtekbe juttattuk be. A transzformálásnak nevezett módszerrel bejuttatott rekombináns plazmidok kanamicin rezisztenciáért felelős gént hordoznak, ennek alapján kanamicin tartalmú táptalajon kisselektálhatók a plazmidot tartalmazó sejtek.



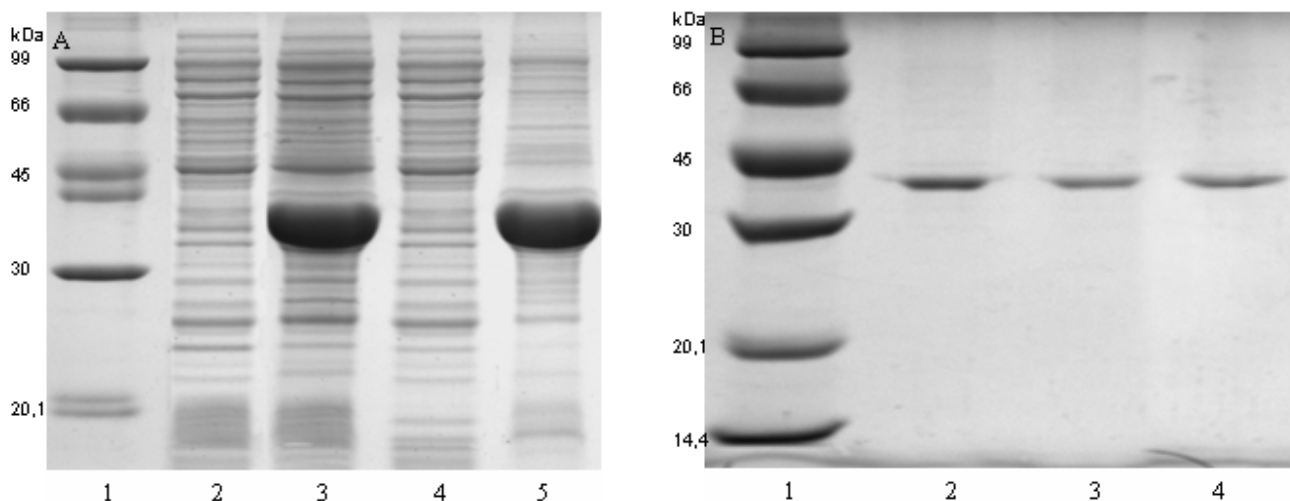
3. ábra

Ligálás ellenőrzése a rekombináns plazmid kettős emésztésével
1. pETM52-GITRL; 2,3,4,5. BamHI és NcoI restrikciós enzimekkel emésztett pETM52-Go-GITRL; 6. 1 kb molekulásúly-marker, Fermentas.

A kinőtt pETM52-Go-GITRL kolóniákból 4 telepet kanamicines folyékony táplevesben neveltünk, és kivontuk a plazmid DNS-t. NcoI és BamHI restrikciós enzimekkel emésztettük a rekombináns plazmidot, ellenőrizve, hogy az inzert gén, a GITRL vagy esetleg más fragmentum kapcsolódott be a helyére. A 3. ábra mutatja, hogy a kettős emésztés eredményeként a rekombináns plazmidból kihasadt a GITRL-t kódoló szekvencia, és ez a gélen hosszabb utat tett meg kisebb molekulatömegéből adódóan, amely 400 bp-nál jelent meg, ami bizonyítja, hogy az inzert beépült a plazmidba.

3.2. Az expresszió megvalósítása és az oldhatatlan zárványtest renaturálása

A megépített rekombináns plazmidot *E. coli* Star (DE3) sejtekbe transzformáltuk. A sikeresen transzformált sejtek kanamicin rezisztenciával rendelkeznek, így kisselektálhatóak a nem transzformált sejtek közül, mivel az utóbbiak kanamicin tartalmú táptalajon elpusztulnak. A starter kultúra indításához egy sikeresen transzformált telepet Luria Bertani kanamicin tartalmú táplevesben neveltünk 12 órát, 37°C-on. A fehérje termelését 250 ml kanamicin tartalmú LB-ben valósítottuk meg. A fehérje indukciója 0.5 mM koncentrációjú izopropil- β -D tiogalaktopiranoziddal (IPTG) történt OD₆₀₀=0.8-nál. Az expresszió 4 órát tartott.



4. ábra

A DsbA-Go-GITRL expressziója E. coli Bl21 Star (DE3) sejtekben és a renaturált zárványtest dialízis után

A rész: Expresszió ellenőrzése 16.5%-os SDS-poliakrilamid gélben. 1. Molekulatömeg-marker, Amersham; 2. indukálás előtti minta, 3. 4 órás expresszió után vett minta, 4. oldható fehérje, 5. oldhatatlan fehérje.

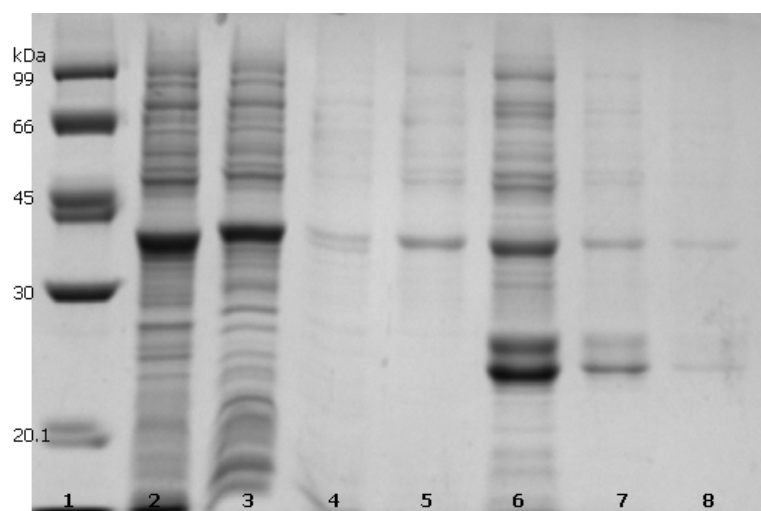
B rész: Renaturáció ellenőrzése 16.5%-os SDS-poliakrilamid gélben. 1. Molekulatömeg-marker, Amersham; 2. renaturált fehérje dialízis előtt; 3. renaturált fehérje dialízis után; 4. oldható fehérje dialízis és centrifugálás után; 5. oldhatatlan fehérje dialízis és centrifugálás után.

A 4. ábra A része a DsbA-Go-GITRL expresszióját mutatja *E. coli*-ban 37°C-on. A termelődött fehérje a citoplazmában halmozódott fel, a sejtek feltárása centrifugálás után lizozimes oldatban szonikálással történt. A baktérium sejtek által termelt fehérje mennyiségének 35%-át a fúziós fehérje alkotja. A vastag sávok azt mutatják, hogy a fehérje mintegy 60%-a a pelletben maradt, tehát oldhatatlan zárványtest formájában termelődött. Az oldhatatlan zárványtestet guanidin-HCl-ban oldottuk, a renaturálást glutation red-ox rendszerbe történő gyors hígításos módszerrel valósítottuk meg, ezt követte a kihígított fehérje dialízise, amelynek eredményét 16.5%-os SDS-PAGE gélben ellenőriztünk (4. ábra B rész). Látható, hogy a renaturációt követő dialízis után a fehérje 40%-át oldott formában kaptuk meg.

3.3. A fúziós fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával

A DsbA-Go-GITRL fúziós fehérje tisztítását affinitás kromatográfiával végeztük, mivel az expressziós vektor His₆-tag címkét tartalmaz. Álló fázisként Ni-NTA Sepharose-t használunk, amely koordinatív kötéseket képez a termelődött fehérje 6XHis-t tartalmazó régiójával. A tisztítás eredményét az 5. ábra mutatja.

Miután a nem kötődött, illetve gyengén kötődött fehérjéket eltávolítottuk az oszlopról, következett az érdekelt fehérje eluálása imidazol tartalmú pufferrel. Az imidazol nagyobb affinitást mutat a Ni iránt, mint a hisztidin, így kiszorítja ezt helyéről. Az eluálás során a gélben jól látható, hogy a fúziós fehérje nagyobb része szétesett alkotóira, amely a fehérje instabil állapotára utal.



5. ábra. A fúziós fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával

1. Molekulasúly-marker, Amersham; 2. renaturált, dializált GITRL-DsbA; 3,4. nem kötődött fehérjék; 5,6,7,8. eluált fehérje.

4. KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk során a humán GITRL extracelluláris részét kódoló szekvenciát izoláltuk polimeráz láncreakcióval agyi cDNS-ből a Go és GITRL-el jelzett oligonukleotidok alkalmazásával, majd a pETM52 expressziós vektorba klónoztuk és megvalósítottuk a gén expresszióját.

Végeredményként elmondható, hogy megépítettünk egy olyan expressziós rendszert, amely lehetővé teszi a hGITRL expresszióját bakteriális rendszerben, azonban a termelődött fehérje nem stabil. Mivel a hGITRL ebben az esetben egy ciszteint kódol, a továbbiakban tervünk egy olyan primerpár tervezése, amelynek alkalmazásával a termelődött fehérje két ciszteint tartalmaz, ebben az esetben a diszulfid híd kialakítása lesz a cél, amely hozzájárulhat egy stabil fehérjeszerkezet kialakulásához.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetünket fejezzük ki a Domus Hungarica Alapítványnak, és a „Sectoral Operational Programme Human Resources Development 2007-2013 of the Romanian Ministry of Labour, Family and Social Protection through the Financial Agreement POSDRU/6/1.5/S/19.” programnak az anyagiak biztosításáért, valamint az Eötvös Loránd Tudományegyetem Biokémia Tanszékének az anyagok és a kísérletek elvégzésének biztosításáért.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] So T., Lee S., Croft M., Tumor Necrosis Factor/Tumor Necrosis Factor Receptor Family Members That Positively Regulate Immunity, *International Journal of Hematology*, 2006, 83 (1), 1-11.
- [2] Baltz K. M., Krusch M., Bringmann A., Brossart P., Mayer F., Kloss M., Baessler T., Kumbier I., Peterfi A., Kupka S., Kroeber S., Menzel D., Radsak M.P., Rammensee H.G., Salih H.R., Cancer immunoediting by GITR (glucocorticoidinduced TNF-related protein) ligand in humans: NK cell/tumor cell interactions, *FASEB Journal*, 2007, 21 (10), 2442-2454.
- [3] Gurney A.L., Marsters S.A., Huang A., Pitti R.M., Mark M., Baldwin D. T., Gray AM., Dowd P., Brush J., Heldens S., Schow P., Goddard A. D., Wood W. I., Baker K. P., Godowski P. J., Ashkenazi A., Identification of a new member of the tumor necrosis factor family and its receptor, a human ortholog of mouse GITR, *Current Biology*, 1999, 9 (4), 215-218.
- [4] Kim J. D., Choi B. K., Bae J. S., Lee U. H., Han I. S., Lee H. W., Youn B. S., Vinay D. S., Kwon B. S., Cloning and characterization of GITR ligand, *Genes and Immunity*, 2003, 4 (8), 564-569.
- [5] Kwon B., Yu K.-Y., Ni J., Yu G.-L., Jang I.-K., Kim Y.-J., Xing L., Liu D., Wang S.-X., Kwon B. S., Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand, *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 (10), 6056-6061.

- [6] Calmels B., Paul S., Futin N., Ledoux C., Stoeckel F., Acres B., Bypassing tumor-associated immune suppression with recombinant adenovirus constructs expressing membrane bound or secreted GITR-L, *Cancer Gene Therapy*, 2005, 12 (2), 198–205.
- [7] Baltz K. M., Krusch M., Baessler T., Schmiedel B. J., Bringmann A., Brossart P., Salih H. R., Neutralization of tumor-derived soluble Glucocorticoid-Induced TNFR-Related Protein ligand increases NK cell anti-tumor reactivity, *Blood*, 2008, 112 (9), 3735-3743.
- [8] Liu B., Li Z., Mahesh S. P., Pantanelli S., Hwang F.S., Siu W. O., Nussenblatt R. B., GITR negatively regulates activation of primary human NK cells by blocking proliferative signals and increasing NK cell apoptosis, *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283 (13), 8202–8210.
- [9] Gergely J., Erdei A., Immunbiológia, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2006.
- [10] Baessler T., Krusch M., Schmiedel B. J., Kloss M., Baltz K. M., Wacker A., Schmetzer H. M., Salih H. R., Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor–Related Protein Ligand Subverts Immunosurveillance of Acute Myeloid Leukemia in Humans, *Cancer Research*, 2009, 69 (3), 1037–1045
- [11] Kim Y.S., Jung H. W., Choi J., Kwon B. S., Ham S., Jung A. K., Ko B. K., Expression of AITR and AITR ligand in breast cancer patients, *Oncology Reports*, 2007, 18 (5), 1189-1194.
- [12] Tóth J., Siklódi E., Medveczky P., Gallatz K., Németh P., Szilágyi L., Gráf L., Palkovits M., Regional distribution of human trypsinogen 4 in human brain at mRNA and protein level, *Neurochemical Research*, 2007, 32 (9), 1423-1433.
- [13] Kovács E., Pálfi M., Miklóssy I., Szilágyi L., Ábrahám B., Lányi Sz., Construction of an expression vector for the GITRL protein, *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Chemia*, 2009, 5, Special Issue 2, 83-91.
- [14] Dümmler A., Lawrence A.-M., de Marco A., Simplified screening for the detection of soluble fusion constructs expressed in *E. coli* using a modular set of vectors, *Microbial Cell Factories*, 2005, 4 (34), 1-10.
- [15] Chattopadhyay K., Ramagopal U. A., Mukhopadhaya A., Malashkevich V. N., DiLorenzo T. P., Brenowitz M., Nathenson S. G., Almo S. C., Assembly and structural properties of glucocorticoid-induced TNF receptor ligand: Implications for function, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104 (49), 19452-19457.
- [16] Jiao Y., Zheng F., Li X., Wang B., Guo S., Expression and analysis of the extracellular domain of human glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand in *Escherichia coli*, *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25 (5), 708-713.

Retekcsíra biológiai értékének vizsgálata

Nutritional Evaluation of Radish Sprouts

Evaluarea nutrițională a germenilor de ridichi

MÁRTON Melinda-Rita¹, Dr. CSAPÓ János²

¹Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszereda, RO- 530104 Szabadság tér 1, www.emte.ro

²Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Kémiai- Biokémiai Tanszék, H- 7400, Guba S. U. 40, www.ke.hu

ABSTRACT

During our research work we analyzed the crude fat content, fatty acid content, crude protein content, amino acid content of radish sprouts in response to germination time. The crude fat content decreased from 39,01% to 18,94% in six days. The fatty acids found in highest concentrations in radish seeds and sprouts were the oleic acid, linolic acid, eicozeic acid and α -linoleic acid. The palmitic acid content increased with 18%, the oleic acid content with 8%, the linolic acid with 8% and the stearic acid content decreased with 17% during sprouting. The crude protein content increased from 27,42% to 29,56% during six days of germination. The amino acids found in highest concentrations in the seeds were glutamic acid (20,3%), aspartic acid (8%), arginine (7,3%), and leucine (7,3%). During germination the aspartic acid, threonine, serine, proline, alanine, valine, isoleucine, tyrosine, fenilalanine, histidine and lysine content increased between 9 and 24%, the glutamic acid, glycine, methionine and arginine content decreased between 6 to 25%.

ÖSSZEFOGLALÓ

Kutatásaink során a retekcsíra nyerszsír-, nyersfehérje-tartalmát és aminosav- és zsírsav-összetételét vizsgáltuk a csíráztatási idő függvényében. Megállapítottuk, hogy a retekmag nyerszsír-tartalma 39,01%-ról hat nap alatt 18,94%-ra csökken. A legnagyobb mennyiségben a retekmagban és a csírában is az olajsav, linolsav, eikozénsav, α -linolénsav van jelen. A palmitinsav mennyisége 18%-kal, az olajsav mennyisége 8%-kal, a linolsav mennyisége 8%-kal nőtt, a sztearinsav mennyisége 17%-kal csökkent a csíráztatás során. A nyersfehérje-tartalom hat nap alatt 27,42%-ról 29,56%-ra nőtt a csíráztatás hatására. A legnagyobb mennyiségben jelenlévő aminosavak a magban a glutaminsav (20,3%), az aszparaginsav (8%), az arginin (7,3%) és a leucin (7,3%). A csíráztatás során az aszparaginsav-, a treonin-, a szerin-, a prolin-, az alanin-, a valin-, az izoleucin-, a leucin-, a tirozin-, a fenilalanin-, a hisztidin- és a lizin-tartalom nőtt (a változás mértéke 9 és 24% között), a glutaminsav-, a glicin-, a metionin- és az arginin-tartalom csökkent (a változás mértéke 6 és 25% között).

Kulcsszavak: csíra, nyerszsír-tartalom, zsírsav-összetétel, nyersfehérje-tartalom, aminosav-összetétel.

1. BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedekben végzett kutatások szerint a csírák eleget tesznek a modern táplálkozástudomány teljes értékű élelmiszer előírásának. Összehasonlítva a magvakkal, a csírák táplálkozási értéke magasabb: jobb minőségű a fehérje, kedvezőbb az aminosav megoszlás, magasabb a többszörösen telítetlen zsírsav-tartalom, a nyomelemek és esszenciális ásványi anyagok hasznosíthatósága jobb, és magasabb vitamintartalommal rendelkeznek. A csíráztatás során csökken az antinutritív anyagok mennyisége, mint a hemagglutininok, tripszininhibitor aktivitás, tanninok, pentozánok és fitinsav. A kutatások eredményeként úgy találták, hogy a csírák jó aszkorbinsav, riboflavin, kolin, tiamin, tokoferol és pantoténsav források (Lintschinger és mtsai., 1997) [2].

Danilcenko és mtsai. (2006) [1] retek magvakkal és csírákkal végzett kutatásaik során megállapították, hogy a csíráztatás során a nyersfehérje-tartalom növekvő tendenciát mutatott, míg a nyerszsírtartalom csökkent. Azt találták, hogy csíráztatás során a retek magban nyolc aminosav mennyisége nőtt, a treonin, szerin,

glutaminsav, glicin, alanin, leucin, lizin és arginin tartalom csökkent. A zsírsavösszetétel-változás nem volt jelentős. A legnagyobb változást a linolénsav és linolsav esetében észlelték: a linolénsav mennyisége 1,56%-al, a linolsav mennyisége 1,67%-al nőtt.

Tokiko és mtsai. (2006) [3] retekmag és -csíra zsírsav-összetételét vizsgálták. A retekmagban a laurinsav nyomokban volt jelen, a csírában mennyisége 0,2 relatív tömegszázalékra nőtt. A mirisztinsav mennyisége 700%-kal, a palmitinsav 6%-kal, a palmitoleinsav 57%-kal, a sztearinsav 10%-kal, az olajsav 26%-kal, a linolsav 9%-kal, az erukasav 14%-kal nőtt, míg a linolénsav mennyisége 11%-kal csökkent.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A csíráztatás. Biotermesztésből származó, a kereskedelmi forgalomban kapható retek magvakat szereztünk be. A magvakat 0,1%-os H_2O_2 -oldatban egy percen keresztül mostuk, ezt követően 24 órán át, desztillált vízben duzzasztottuk. A 24 óra letelte után a magvakat csíráztató tálakba helyeztük, és 20 °C-on, Memmert 200 inkubátorban csíráztattuk, naponta kétszer desztillált vízzel permeteztük, és 24 óránként vettünk mintát. A magvakat hat napig csíráztattuk. A csíráztatást követően a csírákat desztillált vízzel mostuk, 60 °C-on szárítottuk, majd fagyaszttva, -10 °C hőmérsékleten tároltuk.

A nyerszsír-tartalom meghatározása. A csírák nyerszsírtartalmát Soxhlet-féle extrakciós készülékben, éteres kivonás után határoztuk meg.

A zsírsav-tartalom meghatározása. A zsírsav-tartalom meghatározása származékképzés után a zsírsavak metilésztereiből gázkromatográfiával történt. A vizsgálatokat Varian 3800 gázkromatográf készülékkel végeztük.

A fehérje aminosav-összetételének meghatározása. A retek csíra aminosav-összetételét a fehérje hidrolízise után, az ioncserés oszlopkromatográfia elvén működő automatikus aminosav-analizátorral, oszlop utáni származékképzéssel határoztuk meg.

3. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

3. 1. Nyerszsírsav-tartalom

A csíráztatás során a retekmag nyerszsírtartalma jelentős mértékben csökkent a csíráztatás során. Ez a csökkenés azzal magyarázható, hogy a mag energiaforrásként használja a zsírsavakat az csírázáshoz.

A retekmag és -csíra nyerszsírtartalma.

1. táblázat.

Sorszám	Megnevezés	Nyerszsírtartalom (m%)
1.	Retekmag	39,01
2.	Retekcsíra 2. nap	39,52
3.	Retekcsíra 6. nap	18,94

3. 2. Zsírsavösszetétel

A 2. táblázat tartalmazza a retekmag és retekcsíra zsírsav-összetételét

A retekmag és retekcsíra zsírsav-összetétele.

2. táblázat.

		Minta megnevezése		
		Retekmag	Retekcsíra 2. nap	Retekcsíra 6. nap
Zsírsav megnevezése:		Zsírsav-metilészter %		
Laurinsav	12:0	<0,1	<0,1	<0,1
Mirisztinsav	14:0	0,1	0,1	0,3
Pentadekánsav	15:0	<0,1	<0,1	<0,1
Palmitinsav	16:0	8,2	7,9	9,9
Palmitoleinsav	16:1	0,2	0,2	0,2

		Minta megnevezése		
		Retekmag	Retekcsíra 2. nap	Retekcsíra 6. nap
Zsírsav megnevezése:		Zsírsav-metilészter %		
Sztearinsav	18:0	3,2	2,7	3,0
Olajsav	18:1	35,1	27,4	34,6
Linolsav	18:2	15,5	16,6	16,8
Arachidinsav	20:0	2,0	1,6	2,0
γ -linolénsav	18:3n6	0,1	0,1	0,1
Eikozénsav	20:1	14,8	11,5	15,1
α -linolénsav	18:3n3	13,6	11,3	14,0
Eikozadiénsav	20:2	0,6	0,5	0,7
Behénsav	22:0	1,9	1,4	1,9
Arachidonsav	20:4n6	0,1	<0,1	0,1
Dokozadiénsav	22:2	0,4	0,3	0,4
Lignocerinsav	24:0	1,2	0,9	1,2

A retekcsírában a legnagyobb koncentrációban az olajsav, a linolsav, az eikozénsav, az α -linolénsav és a palmitinsav volt jelen. A telített zsírsavak közül a palmitinsav koncentrációja a retekmagban 8,2% volt, melynek értéke a kétnapos retekcsírában 7,9%-ra csökkent, a hatnapos retekcsírában viszont 9,9%-ra növekedett. A sztearinsav koncentrációja csökkent a csíráztatás során a kezdeti retekmagban lévő 3,2%-ról 2,7 és 3,0%-ra. A telített zsírsavak közül még kimutatható laurinsav, mirisztinsav, pentadekánsav, arachidonsav, behénsav és lignocerinsav, azonban ezek koncentrációja 2% alatti.

A telítetlen zsírsavak közül az olajsav 35,1%-ban volt jelen a retekmagban, 27,4%-ban a két napos retekcsírában, 34,6%-ban a hatnapos retekcsírában. A linolsav koncentrációja a csíráztatás hatására a kezdeti 15,5%-ról 16,8%-ra nőtt a hatnapos csírákban. Az eikozénsav koncentrációja szintén növekedett a csíráztatás hatására a kezdeti 14,8%-ról 15,1%-ra. Az α -linolénsav koncentrációja a kezdeti 13,6%-ról 14,0%-ra növekedett a retekcsírában. A telítetlen zsírsavak közül adott kromatográfiás körülmények mellett a mintákból kimutatható volt még palmitoleinsav, γ -linolénsav, eikozadiénsav, arachidonsav, dokozadiénsav, azonban ezek koncentrációja 0,5%-nál kisebb.

A legnagyobb változást a csíráztatás hatására a palmitinsav, olajsav, linolsav és sztearinsav esetén észleltünk a csírákban. A palmitinsav mennyisége 18%-kal, az olajsav és a linolsav mennyisége 8%-kal nőtt, a sztearinsav mennyisége pedig 17%-kal csökkent.

3. 3. Nyersfehérje-tartalom

A 3. táblázat a retekmag és -csíra nyersfehérje-tartalmát tartalmazza. A csíráztatás során a nyersfehérje-tartalom nőtt, ami azzal magyarázható, hogy a mag a többi összetevőt használja energiaforrásként a csírázáshoz, így a nyersfehérje aránya megnő a magban.

A csíranövények nyersfehérje-tartalma.

3. táblázat.

Sorszám	Megnevezés	Nyersfehérje-tartalom (m%)
4.	Retekmag	27,42
5.	Retekcsíra 2. nap	29,05
6.	Retekcsíra 6. nap	29,56

3. 4. Aminosav-összetétel

A 4. táblázat a retekcsíra aminosav-összetételét tartalmazza.

Megnevezés	Retekmag		Retekcsíra 2. nap		Retekcsíra 6. nap	
Aminosav	g.AS/100 g minta	g.AS/100g fehérje	g.AS/100 g minta	g.AS/100g fehérje	g.AS/100 g minta	g.AS/100g fehérje
Aszparaginsav	2,16	8,0	2,25	7,9	2,64	9,0
Treonin	1,31	4,8	1,42	5,0	1,59	5,4
Szerin	1,02	3,8	1,14	4,0	1,21	4,1
Glutaminsav	5,50	20,3	5,58	19,7	5,37	18,4
Prolin	1,80	6,6	2,10	7,4	2,12	7,2
Glicin	1,63	6,0	1,51	5,3	1,49	5,1
Alanin	1,34	4,9	1,53	5,4	1,66	5,7
Cisztin	0,10	0,4	0,08	0,3	0,01	0,1
Valin	1,45	5,3	1,42	5,0	1,73	5,9
Metionin	0,63	2,3	0,71	2,5	0,49	1,7
Izoleucin	1,08	4,0	1,17	4,1	1,28	4,4
Leucin	1,97	7,3	2,09	7,4	2,05	7,0
Tirozin	0,88	3,2	0,90	3,2	0,97	3,3
Fenilalanin	1,17	4,3	1,27	4,5	1,54	5,3
Hisztidin	0,78	2,9	0,80	2,8	0,89	3,0
Lizin	1,48	5,4	1,57	5,5	1,82	6,2
Arginin	2,06	7,6	2,00	7,1	1,53	5,2
Triptofán	-	-	-	-	-	-
Összeg	27,16	100,0	28,31	99,8	29,25	99,9

A retekmag fehérjében a legnagyobb mennyiségben a glutaminsav van jelen (20,3%), melynek mennyisége a csíráztatás során csökken. A csíráztatás során az aszparaginsav, treonin, szerin, prolin, alanin, valin, izoleucin, leucin, tirozin, fenilalanin, hisztidin, lizin mennyisége megnövekedik, a többi aminosav mennyisége csökken. Az aszparaginsav-tartalom a csíráztatás során 18%-kal, a treonin- 18%-kal, a szerin- 16%-kal, a prolin- 15%-kal, az alanin- 19%-kal, a valin- 16%-kal, az izoleucin- 15%-kal, a leucin- 14%-kal, a tirozin- 9%-kal, a fenilalanin- 24%-kal, a hisztidin- 12%-kal, a lizin-tartalom 18%-kal nőtt. A glutaminsav-tartalom 6%-kal, a glicin- 8%-kal, a metionin- 22%-kal, az arginin-tartalom 25%-kal csökkent a csíráztatás során. Szembetűnő változás a cisztein mennyiségének csökkenése 0,10%-ról 0,01%-ra.

Következtetésként megállapítható, hogy a csíráztatás során megváltozik a mag összetétele, mely változás kismértékben javítja a csírák biológiai értékét. A retেকcsíra zsírtartalma a csíráztatás alatt 39%-ról 19%-ra csökken. A legnagyobb mennyiségben a retekmagban és a csírában is az olajsav, linolsav, eikozénsav, α -linolénsav van jelen. A palmitinsav mennyisége 18%-kal, az olajsav mennyisége 8%-kal, a linolsav mennyisége 8%-kal nőtt, a sztearinsav mennyisége 17%-kal csökkent. A legnagyobb mennyiségben jelenlévő aminosavak a magban a glutaminsav (20,3%), az aszparaginsav (8%), az arginin (7,3%), a leucin (7,3%). A csíráztatás során az aszparaginsav-, treonin-, szerin-, prolin-, alanin-, valin-, izoleucin-, leucin-, tirozin-, fenilalanin-, hisztidin-, lizin-tartalom nőtt, a változás mértéke 9 és 24% között van, a glutaminsav-, glicin-, metionin-, arginin-tartalom csökkent, a változás mértéke 6 és 25% között van.

Irodalom

- [1.] Danilcenko, H., Taraseviciene, Z., Jariene, E., Gajewski, M., Szymczak, P., Seroczynska, A.: Vegetables seeds – nutritional aspects in response to germination time, Vegetable Crops Research Bulletin, 2006, 65, 38-48.
- [2.] Lintschinger, J., Fuchs, N., Moser, H., Jager, R., Hlebeina, T., Markolion, G., Gössler, W.: Uptake of various trace elements during germination of wheat, buckwheat and quinoa, Plant Foods for Human Nutrition, 1997, 50, 223-237.
- [3.] Tokiko, M., Koji, Y.: Proximate composition, fatty acid composition and free amino acid composition of sprouts, Journal for the Integrated Study of Dietary Habits, 2006, 1, 4, 369-375.

**Az emberi tevékenységből származó légköri vízgőznek,
5 különböző szinten jelentkező, különleges viselkedése
okozhatja az éghajlatváltozást és a globális felmelegedést**

**The Special Behaviour of the Atmospheric Water Vapor Resulting from
Human Activities, Reported on 5 Different levels, May be Caused
Climate Changes and Global Warming**

**Comportarea deosebită a vaporilor de apă din atmosferă, rezultate în
urma activităților umane, apărute la cinci nivele diferite, s-ar putea cauza
modificarea climei și a încălzirii globale**

MUZSNAY Csaba

Ny. egyetemi előadótanár, Babeş-Bolyai TE, Kolozsvár, Arany J. u.
11/113, cmuzsnay@chem.ubbcluj.ro/484970

ABSTRACT

A special and unusual behaviour of atmospheric water vapor over the next five levels are distinguished: 1) molecular, 2) association, condensation, 3) phase transitions connected with moistness transport 4) precipitation, especially at the level of the clouds, 5) Human activities induced strong differences at the level of the Northern and Southern hemispheres.

ÖSSZEFOGLALÓ

A légköri vízgőz különleges és rendkívüli viselkedésének a következő öt szintje különböztethető meg: 1) molekuláris, 2) asszociációs, kondenzációs, 3) fázisátalakuláshoz kapcsolható nedvességszállító, 4) csapadék-képződés, főleg a felhők szintjén, 5) az északi és déli félteke között, emberi tevékenységek hatására kialakult, határozott különbség szintje.

Kulcsszavak: légköri vízgőz; molekuláris, asszociációs, kondenzációs, nedvességszállító, felhő és ÉFT szint, emberi eredetű vízgőz, ÉS melegekedése, globális felmelegedés, éghajlatváltozás.

1. BEVEZETÉS

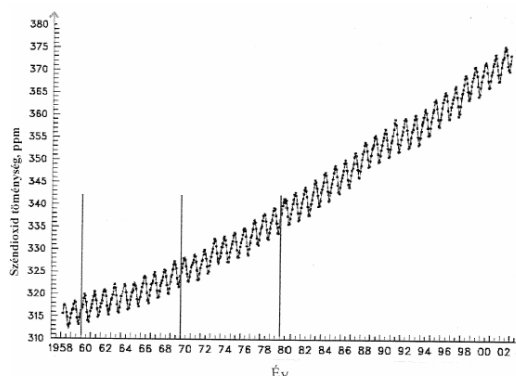
Az éghajlatváltozásokkal és a globális felmelegedéssel kapcsolatban az utóbbi években komoly véleménykülönbségek fogalmazódtak meg, anélkül, hogy a fő irányultság, a követési vonal, törést szenvedett volna. Nehezen képzelhető el irányváltoztatás mivel ezt a problémakört rendkívüli módon átszötte a politika. Nagyhatalmi politikai érdekek hálójában vergődik a globális felmelegedés kutatása, de különösen igaz ez az esetleg alkalmazásra kerülő módszerek megválasztásában. A legfőbb hivatkozási alapot az IPCC (International Panel of Climate Change) munkaközösségei és a körülöttük jelentkező népes kutatócsoportok elképzelései és eredményei képezik [1a-1c]. Az éghajlatkutatás eredményei egy állandóan változó adatgyűjteményt képviselnek. A légkörben kialakuló áramlásrendszerek bonyolult termodinamikai és hidrodinamikai sajátosságainak vizsgálatát feltételezik [2]. Az éghajlattal kapcsolatban mért mennyiségek zöme elvileg nem reprodukálható [3a, b], s ez a fizika egyik legfontosabb mérési alapelveinek megsértését jelenti a légkörkutatásban. Sokan, főleg akik az emberiségnek a földi éghajlatra gyakorolt hatását jelentéktelennek és elhanyagolhatónak tekintik, a Pentagon-jelentés hirtelen éghajlatváltozásra vonatkozó megállapításait fogadják el irányadónak [4]. Miskolczi Ferenc [5a-b] a NASA űrkutatási hivatal időjárási adatbázisát felhasználva, a légkör energetikai folyamataira vezetett le összefüggéseket, melyek szerint nincsen és nem is lesz globális felmelegedés. Szerinte az üvegházhatás a természet által jól szabályozott, egyensúlyban tartott folyamat. Mindezek ellenére elfogadja azt, hogy az egyes földrajzi övezetek és régiók éghajlatváltozása bekövetkezhet. Ezen cikk szerzője viszont, elsősorban emberi tevékenység által az

utóbbi 2-3 évszázadban folyamatosan légkörbe kerülő mind nagyobb mennyiségű vízgőz hatásának tulajdonítja a növekvő üvegházhatást, a vele kapcsolatos időjárás változást, az Északi Sark (ÉS) nagy mértékű melegekedését, jegének olvadását és az általános felmelegedést [6a – f].

A légkörben nagyon sokféle gáz található, legtöbb közülük kis mennyiségben fordul elő. Ezek közül kerülnek ki az ún. üvegházgázok, amelyek szinte teljes mértékben áteresztik a rövidebb hullámhosszú, nagy-energiájú napsugárzást, viszont jelentős mértékben elnyelik a Föld-felszín hosszabb hullámhosszú, kisebb energiájú kisugárzását, felmelegítve ez által a legalsóbb levegőréteget. A légkör eredendően és jelentősebb mennyiségben a következő 9 gázt és egy gőzt tartalmazza: N_2 , O_2 , Ar, H_2O , CO_2 , Ne, H_2 , He, Kr, Xe. Az első három, 99.9%-át teszi ki a száraz, vízgőzmentes levegőnek. A szén-dioxid kb. 300 éve állandóan növekvő mennyiségben fordul elő (1. ábra), és a melegházhatás első számú okozójának tekintik, jóllehet erre közvetlen bizonyítékok nincsenek. A vízgőz, mely az üvegházhatás valóban elsőszámú okozója, az alsó légkörben nagyon egyenlőtlen, 0,1% és 4% között változó eloszlásban található, mennyisége nagymértékben függ az éghajlati körülményektől, a hőmérséklettől és a légköri nyomástól, valamint a földrajzi (helyi) feltételektől. Légköri mozgékonyasága, kicserélődése és munkavégző képessége rendkívüli. A vízgőz az üvegházgázoknak Királynője kellene legyen, de jelenleg, sajnos csak Hamupipőkéje.

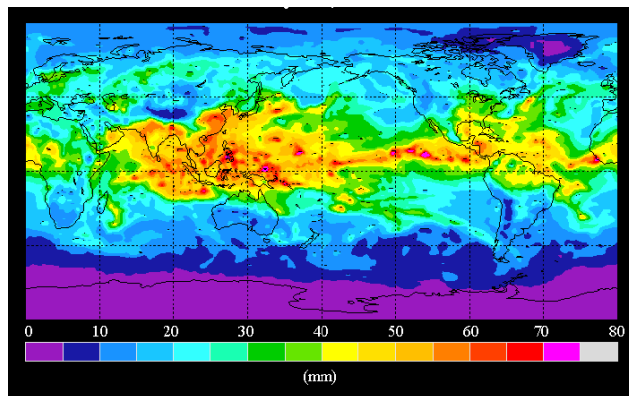
A gázokon és a vízgőzön kívül, finom eloszlásban cseppfolyós és szilárd anyagok, ún. aeroszolok is előfordulhatnak légkörünkben, melyeknek szerepe ugyancsak jelentős.

Jelen dolgozat az emberi eredetű vízgőz éghajlat-módosító hatását igyekszik kihangsúlyozni, jóllehet ez nem könnyű feladat, mivel csak közvetett bizonyítékokkal lehet számolni. Ez esetben a víz különleges saját-ságaiból és a földi körülmények közötti rendkívüli viselkedéséből kell kiindulni. Több mint tízmilliárd, közvetlenül emberi tevékenységhez kapcsolódó, különböző méretű, fizikai, vegyi vagy biológiai alapon működő vízgőzfejlesztő veendő figyelembe. Ezeken kívül az emberi tevékenységekhez közvetett módon kapcsolható, nagyszámú vízgőzfejlesztővel is lehet számolni.



1. ábra

A légkör CO_2 tartalmának exponenciális növekedése, havi átlagos ábrázolással. Manua Loa (Hawaii) mérőállomás adatai alapján [7b], [8a].



2. ábra

A teljes függőleges víz-tartalom globális áttekintése mm-ben, 1989 júliusában [7a].

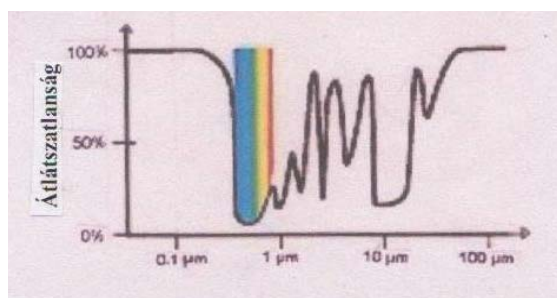
2. A LÉGKÖRBE ELŐFORDULÓ VÍZ RENDKÍVÜLI VISELKEDÉSÉNEK KÜLÖNBÖZŐ SZINTJEI

A légköri víz különleges viselkedésének a következő öt szintje különböztethető meg: 1) molekuláris, 2) asszociációs, kondenzációs, 3) fázisátalakuláshoz kapcsolható nedvességszállító, 4) csapadékképződés, főleg a felhők szintjén, 5) az északi és déli félteke között, emberi tevékenységek hatására kialakult, határozott különbség szintje.

2.1. Molekuláris szint. A 3-5 atomos molekuláknak az üvegház hatásban betöltött szerepe

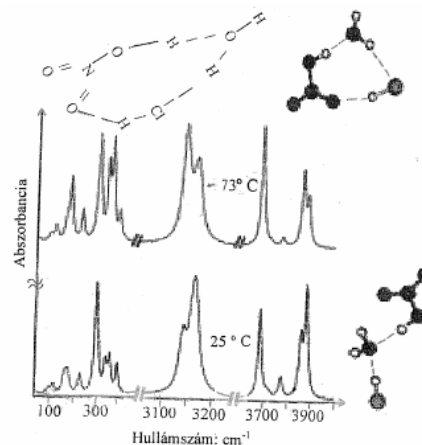
A levegő összetevőinek egy része, a nemesgázok, egyatomosak és gömbszimmetrikus elektroneloszlással bírnak, míg a fő összetevő, kétatomos molekulák, nem polárisak. Ennek következtében, a napsugárzással csak rendkívül korlátozottan lépnek kölcsönhatásba. Elsősorban a három háromatomos molekulának, az O_3 , CO_2 és H_2O rövidhullámú napfényelnyelését és a hosszuhullámú földi sugárzáselnyelését kell megvizsgálni. Nyilván még érdeklődésre tarthat számot a metán, nitrogén oxidok és kénoxidok ilyenszerű viselkedése is. A 3. ábra a légkör üvegházgázainak eléggé hosszuhullámú (lágy ibolyántúli, látható és vörösön inneni tartományának) fényelnyelését mutatja be.

Az ózon főleg a felső, de az alsó levegőrétegekben is előfordul. A sztratoszférában kialakítja az ún. ózonpajzsot. Háromszög alakú molekulaként könnyen lép kölcsönhatásba a napfény különböző energiájú fotonjaival. Elnyeli az ibolyántúli sugárzást, üvegházhatása is van, visszatartva a Föld felületéről kibocsátott hősugarak egy részét.



3. ábra

Üvegházgázok abszorpciója 0.01-100 μm (UV-lágy, látható, IR) tartományban [7b, c]



4. ábra

A víznek HCl-al és salétromsavval képzett klasztere -73 °C-on erősebb H-kötésekkel gyűrűs vegyületet képez, de 25 °C-on a gyűrű felhasad, és láncá alakul [13]

A lineáris szén-dioxid molekula alapállapotban nem poláris, gerjesztett állapotban azonban poláris, és így alkalmassá válik a sugárzásokkal való kölcsönhatásokra. A Földről visszasugárzott, ún. teresztriális sugárzásokat nyeli el.

A vízgőz különleges szerepe az üvegházhatásban elsősorban annak tulajdonítható, hogy a V-alakú, illetve lapított (torzított) tetraéderhez, vagy látszólag háromszöghöz hasonlítható, hajlított szerkezetű, aszimmetrikus pörgettyű típusú vízmolekulák állandó dipólus nyomatékkal rendelkeznek. Ezáltal kölcsönhatásba léphetnek az elektromágneses sugárzásnak mind a látható, mind a mikrohullámú, illetve infravörös összetevőivel. A víz az egyetlen olyan szabálytalan szerkezetű molekula, amely viszonylag jelentős töménységben van jelen a légkörben, nagy tartalékokkal rendelkezik a Föld felszínén (pl. az óceánokban), és a légkörben is képes halmazállapot-váltásokra. Színképe nagyon bonyolult szerkezetű. Gyenge gerjesztésnél a hosszuhullámú sugárzás, míg a többi fotonos gerjesztés a rövidhullámú sugárzás elnyelését okozza.

A 3. ábrával összhangban, de elméleti elgondolások alapján is [9], a földi sugárzások elnyelésének 65-70%-áért a vízgőz a felelős. Más megfontolások alapján ez az elnyelés elérheti a 80%-ot is. A szén-dioxid viszont csak 20-24 %-os elnyelést biztosít a vörösön inneni tartományban. Az ózon 6-8%-os elnyelésért, a metán és nitrogén-oxidok további 6-8%-ért felelősek.

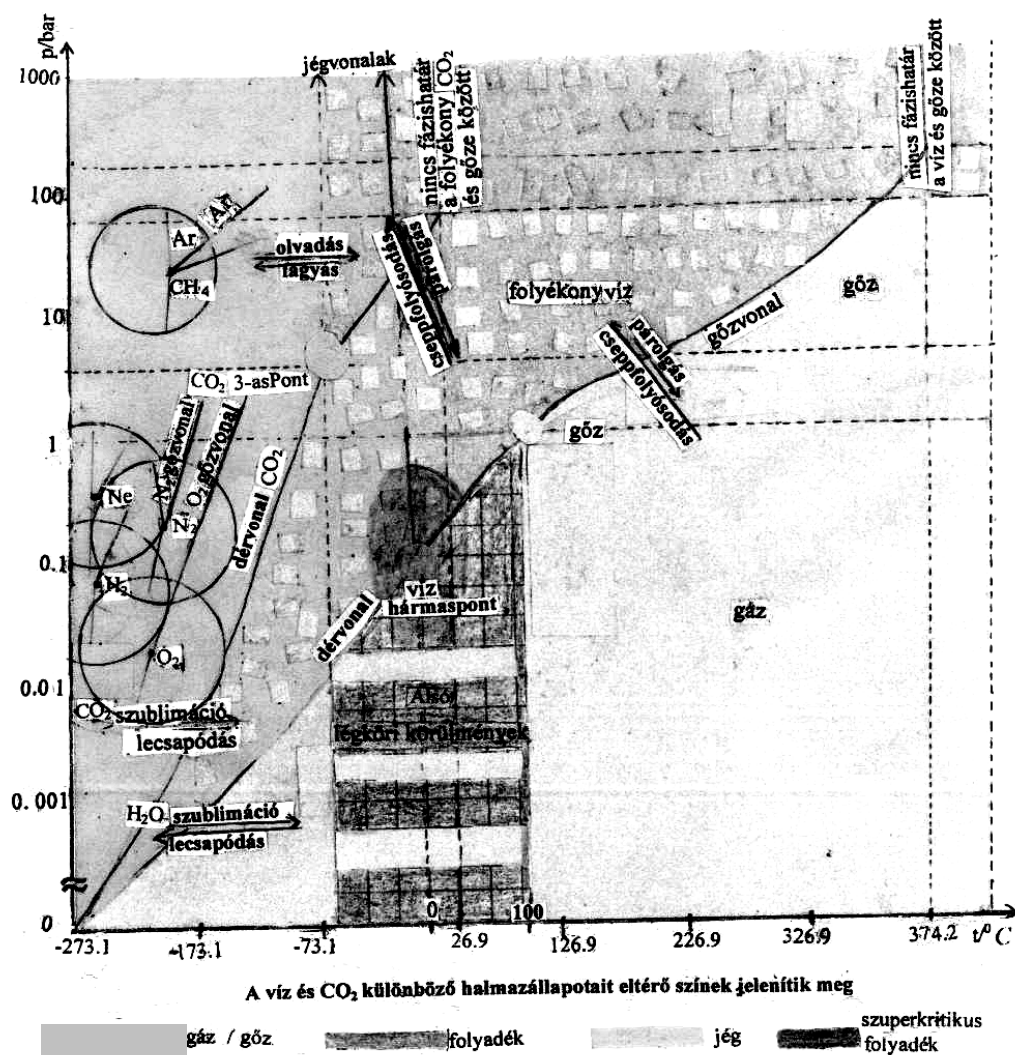
2.2. Hidrogén kötésen alapuló asszociációs szint

A vízmolekulák H-kötéseket alakítanak ki szinte minden légköri alkotóval (még a szén-dioxiddal is). Vegyi kölcsönhatásba lépve víztartalmú képződmények, klaszterek képződnek [10, 11], amelyek főleg a földközélszől visszasugárzott hosszuhullámú fényenergiát nyelhetik el, és minél alacsonyabb a hőmérséklet, annál állandóbbak az asszociátumok. Elterjedtek a víz-víz ($n > 1$, ahol n az asszociátumban szereplő vízmolekulák számát jelöli), a kénsav-víz klaszterek, a $HNO_3 + HCl$ tartalmú hidrát (4. ábra), és a nemes-gázokkal kialakuló víztartalmú, eléggé instabil, van der Waals erőkkel összetartott képződmények [12]. A 4. ábrán feltüntetett két elnyelési színkép közül a felső bonyolultabb, a klaszterben erősebb kötések kialakulására utal, össz-

hangban az alacsonyabb hőmérséklettel. Szobahőmérsékleten a szinkép egyszerűbb az előbbihez képest, a klaszterben a kötések gyengébbek, a gyűrű felhasad a HNO_3 és HCl molekulák között, és lánc képződik [13].

2.3. A légköri vízgőz fázisátalakulásai – a kondenzáció szintje

A légköri vízmolekulák kondenzációja és p-T diagram alapján [14] értelmezhető fázisátalakulása egyedi és meghatározó viselkedést képvisel (5. ábra). A hármaspontban külön-külön, három görbe – a párolgási, olvadási és szublimációs görbe – dér-, jég- és gőzvonal találkozik. Alsó légkörünkre jellemző nyomás-hőmérséklet tartományban (≤ 1.1 bar, $-40^\circ\text{--}100^\circ\text{C}$) a levegő összetevői közül csak a víz hármaspontja található ($0.006^\circ\text{C} = 273.156\text{ K}$ hőmérsékleten és 6.11 mb göznyomáson), amelyben ennek a különleges és jelentős folyadéknak, a víznek mindhárom fázisa (vízgőz, víz, jég) egyensúlyban van egymással. A vízgőz cseppfolyósodásának, fagyásának, elgőzölgésének lehetőségét a hármaspontja körül kiszínezett p-t tartomány adja vissza. Földünk azért az élet bolygója, mivel a felszínhez közeli légkör olyan jól körülhatárolt hőmérséklet és nyomástartománnyal bír, amelyben csak a vízgőz cseppfolyósodik, illetve alakul át hóvá vagy jéggé. Légköri körülmények között a többi összetevőnek a hármaspontja nem valósul meg, tehát egyik sem cseppfolyósodik. A víz dér-, jég- és gőzvonal felett csak a víz mehet át folyadék, illetve jég állapotba. A szén-dioxid dér-, jég- és gőzvonal felett a vízen kívül a szén-dioxid is cseppfolyósodhatna, illetve jéggé alakulhatna, de ilyen körülmények nem valósulnak meg a légkörben. A levegőben jelentős mennyiségben előforduló gázokat az ábrán megfelelő pi-ti középpontú körök jelzik. Az adott gáz hármaspontját a kör középpontja és az ebben meghúzott vonalak, a dér-, jég- és gőzvonalak közelítő irányát jelölik.



5. ábra

A levegő néhány összetevőjének, de különös részletességgel a vízgőz és szén-dioxid nyomás-hőmérséklet ($p=f(t)$) függése.

A Föld hidrológiai rendszerében a légkör víztartalma a legkisebb, az óceánok, a sarkvidéki jégtakaró és a szárazföldi vízkészlettel való összehasonlításban, jóllehet jelentős szerepet játszik a hidrológiai körforgásban, hisz a légköri vízgőz gyorsan, átlagosan 10-12 naponként cserélődik ki. A légkör e hidrológiai rendszer szívének tekinthető, mivel a vízgőz, a p-t fázisdiagram alapján bekövetkező fázisátalakulásaival elősegíti a víz állandó mozgását, szállítását.

2.4. A felhők révén kibontakozó csapadékképző és nedvességszállító szint

A víznek ez a negyedik szinten megmutatkozó rendkívüli sajátága, a Föld időjárási folyamataiban és az éghajlati viszonyok kialakításában meghatározó szerepet játszik. A hőmérséklet- és nyomáskülönbségek miatt kialakuló függőleges és vízszintes nedvesség-szállítás mindhárom halmazállapotban, és az egész földi légkörre kiterjed. A légkör egy nagyon összetett dinamikus rendszer [2, 15]

A zivatarcellák keletkezésénél egy kiváltó impulzus (pl. az emberi eredetű vízgőz hirtelen megjelenése) a beindult felszálló mozgást egy adott ponttól magától emelkedővé változtathatja. Az éghajlati modellek túl durva felbontásúak ahhoz, hogy figyelembe vegyenek minden kisebb légköri képződményt, pl. nagy tó fölött megjelenő felhőt, vagy a lejtőszelvény egy meleg nyári napon.

A légkörben legalább a következő négy globális mérlegfeltételnek kell teljesülnie: 1) a vízforgalom mérlege, 2) a hőháztartás mérlege, 3) Föld-légkör rendszer impulzusmomentum mérlege, 4) a légtömegek eloszlásának egyensúlya. Így kialakul vízszintes szállítás (advekción) a száraz területeken, főleg a trópusokon és a közepes szélességek között, illetve függőleges szállítás (konvekción) a trópusokon, ahol a magas cumulonimbus tornyok képződnek, valamint a nagyskálájú emelkedő és süllyedő mozgások a magas szélességeken, ahol a réteges felhők az uralkodók.

2.5. Az északi és déli félteke között, emberi tevékenységek hatására kialakult, határozott különbség szintje – a légköri vízgőz különleges és rendkívüli viselkedésének ötödik szintje

Az északi és déli félteke közötti különbségek alapvetők. A VFe (vízzel/jéggel borított területek) a Föld felületének több mint 2/3-át teszik ki (1. Táblázat). Az ÉFT-en a SzF felülete kétszer nagyobb mint a DFT-en, sőt a lakosság közel 90%-a az ÉFT-n tevékenykedik [16] és bocsátja a légkörbe a tőle eredő vízgőz legalább 90%-át.

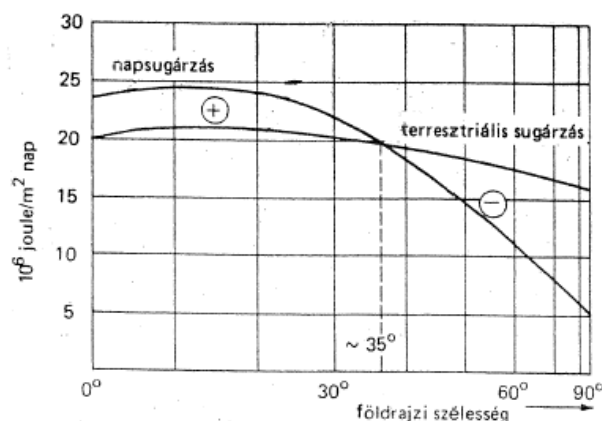
1. Táblázat. A Föld és a féltekék szárazföld(SzF) illetve óceán(VFe) megoszlása

3 földi terület km ²	%	3 földi felület km ²	%	3 szárazföld km ²	%	3 ÉFT-terület km ²	%				
Föld	510072000	100	VFe	361126400	100	SzF	148945600	100	ÉFT	255036000	100
VFe	361126400	70.8	VFeÉFT	154547240	42.8	SzFÉFT	100588760	67.5	SzF	100588760	39.4
SzF	148945600	29.2	VFeDFT	206579160	57.2	SzFDFT	48456840	32.5	VFe	154547240	60.6

Rákóczi Ferenc a múlt század végén az ELTE Meteorológiai Tanszékén [8d, 8e], kiértékelte a légköri vízgőz mennyiségét és megoszlását a két féltekén havi lebontásban (2. Táblázat). Az ÉFT-en nyáron és különösen augusztusban a legnagyobb a légkör vízgőztartalma, míg januárban a legkisebb. A DFT-ére is igaz a megállapítás, csak januárban van a nyári meleg hónap és augusztus a leghidegebb téli hónap. Az emberi tevékenységek következtében termelt vízgőz nyáron megemelkedik az ÉFT-en, míg télen cseppfolyósodik vagy kifagy, és a két félteke vízgőztartalma egyenlővé válik. Bebizonyítható, hogy augusztusban több mint 25%-a az ÉFT vízgőz-tartalmának emberi eredetű többlet, mely bekerül a légkörözésbe, és az Északi Sarkra (ÉS) is jut belőle. Januárba a többlet eltűnik a már jelzett okok miatt. Olyan adatok is rendelkezésünkre állnak [17, 18], amelyek bizonyítják, hogy a nyári hónapokban az ÉS-ra nagy mennyiségű csapadék hull, mely az északi tengerek vizének nyári hőmérsékletét is emeli.

2. Táblázat. A két félteke és a Föld légkörének átlagos vízgőztartalma, 10¹² tonnában, havi és évi lebontásban

	Északi félteke	Déli félteke	Föld
Január	4,9	7,2	12,1
Február	5,0	7,4	12,4
Március	5,2	7,2	12,4
Április	6,0	6,6	12,5
Május	7,0	5,7	12,7
Június	7,9	5,4	13,3
Július	8,7	4,9	13,5
Augusztus	8,8	4,8	13,6
Szeptember	8,2	5,1	13,3
Október	7,0	5,8	13,2
November	5,9	6,1	12,0
December	5,2	6,7	11,9
Átlag	6.7	6.1	12.74



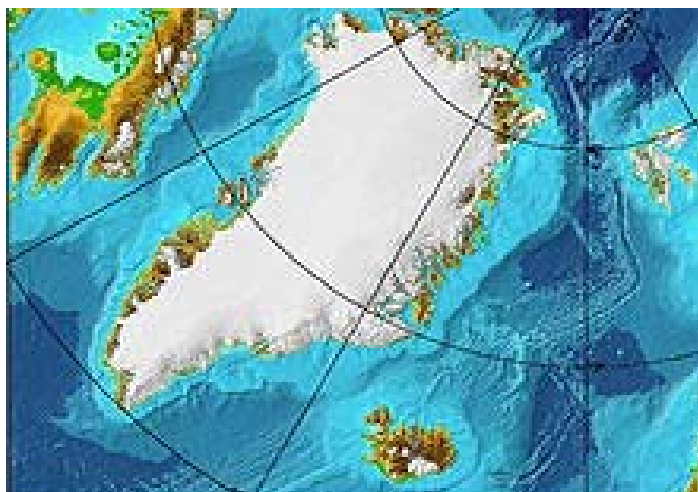
6. ábra

A Föld két fajta sugárzási energiájának változása a földrajzi szélességgel

A trópusokon kívüli övezetnek ($35^{\circ} - 90^{\circ}$ és $-35^{\circ} - -90^{\circ}$) energia hiánya van, mivel több energiát sugároz ki, mint amennyit a Naptól kap (6. ábra). A szubtrópusok nagy sugárzási bevétele nem a légkört melegíti, hanem az óceánok vizének párologtatására fordítódik. Ez a vízgőz az Egyenlítő felé szállítódik, ahol a csapadékképződés miatt latens hő szabadul fel, amely melegíti a légkört. Ezáltal az Egyenlítő övezete egy általános, sark felé mutató, intenzív feláramlás színterévé válik [2c]. A sarkvidék sugárzási veszteségének legnagyobb részét földközelsben a vízgőz szolgáltatja rejtett (latens) hő pótolja.

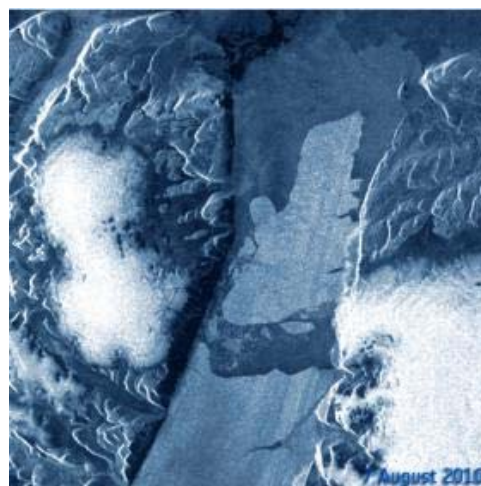
3. AZ ÉSZAKI SARKVIDÉK JELENLEGI ÁLLAPOTA HŰEN TÜKRÖZI AZ EMBERI EREDETŰ LÉGKÖRI VÍZGŐZ FELMELEGEDÉST OKOZÓ HATÁSÁT

Az utóbbi tíz-húsz év nyarán az északi sarkvidék (ÉSV) hőmérsékletének emelkedése és jegének előre nem látható, felgyorsult olvadása megy végbe. Az Északi Jeges Tenger néhány éve nyaranta áthajózható, mely az emberi történelemben még eddig soha sem fordult elő. 2010 nyarán, Grönland környékén (7a. ábra) a hőmérséklet és az olvadás mértéke meghaladta a 2007-es értékeket, és ezzel a legmagasabb csúcsra emelkedett. Augusztus 3/4-én egy nagyjából 260 négyzetkilométeres felületű óriás darab szakadt le az Észak-Nyugat-grönlandi Petermann gleccserből. A Petermann gleccser jégnyelve eddig a Grönlandban észlelt legnagyobb egészben leváló jég-sziget (7b. ábra). Az Európai Űrügynökség (ESA) Envisat nevű műholdjának szeptember elsejei felvételeiből összeállított, ASAR detektorral rögzített radarképei szerint, a jéghegy mintegy 28 kilométerre távozott a gleccser születési helyétől. Szeptemberben a Petermann jéghegy már két részre tört. Az ÉNy grönlandi Petermann gleccser 2010 nyarán bekövetkezett hirtelen olvadását és átalakulását sok szakember pontosan előrelátta [16], mely a szakterület szép sikerének tekinthető. Ez is bizonyítja Földünk felületének és légkörének állandó, lassú melegedését. A sark és a sarki jég kutatói szerint melegedő világunkban a legnagyobb mértékű melegedés a sarkokon várható.



7a. ábra

Grönland szigete, délen Izland, DK-en Skandinávia körvonalai, ÉNy-on néhány ÉK kanadai sziget



7b. ábra

A Petermann gleccser és jégnyelve

Az óceán felmelegedése okozza (talán) a legnagyobb jégtömeg-veszteséget. A tengerre kifutó gleccsek áramlásának gyorsulása révén növekszik a szárazföldi jég olvadása is, végső soron mindkettő az óceán felmelegedése miatt [19]. Az 1997-es grönlandi óriás, tengerre kifutó gleccser, a Jakobshavn Isbrae gyors olvadását, (a Nature Geoscience online kiadásában közölt kutatási eredmények alapján [20]) az óceán felületalatti hirtelen felmelegedése okozta. Az online cikk szerzői az Észak-Atlanti régió légkörzésében végbemenő változásokra, folyamatokra vezetnek vissza az óceán vizének hőmérsékletemelkedését. Mindez teljes összhangban van jelen közlemény azon megállapításával, hogy az ÉFT melegebb légköre, annak emberi tevékenységek okán nagyobb vízgőztartalma meghatározza nyáron a melegebb nedves levegő és sok eső eljutását az ÉSV-re, mely ott nagymértékben melegíti a tengerek vizét is.

A Pennsylvániai Állami Egyetem kutatói arra figyelmeztettek, hogy a nyári hőmérséklet 2-7 fokkal emelkedése esetén néhány évtized alatt az egész grönlandi jégtakaró elolvadhat, 6-9 méterrel növelve a tengerek vízszintjét. Földünkön az emberi élet jövőbeni alakulásának riasztó képe tárul elénk. A globális felmelegedés az ÉS-on mutatja meg, jól megfigyelhetően, romboló hatását. A modellezések eddigi rendszere felmondta a szolgálatot, mely arra mutat, hogy a felmelegedés nem tulajdonítható csupán a CO₂-nak és az eddig figyelembe vett üvegházgázoknak.

Egyre inkább az Atlanti-Óceán cirkulációjának megváltozására terelődik a gyanú. Ha ugyanis módosul a légkör általános körzésének szerkezete, akkor az megváltoztathatja az észak-atlanti térség (általában kialakított) szubtrópusi és szubpoláris vízkörének az elrendeződését – ha pedig a meridionális sűrűség-gradiens például a poláris óceáni tartományokban a felmelegedésnek vagy a sötöttség csökkenésének következtében kisebb lesz, a termohalin cirkuláció legyengülhet. A globális felmelegedés kialakulását nem a globális átlaghőmérsékletre gyakorolt hatása adja, hanem az, hogy mennyire befolyásolja a vízgőz szállítását. Elképzelhető, hogy az üvegházhatás elősegíti az átmenetet az eljegesedés felé azáltal, hogy növeli a sarkok és az Egyenlítő közötti hőmérséklet-különbséget, és növeli a sarkok felé irányuló víz/hó szállítást. A sarkok környezetét kivéve az óceánok és kontinensek viszonylag melegek maradnak, bár az éghajlat egyre inkább instabillá válik. Végül a sarkokon felhalmozódó jég elindul a közepes földrajzi szélességű óceánok felé, és a kontinensekre is elhozza a jégkorszaki állapotokat.

A jelenlegi helyzet ettől főleg abban különbözik, hogy a nagy mennyiségű emberi eredetű tavasszal és nyáron jelentkező vízgőz elsősorban nyáron melegíti az ÉS-t. Elmondható, hogy a vízgőz okozta földi felmelegedés legfinomabb érzékelője az Északi Sarkvidék. A feladat az lenne, hogy csökkentjük az emberi eredetű vízgőz mennyiségét, leállítsuk az ÉS melegedését, és visszaállítsuk, ha lehet a 100-300 év előtti állapotokat. A tudomány, technika és a kormányok feladata a légkör vízgőztartalmának csökkentése és az Északi-sark fagyott állapotának visszaállítása.

IRODALOM

- [1] a) Working Group I: Climate Change 2001, Ch.7: „Physical Climate Processes and Feedbacks” in IPCC TAR 2001 Ch. 7 – www.ipcc.ch, b) IPCC AR4, 2007, c) www.copenhagendiagnosis.com
- [2] Czelnai R., Götz G. és Iványi Zsuzsanna (1998): Bevezetés a meteorológiába II. A mozgó légkör és Óceán, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest a) 346-347 o., b) 11-14 o., c) 56-61 o., 303-307 o.
- [3] M. Hantel, volume editor (2005): Observed Global Climate in Landolt--Börnstein, New Series, Group V. Geophysics, Vol. 6, Springer-Verlag, Berlin, a) p. 5-4, b) p. 5-11.
- [4] Pentagon jelentés (2004), Magyar Szó Online február 21. és 22.szám.
- [5] F.M. Miskolczi a) (2007): Időjárás Vol. 111. No. 1., p. 1-40., b) (2010): Energy & Environment Vol. 21, No. 4. p. 243-262.
- [6] a) Muzsnay Cs. (2010) Műszaki Szemle (EMT) V. 49 29-35 old., b) Muzsnay Cs. (2009) XV. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Marosvásárhely, 59. old., c) Muzsnay Cs. és ifj. Muzsnay Cs. (2009) XV. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Marosvásárhely, 77. old., d) Muzsnay Cs. (2009), A Magyar Tudomány Napja Erdélyben, Őszi Természettudományi Konferencia, Kolozsvár, 34 old. e) Muzsnay Cs. – összegyűjtött előadások, dolgozatok: Önkéntes Műnyilvántartási szám: 001277/2010 – Magyar Szabadalmi Hivatal, f) Muzsnay Cs. (2010) A fenntartható fejlődés, valamint a környezet- és természetvédelem összefüggései a Kárpát-medencében, Pécs – előadás, szeptember 15
- [7] Environmental Science Published for Everybody Round the Earth Educational Network on Climate, ESPERE Climate Encyclopaedia - author: Dr. Elmar Uherek (2004, állandóan bővítve) - Max Planck Institute for Chemistry Mainz; Magyar változat (<http://www.atmosphere.mpg.de/enid/2640>): I) Légkör/Alsó légkör; <http://www.espere.net/> a) alsólégkör, alapfok, 3. komponensek (forrás: NASA vízgőz project NVAP alapján <http://www.cira.colostate.edu/climate/NVAP/nvapcira.htm>). b) alsólégkör , haladó, 4. Gázok a légkörben 1. Eloszlás & Koncentráció, c) alsólégkör, haladó, 2. Sugárzás & Üvegházgázok / Vízgőz és a felhők.
- [8] Rákóczi Ferenc (1998): „Életterünk a légkör”, Mundus Magyar Egyetemi Kiadó, Budapest. a) 41 o., b) 40 o., c) 32-38 o., d) 50 o. [8e] Rákóczi Ferenc (1979), Időjárás, V. 83 (2) 79-93 o. [8f] Rákóczi Ferenc (1974), J. Hung. Meteorol. Sc. V. 83 (2), p.79-93 o. [8g] Rákóczi Ferenc (1989), Z. Meteorol. V. 39 (4), p. 193-201.[8h] Rákóczi F., Vízügyi Közl.) (1989) V. 71, 512-520 o., b) (1995), V. 77, 199-204 o.
- [9] a) Császár Attila (2009), Természet Világa, V.140(2), 60-64; b) Császár A., Furtenbach T., Czákó G. (2006), Magy. Kém. F. 112 (4) 123-8.
- [10] Cs. Muzsnay (1984) a) Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Ser. Chem. 29, 49. b) Magy. Kém. Foly. 93(2) 54, (1987).
- [11] M. Chaplin, „Water Structure and Behavior”; <http://www.lsbu.ac.uk/water/molecule.html>; (<http://www.lsbu.ac.uk/water/chaplin.html>) - rendszeresen és gyakran felújított fejezetekkel.
- [12] E. Tsivion, R. B. Gerber, Chem. Phys. Lett., 482, 30 (2009).
- [13] P. C. Gómez, O. Gálvez, Mosteo R. G., Cr. Puzzarini, R. Escibano, Phys. Chem. Chem. Phys., 12, 4617, (2010).
- [14] P.W. Atkins: „Fizikai kémia” I. kötet, Tankönyvkiadó, Budapest, 1992, 1. és 6. fejezet.
- [15] Czelnai Rudolf (1993): Bevezetés a meteorológiába I. Légkörtani alapismeretek, Nemzeti Tankönyvkiadó , a) 93-95 o., b) 110 o, c) 125 o., d) 122 o. és 130 o., e) 115-118 o.
- [16] <http://www.sulinet.hu/tovabtan/felveteli/2001/11het/foldrajz/foci11.html> , hivatkozás: a) Sárfalvi-Tóth: Földrajz I. 252-267. o., b) Bernek - Sárfalvi: Általános társadalomföldrajz 14-33. o. és 49-54. o.
- [17] M. Hantel, volume editor (2005): Observed Global Climate in Landolt-Börnstein, New Series, Group V. Geophysics, Vol. 6, Springer-Verlag, Berlin, a) p. 5-4, b) p. 5-12.
- [18] W. D. Sellers 1965, Physical Climatology, Chicago-London, 1969.
- [19] P. Lockerby, Science20.com, August 25th 2010.
- [20] D. M. Holland, R. H. Thomas, B. De Young, M. H. Ribergaar, and B. Lyberth 28 Sept. 2008 doi 10.1038/ngeo316.

Rokon szerkezetű molekulák viselkedése a resolválás folyamataiban

Behaviour of Structurally Similar Molecules in the Resolution Processes

Comportamentul moleculelor cu structuri similare în procesele de rezoluție

PÁLOVICS Emese¹, SCHINDLER József¹, FAIGL Ferenc², FOGASSY Elemér²

¹ MTA Szerves Kémiai Technológia Tanszéki Kutatócsoport,

² BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék, H-1111 Budapest, Budafoki út 8.

ABSTRACT

The resolution of racemic compounds with structurally similar resolving agents were examined. Summarizing our experimental results, we can establish, that the SDE (self-disproportionation of enantiomers) characteristic for the mixture of enantiomers of the racemic compound, determines not only the results of the separations (of enantiomer mixtures and diastereomers) but the behaviour of diastereomers obtained.

ÖSSZEFOGLALÁS

Rokon molekulászerkezetű racém vegyületek és enantiomerek resolválásait vizsgáltuk. Kísérleteink eredményeit összegezve megállapíthatjuk, hogy a racém vegyület enantiomer keverékeire jellemző SDE („self-disproportionation of enantiomers; önszerveződés”) meghatározza az elválasztások (mind az enantiomer keverék mind pedig a diasztereomer elválasztás) eredményét, és a keletkezett diasztereomerek viselkedését is.

Kulcsszavak: Reszolválás, önszerveződés, enantiomer-keverékek, enantiomer-tisztaság, resolválhatóság, rokon királis és akirális molekulászerkezetek, kvázi konglomerátum ill. racémát viselkedés.

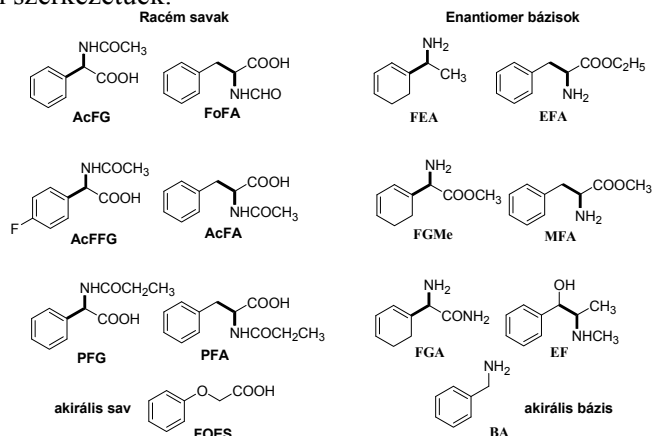
Mai ismereteink alapján tudjuk, hogy enantiomereket egymástól elválasztani csak akkor lehet, ha elérjük, hogy két fázis közötti megoszlással elkülönüljenek egymástól (olyan körülményeket kell létrehoznunk, amelyek között az enantiomer keverékekben kialakuló homokirális és heterokirális, egymással diasztereomer viszonyú asszociátumoknak, vagy a belőlük idegen királis reagenssel keletkező diasztereomereknek erre lehetőségek van).

Ha az enantiomer keveréknek csak az egyik enantiomerjével ekvivalens idegen királis reagenst alkalmazunk, akkor a diasztereomer(ek) és az enantiomer(ek) két fázis közötti megoszlását érhetjük el. Ily módon, a két fázis elválasztásával az enantiomer keverékeket elkülönítjük, és a kapott *ee* értékek a két fázisban nem egyeznek a kiindulási *ee*₀ értékével és természetesen egymással sem [1-9].

Munkáink során azt tapasztaltuk, hogy bármilyen enantiomer elválasztást választunk (végzünk) – beleértve az idegen királis reagens (reszolválóagens) alkalmazásával végzeteket is – végsősoron az elválasztás korlátait (*ee*, *T*, *F*) mindig az eredeti racém vegyület enantiomer keverékeinek a viselkedése határozza meg. Tehát az SDE [10] meghatározza nemcsak azoknak az resolválásoknak az eredményeit amelyekben enantiomer keverékeket választunk el [11], hanem a belőlük keletkező diasztereomerek elválasztásainak az eredményét is, ha a resolválóagens rokon szerkezetű az enantiomer keverékkel.

Úgy véljük, hogy előnyös lehet, ha a resolválás folyamataiban használt vegyületek szerkezetei minél jobban közelítenek egymáshoz, tehát a racém vegyületek és a resolválóágensek egymással rokon szerkezetűek legyenek, mert ekkor a racém vegyületek enantiomer keverékeire jellemző SDE az így létrejött kvázi enantiomer (diasztereomer) keverékek kvázi SDE-jét is segíti. Ezt kívántuk alátámasztani, amikor kísérleteink során a „holland resolválás”, valamint Pope és Peachey [12] megállapításait ötvözve, olyan resolválásokat végeztünk, melyekben savak resolválási lehetőségeit vizsgáltuk olyan bázisokkal, melyek szerkezeti rokon-ságban vannak a vizsgált racém vegyületekkel (1. ábra). Esetenként a resolválóagens felét rokon szerkezetű

királis vagy akirális reagensre cseréltük, illetve ugyanezt tettük a racém vegyületünk felével. Az alkalmazott akirális vegyületek is rokon szerkezetűek.



1.ábra

A vizsgált racém vegyületek és a velük szerkezeti rokonságban lévő resolválóágensek

A 1. táblázatban a racém vegyületeink és resolválóágenseink eredményes resolválásait foglaltuk össze, melyeket mindig vizes oldatból történő kristályosítással végeztünk.

1. táblázat. A rokon molekulaszervezetű vegyületekkel vizes közegben végzett resolválások eredményei

Racém vegy.	Resolválóágens	Diaszt. konfiguráció	ee%	F	megjegyzés kvázi
		Enant.-resz. ágens			
AcFG	FEA/FOES	R-R	31,0	0,30	racemát
	FGMe	S-R	78,7	0,40	
	FGMe/BA	S-R	85,1	0,55	
	FGMe/FEA	S-R	75,0	0,60	
	EFA	R-S	96,5	0,31	
	MFA	R-S	96,1	0,51	
AcFFG	FEA	S-R	69,4	0,28	racemát
	FGMe	S-R	86,3	0,59	
	FGMe/BA	S-R	77,5	0,66	
PFG	FGMe	S-R	68,5	0,24	racemát
	FGA	R-R	62,0	0,11	
	FAEt	R-S	87,4	0,29	
FoFA	FEA	R-R	90,8	0,40	konglomerátum
	FGMe	R-R	71,9	0,39	
	FEA/FGMe	R-R	72,4	0,29	
	FEA/BA	R-R	71,2	0,24	
	FGMe/BA	R-R	71,1	0,30	
AcFA	FEA/FOES	S-R	89,0	0,55	racemát
	FGME	S-R	55,0	0,26	
	FGA	S-R	77,5	0,43	
	FGMe/BA	S-R	95,0	0,18	
	FGA/BA	S-R	100	0,81	
	FGMe/FGA	S-R	100	0,80	
	EF	R-S	47,0	0,25	
	MFA	R-S	92,8	0,57	
PFA	FGMe	S-R	43,3	0,29	racemát
	FGA	R-R	63,3	0,48	
	EF	R-S	61,0	0,54	
	AD	R-R	67,0	0,42	

A legszembeütőbb, hogy a racém **FoFa** esetében minden resolválás eredményeképpen kapott diasztereomer homokirális összetételű, míg néhány kivételtől eltekintve a többi öt racém vegyület resolválása során kapott diasztereomerek heterokirálisak, tehát kvázi konglomerátum ill kvázi racemát viselkedésűek.

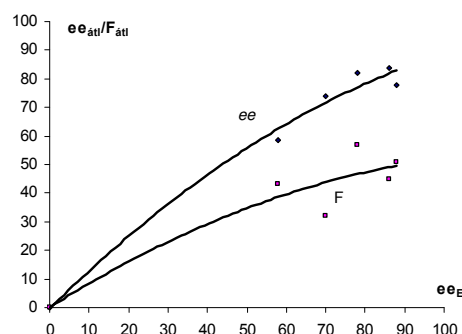
A kvázi SDE viselkedést még a statisztikai egyezés is igazolja, mert Jaques szerint az enantiomer keverékek becslésük alapján 90/10 arányban racemátok vagy konglomerátumok, esetünkben 83/17 arányú a kvázi racemát és kvázi konglomerátum aránya. Ez most azt is jelenti, hogy a racém vegyületeink enantiomer keverékeinek viselkedése befolyásolhatja a rokon szerkezetű resolválóágensekkel végrehajtható resolválások eredményét, hiszen korábban kimértük, hogy a resolválóágens enantiomer keverékeivel végzett resolválások eredménye az enantiomer keverék ee értékének is a függvénye [13].

Mindezek után azt vártuk, hogy az enantiomer keverékek viselkedése kihat a belőlük keletkező rokon molekulaszerezetű resolválóágensekkel végzett resolválások során kapott diasztereomerek viselkedésére is, miután kvázi racemátokat ill. kvázi konglomerátumokat képeznek.

A 2. táblázatban feltüntettük a racém vegyületeink rokon szerkezetű resolválóágensekkel végzett resolválásainak átlagos ee és F értékeit, valamint a racém vegyületek enantiomer keverékeinek viselkedését jellemző, kísérletileg meghatározott és mért eutektikus ee értékeit. Megállapíthatjuk, hogy a diasztereomer sókból kapott enantiomer keverékek és a megfelelő racém vegyületekhez tartozó átlagos ee értékek igen jól közelítik az eutektikus pontok ee_E értékeit, tehát ez utóbbiak meghatározzák, hogy milyen tisztaságú diasztereomer só válik ki a rokon szerkezetű resolválások során. Feltűnő, hogy azok a racém vegyületek amelyek enantiomer keverékeinek frakcionált kicsapásakor kinetikus kontroll lép fel, eltérően viselkednek. A resolválások átlagos eredménye (F) a konglomerátomot képző **PFG** esetében alacsonyabb (0,21) mint a racemátot képző **PFA** esetében (0,43).

2. táblázat. Az enantiomer keverékek tisztítása frakcionált kicsapással

Racém	ee_E kís.(mért)	$ee_{\text{átlag}}$ (%)	$F_{\text{átlag}}$	Kvázi enant.kev.
AcFG	87(86)	83.7	0.45	racemát
AcFFG	86 (88)	77.7	0.51	racemát
PFG	Kinet (kongl)	73.6	0.21	racemát
FoFA	69 (70)	73.8	0.32	konglom.
AcFA	78 –	81.9	0.57	racemát
PFA	Kinet (58)	58.7	0.43	racemát



Akkor is alacsony ez az eredmény (0.32), ha a diasztereomerek kvázi konglomerátumokat képeznek (a racém **FoFA** esetében).

Mindezek arra vezethetők vissza, hogy az enantiomer keverékek lényegesen nagyobb hányadát a stabilabb összetételű racemát vegyületek képezik, amiből következik, hogy a rokon szerkezetű diasztereomerek nagyobb hányadát is a heterokirális kvázi racemátok képezik.

Végül, ha a kiindulási racém enantiomer keveréket az eutektikus összetételének (ee_E) a függvényében ábrázoljuk a hozzájuk tartozó resolválásokból nyert kristályos diasztereomerek átlagos ee és átlagos F értékeit közel lineáris összefüggést kapunk.

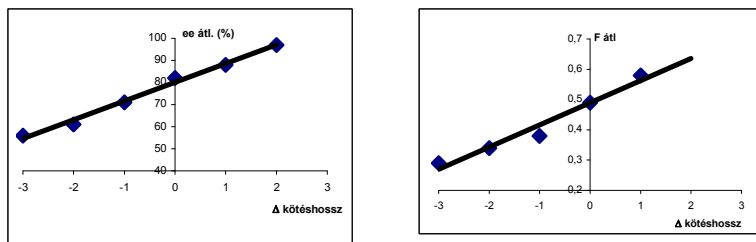
Tehát úgy tűnik, a rokon szerkezetű molekulákkal végzett resolválások kvázi enantiomer keverékként viselkednek és az elválasztások átlag eredményei a racém vegyületek enantiomer keverékeinek a viselkedésétől függenek.

Sakai [14] összefüggést talált rokon molekulaszerezetű vegyületek diasztereomereit alkotó molekula hosszak közti különbség és a resolválás eredményei között. Kíváncsiak voltunk, hogy az általunk végzett resolválások esetében is érvényes-e ez a megállapítás. A 2. ábra alapján számítottuk ki (a kötések számának figyelembevételével) a diasztereomereket képző enantiomerek és resolválóágensek molekulahossz különbségeit és az azonos relatív molekulahossz különbségekhöz tartozó átlagos ee és F értékeket ábrázolva, lineáris összefüggést találtunk (3. ábra), ami az általunk vizsgált vegyületek „rokon szerkezetét” igazolja.

	Δ kötés-hossz	$ee_{\text{átl}}(\%)$	$F_{\text{átlag}}$
	+2	97	0,31
	+1	88	0,58
	0	82	0,49
	-1	71	0,38
	-2	61	0,34
	-3	56	0,29

2. ábra

A relatív molekulahossz különbségek számítása és az azonos relatív molekulahossz különbségekhez tartozó átlag ee és F értékek



3. ábra

Az ee (átlagos) és F (átlagos) értékek változása a racém anyag és a rezolválóagens molekulahossz különbségének függvényében.

Ezek szerint várhatóan nem kedvező, ha az enantiomernél rövidebb a rezolválóagens. Ugyanakkor kedvező lehet a racém vegyülettel rokon molekulaszervezetű akirális vegyület jelenléte (**AcFA**- és **AcFG**-**FEA** rezolválóagens esetében a **FOES** jelenléte).

Megállapíthatjuk, hogy rokon molekulaszervezetű vegyületekkel végzett rezolválások során képződő diasztereomerek gyakran kvázi racémátot (heterokirális), ritkábban kvázi konglomerátumot (homokirális) képeznek, és az, hogy melyik fajta kölcsönhatás dominál, azt döntően a racém vegyület szerkezete determinálja.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetet mondanak az OTKA (T 75236) által nyújtott támogatásért.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] Jaques, J.; Wilen, S.H.; Collet, A.: *Enantiomers racemates and resolution* Wiley-Interf., N.Y. 1881.
- [2] Sheldon, R.A.: *Chirotechnology*, Marcel Dekker Inc. N.Y 1993.
- [3] Kozma, D.: *Optical resolutions via diastereomeric salt tranzactions*, CRC Press London 2002.
- [4] Faigl, F.; Kozma, D.: in *Enantiomer Separation: Fundamentals and Practical Methods*, (Ed. F. Toda), Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp 73, 2004.
- [5] Fogassy, E.; Nógrádi, M.; Pálovics, E.; Schindler, J. *Synthesis*, 10, 1555, 2005.
- [6] Fogassy, E.; Nógrádi, M.; Kozma, D.; Egri, G.; Pálovics, E.; Kiss, V. *Org. Biomol. Chem*, 16, 3011, 2006.
- [7] Faigl, F.; Fogassy E.; Nogradi M.; Pálovics E.;Schindler, J.; *Tetrahedron:Assymetry* 4, 519, 2008.
- [8] Sakai, K.; Sakurai, R.; Yuzawa, A.; Hirayama, N.: *Tetrahedron: Asym.* 2003, 14, 3716.
- [9] Eliel, E.L.; Wilen, S.H.; Monder, L.N.: *Stereochemistry of organic compuonds*, John Wiley-and Sons, New York, 1994.
- [10] Soloshonok, V.A.: *Angewandte Chemie International Ed.*, 45, 766-769, 2006.
- [11] Faigl, F.; Fogassy E.; Nogradi M.; Pálovics E.;Schindler, J.; *Org. Biomol. Chem*, 8, 947-, 2010
- [12] Pope, W.J.; Peachey, S.J.: *J. Chem. Soc.*, 75, 1066, 1899.
- [13] Pálovics, E.; Fogassy, E.; Schindler, J.; Nógrádi, M.: *Chirality* 19: 1-4 , 2007
- [14] Sakai, K.; Sakurai, R.; Nohira, H.: *Advantages of structural similarities of the reactants in optical resolution processes* in *Topics in Current Chemistry* (ed. Sakai, K), Springer Verlag, pp.199-231, 2006.

Zöld fluoreszcens fehérje irányított mutagenézise és a mutáció hatásának vizsgálata

Directed Mutagenesis of Green Fluorescent Protein and Study of the Mutation Effect

Mutageneza direcționată a proteinei fluorescente verde și analiza efectul mutației

SZABÓ Mária¹, KOVÁCS Erika¹, SZILÁGYI László^{2,3},
MIKLÓSSY Ildikó¹, ÁBRAHÁM Beáta¹, LÁNYI Szabolcs¹

¹Bukaresti Műszaki Egyetem, Alkalmazott Kémia és Anyagtudományok Kar, Bukarest, Splaiul Independenței, 313, tel. 40214029100, fax. 40213181005, palfimaria2004@yahoo.com, www.pub.ro

²Sapientia EMTE, Műszaki és Természettudományok Kar, Csíkszereda, Szabadságtér 1, tel. +40266317121, fax. +40266372099, lanyiszabolcs@sapientia.siculorum.ro, www.csik.sapientia.ro

³Eötvös Lóránd Tudomány Egyetem, Biokémia Tanszék, Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C, tel. +36 3812171 fax. +36 1 3812172, www.elte.hu

ABSTRACT

In this work we realized two fluorescent protein (EGFP- Enhanced Green Fluorescent Protein) mutants by site-directed mutagenesis. The mutants contain one or two histidine residues respectively in the proximity of the chromophore group. The two histidines (S202H, Q204H) were introduced by substitution of two amino acids. We investigated the effect of mutations on the structural stability of proteins, however, the effects of metal ions on the fluorescence of proteins.

ÖSSZEFOGLALÓ

Munkánk során helyspecifikus mutációval két zöld fluoreszcens fehérje (EGFP- Enhanced Green Fluorescent Protein) mutánszt hoztunk létre. A mutánsok egy, illetve két hisztidint tartalmaznak a fehérje kromofor csoportjának közelében. A hisztidineket két aminosav (S202H, Q204H) kicserélésével juttattuk be a fehérjébe. Vizsgáltuk a mutáció hatását a fehérjék szerkezeti stabilitására, ugyanakkor a fémionok hatását a fehérjék fluoreszcenciájára.

Kulcsszavak: Zöld fluoreszcens fehérje, helyspecifikus mutáció, kromofor, hisztidin

1. BEVEZETÉS

Napjainkban az élő szervezet bonyolult működésében szerepet játszó összetett molekulákat széleskörűen alkalmaznak különböző ipari műveletek kivitelezéséhez, környezeti problémák megoldásához. A fehérjéket a biomérnökök átalakítják, újratervezik ezáltal új funkcionális tulajdonságokkal ruházzák fel őket, ami lehetővé teszi, hogy az ipar számos területén igényeinket kielégítve elláthassanak különböző feladatokat. A fehérjéket gyakran alkalmazzák az élelmiszeriparban, gyógyszeriparban és a vegyiparban. Az enzimek különleges tulajdonságaik révén alkalmasak bonyolult reakciók katalizálására. Más fehérjék, mint például a receptorok képesek különböző vegyületek szelektív felismerésére, ami alkalmassá teszi őket bizonyos anyagok kimutatására.

A fehérjemérnökség a fehérjék átalakításának korszerű technikája, a fehérjéket kódoló gének irányított mutagenézise révén alakítja át a fehérjék szerkezetét. Az átalakítás célja lehet a fehérje működésének megértése vagy a fehérjék felruházása új funkcionális tulajdonságokkal, így azok a természetestől eltérő körülmények között, ipari és gyógyászati célra is felhasználhatóak.

A zöld fluoreszcens fehérje egy biolumineszcens fehérje, amelyet az 1960-as években izoláltak *Aequorea victoria* nevű medúzából [1]. 1992-ben közzétették a fehérjét kódoló gén szekvenciáját, valamint a *gfp* gén sikeres klónozását [2]. Ez egy jelentős előrelépés volt a fehérje rekombináns technológiával való előállításában.

A zöld fluoreszcens fehérje 238 aminosavból áll. Molekuláris szerkezetét 11 beta lemezből álló kompakt hordószerű struktúra képezi, amely körülzárja a kromofor csoportot [3]. Ez a kompakt szerkezet védelmet biztosít a kromofor csoportnak a környezeti hatásokkal szemben [4]. A fehérje kromofor csoportja egy posztranszlációs modifikáció során, spontán módon képződik, melynek során a fehérje polipeptid láncában három egymást követő aminosav (S65, Y66, G67) ciklizálódik, és kialakul egy konjugált imidazolinon gyűrű [5]. A fehérje csak a natív három dimenziós szerkezet kialakulása után fluoreszkál. Az EGFP a GFP egyik mutánsa, amely két mutációt (F64L, S65T) hordoz a kromofor régióban, ezáltal gyorsabban kerül érett állapotba és intenzívebben fluoreszkál [6].

A különböző expressziós rendszerekben termeltetett fehérje képes volt a natív állapot kialakítására és fluoreszcencia kibocsátására. A GFP génjét számos mutációnak vetették alá, ezáltal próbálták bizonyos tulajdonságait feljavítani [7]. Hamarosan széleskörűen alkalmazták fluoreszcens jelölő molekulaként. Felhasználták génexpresszió kimutatására, fúziós fehérjeként a sejten belüli lejátszódó folyamatok nyomkövetésére, más fehérjék lokalizációjának monitorizálására [8, 9, 10].

Kutatásunk célja az EGFP irányított mutációjával két mutáns fehérje létrehozása, valamint a mutáció hatásának vizsgálata a fehérje tulajdonságaira. Ezáltal próbálunk információt szerezni a fehérje szerkezete és tulajdonságai közti összefüggésekről.

2. KÍSÉRLETI RÉSZ

2.1. Az EGFP irányított mutagenézise

Az EGFP-t kódoló gén a pET15b vektorba volt klónozva. A pET 15b-EGFP plazmidot L. Radnaitól (Biokémia Tanszék, Eötvös Loránd Tudomány Egyetem, Budapest) kaptuk. A hisztidinek bevitelét helyspecifikus mutációval valósítottuk meg. A mutációt a Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit leírása alapján végeztük. A mutációhoz szükségünk volt az EGFP génjét hordozó plazmidra (pET15b-EGFP), valamint a mutációt hordozó primerekre. A primereket úgy terveztük meg, hogy komplementerek legyenek az EGFP-t kódoló szekvencia megfelelő szakaszával, ugyanakkor a megfelelő pozíciókban tartalmazzák a hisztidint kódoló kodonokat.

A mutáció során az EGFP-t kódoló szekvenciában a megfelelő pozíciókban lévő kodonokat kicseréltük hisztidint kódoló kodonokra. A mutációt a polimeráz láncreakció (PCR) segítségével hajtottuk végre. A reakció során a mutációt hordozó primerek bekötődnek az EGFP szekvencia megfelelő szakaszaihoz, és a *Taq* polimeráz enzim az eredeti plazmid mintájára kiépíti a mutáns plazmidot, beépítve a mutációt hordozó primereket is.

A folyamat következő lépése a PCR reakció termékének restrikciós emésztése, *Dpn* I restrikciós enzimmel, amely a metilezett DNS régiókat hasítja. Az emésztés segítségével eltávolítható a reakció elegyből a mutációt nem tartalmazó plazmid, amely metilezett. A mutáns plazmidot XL1-Blue szuperkompetens sejtekbe transzformáltuk, amelyek képesek a PCR reakció során képződött plazmid DNS-ben lévő hibák kijavítására. Utolsó lépésként a mutáns plazmidot izoláltuk XL1-Blue sejtekből, majd tisztítottuk annak érdekében, hogy az expressziós sejtvonal transzformálásához megfelelő plazmid preparátumot nyerjünk.

2.2. Mutáns fehérjék expressziója és tisztítása

Expressziós sejtvonalként az *E. coli* STAR sejtvonalat választottuk, mivel a szakirodalomban az EGFP-t hordozó pET 15b plazmidhoz ezt a sejtvonalat ajánlják. A mutáns fehérje előállítása érdekében a mutáns plazmidot hőshockkal transzformáltuk kompetens sejtekbe. A transzformálás után a sejteket ampicilines (100 µg/ml) Luria Bertani agaros lemezekre szétterítettük. A sikeresen transzformált sejteket antibiotikum rezisztencia alapján szelektáltuk. A kinőtt telepekből egyet átvettünk 3 ml Luria Bertani ampicilines (100 µg/ml) táplevésbe és növeltük 2 órát, 37 °C-on. Ezzel a sejtkultúrával, 1 ml/20 ml arányban, feldúsított ampicilines táplevést (2YT: 16% baktotripton, 10% élesztő kivonat, 5% só) oltottunk be, és tovább növeltük a sejteket, 16 órán át, 150 RPM rázatás mellett. Ezalatt a sejtek megtermelték a rekombináns plazmiddal bevitt gén terméket, vagyis a mi fehérjénket.

Mivel a mutáns fehérje a sejtek citoplazmájában expresszálódik, ezért szükséges a sejtek feltárása, a fehérje kinyeréséhez. Első lépésként a sejteket centrifugálással kiülepitettük, majd 50mM Na foszfát-pufferben (7 pH értékű) felszuszpendáltuk. Ezt követte a sejtek falának lizozim enzimmel való szétbontása. A lizálás

eredményeként kapott szuszpenziót két órán át $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk. Kiolvasztás után a szuszpenziót szonikáltuk, a DNS feldarabolása érdekében. Utolsó lépésként a kicsapódott DNS-t és a fehérjét centrifugálással kiülepítettük, az így kapott felülúszó tartalmazta a mi fehérjénket.

Az expressziós vektor tartalmaz egy hat hisztidint kódoló oligonukleotidot, amely az EGFP-t kódoló szekvenciához van fuzionáltatva. Így az expresszált EGFP N-terminális végén lesz egy hat hisztidinből álló oligopeptid, amely képessé teszi a fehérjét, hogy szelektíven kötődjön a Ni-NTA- Sepharose-hoz. A kötődés után a gyártó cégek útmutatásait követve eluáljuk a proteint Na foszfát pufferrel, amiben az imidazol koncentrációja 250 mM .

2.3. Spektrális tulajdonságok vizsgálata

Vizsgáltuk a vad típusú valamint a mutáns EGFP fehérjék emissziós illetve abszorpciós spektrumait. Az abszorpciós spektrumok felvételéhez 1 ml fehérje oldatot mértünk ki és Varian Cary 50 UV-Vis típusú spektrofotométert használtunk. Az emissziós spektrumok felvételéhez a fehérje-oldatot 100X hígításban használtuk. A mérésekhez 3 ml kvartz küvettát használtunk, $2\text{--}2\text{ ml}$ fehérje oldatot mértünk be és a méréseket Fluoro Max Spex 320 típusú fluoro spektrofotométerrel végeztük. A méréseket szobahőmérsékleten végeztük. A kapott spektrumokat normalizáltuk a fehérjék koncentrációjának megfelelően.

2.4 Mutáns fehérjék denaturációjának vizsgálata

A tisztított mutáns fehérjéket denaturáló körülményeknek tettük ki, vizsgálva a mutáns fehérje szerkezeti stabilitását. A denaturálást különböző koncentrációban guanidin hidrokloridot tartalmazó ($0,5\text{M}$ - 6M) Na foszfát (20mM , $\text{pH } 7$) pufferben vizsgáltuk, szobahőmérsékleten. A denaturációt a fluoreszcencia intenzitás változásának mérésével követtük.

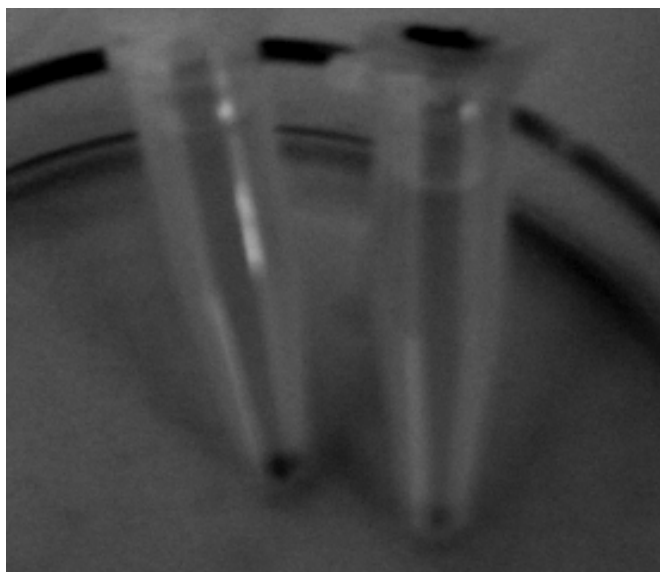
2.5 Fémionok hatásának vizsgálata

Vizsgáljuk a különböző fémionok (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}) hatását a mutáns illetve vad típusú fehérjék fluoreszcenciájára. A minták tartalmazták a mutáns fehérjét mikromólos koncentrációkban ($5\text{--}10\text{ }\mu\text{M}$), valamint a különböző fémionokat $50\text{--}200\text{ }\mu\text{M}$ koncentrációkban 20 mM Na foszfát pufferben ($\text{pH } 7$). A méréseket Fluoro Star Optima típusú fluoriméterrel végeztük.

3. ERDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉS

3.1. Mutáns fehérjék expressziója

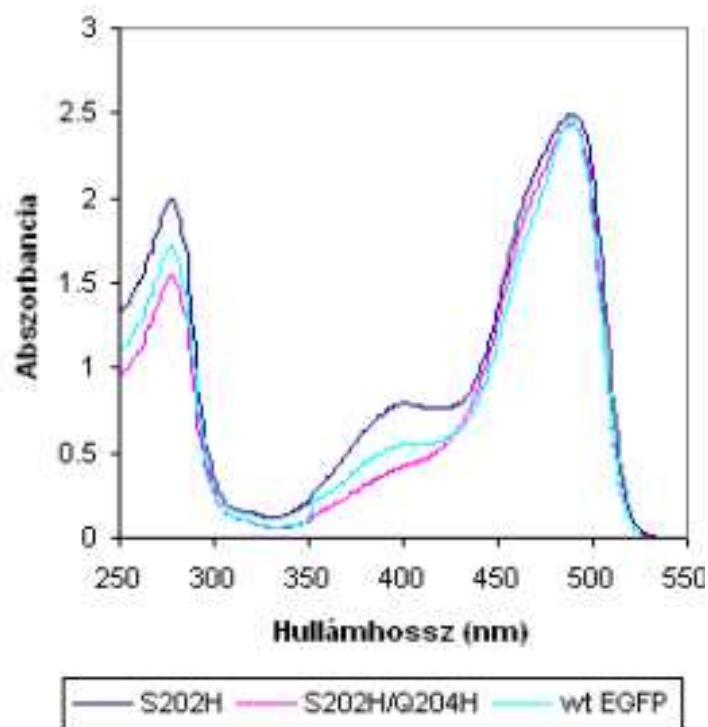
A zöld fluoreszcens fehérje termelődése expresszió után már rögtön ellenőrizhető. Ugyanis az általunk megtermeltetett fehérje a natív konformáció kialakítása után rövi idő elteltével érett állapotba kerül, és ezáltal már természetes fénnel gerjesztve is szemmel láthatóan fluoreszkál. Ennek köszönhetően már a termelő sejt-szuszenzió sárgás-zöldes árnyalatú lesz.



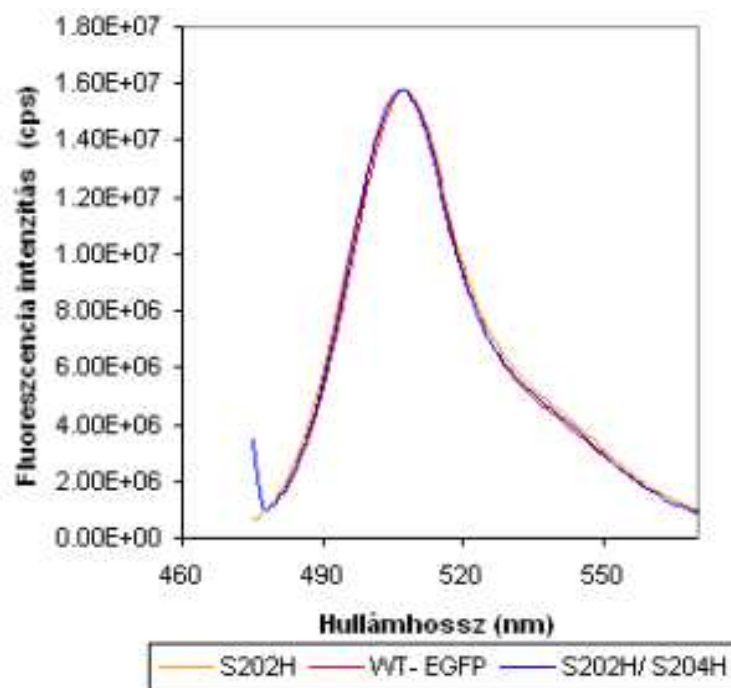
1. ábra
Mutáns fehérjék expressziója

3.2. Spektrális tulajdonságok vizsgálata

Felvettük a vad típusú illetve mutáns EGFP fehérjék abszorpciós és emissziós spektrumait. Az EGFP abszorpciós maximuma 485 nm-nél, míg emissziós maximuma 509 nm-nél található. A 7 pH-jú közegben a fehérjék abszorpciós illetve emissziós spektrumai közel azonosak, vagyis az elvégzett mutációknak nem volt hatása a spektrumokra.



2. ábra
Abszorpciós spektrumok



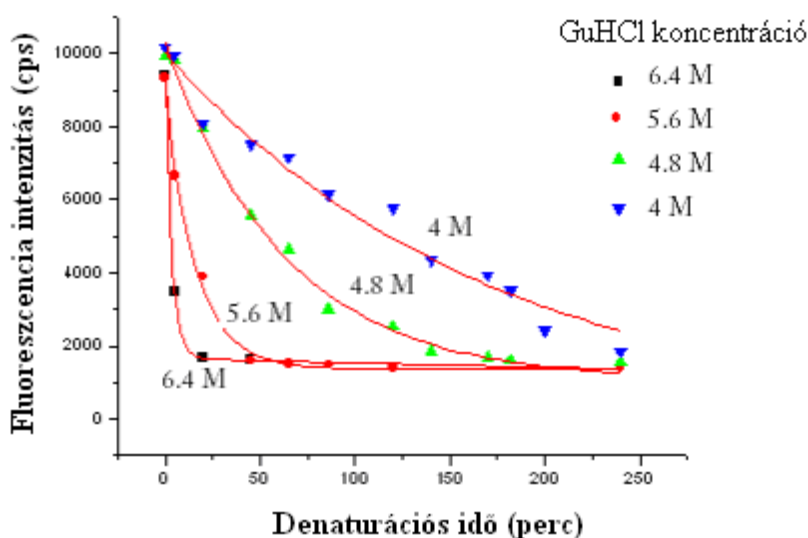
3. ábra
Emissziós spektrumok (Ex. 475 nm)

3.3. Mutáns fehérjék denaturációjának vizsgálata

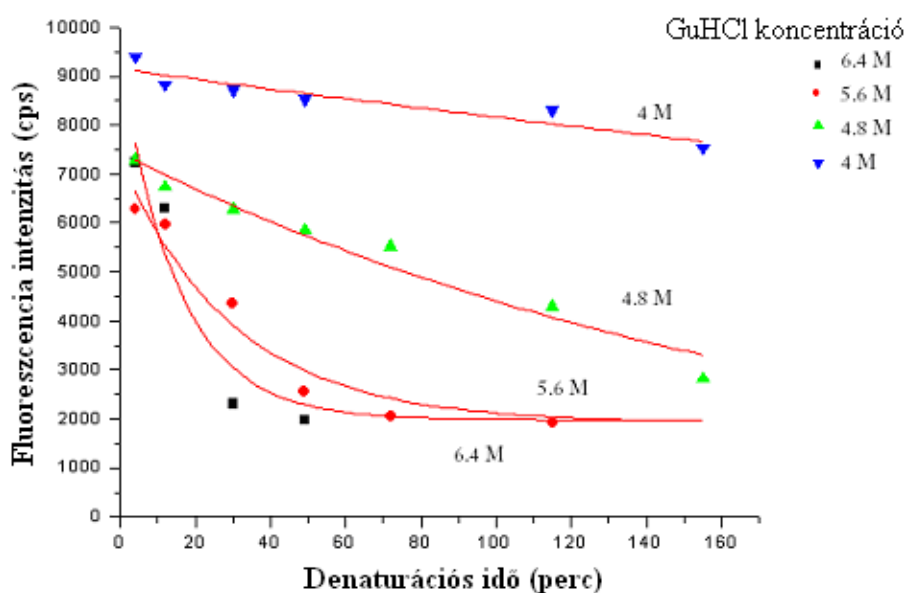
A GFP akkor fluoreszkál intenzíven, ha a kromofor csoport a fehérje belsejében található. Mivel a fehérje fluoreszcenciája szerkezetfüggő, ezért a fluoreszcencia csökkenés mérésével információt szerezhetünk a szerkezet széttekeredéséről, natív állapot elvesztéséről. Munkánk során fluoreszcencia spektroszkópia segítségével tanulmányoztuk a vad típusú ill. mutáns fehérjék denaturációját guanidine hidroklorid jelenlétében. A guanidin hidroklorid egy kaotropikus ágens, amely megszünteti a vízmolekulák rendezettségét a hidrofób részek körül, ezáltal előidézve a fehérje denaturációját.

Tanulmányoztuk a fehérjék denaturációjának időbeni lezajlását, mérve a fluoreszcencia intenzitás változását. Megfigyeltük, hogy a fehérjék fluoreszcencia intenzitása csökkent a denaturáció során. A denaturációs folyamat előrehaladásával a fehérje szerkezete destabilizálódik, a hordót alkotó beta lemezek eltávolodnak egymástól, ezáltal lecsökken a kromofor csoport védettsége. A fehérje kromofor csoportja hozzáférhetővé válik a kisebb molekulák számára. Az oldatban lévő vízmolekulák bejutnak a fehérje belsejébe, és protonálják a kromofor csoportot. A protonált kromofor nem fluoreszkál.

A fehérjék fluoreszcencia intenzitásának csökkenését a denaturáció során az alábbi ábrák szemléltetik.



4. ábra
S202H-EGFP mutáns denaturációja



5. ábra.
S202H/Q204H-EGFP mutáns denaturációja

A denaturációs folyamat a következő függvénnyel írható le: $I = I_0 \cdot (\exp(-kt))$, ahol I_0 a denaturáció előtti fluoreszcencia intenzitás, k - a denaturáció sebességi állandója és t - a guanidine hidroklorid hozzáadása után eltelt idő. A fenti egyenletből meghatároztuk a denaturációs folyamat sebességi állandóit, amelyeket az 1. táblázatban foglalunk össze.

Az eredmények alapján elmondható, hogy azonos körülmények mellett az S202H-EGFP mutáns denaturációja gyorsabb, mint az S202H/Q204H-EGFP mutánsé, amit a nagyobb denaturációs sebességi állandó igazol. Tehát a két hisztidint (S202H/Q204H) hordozó mutáns kevésbé érzékeny a denaturálószer jelenlétére, mint az egy hisztidint (S202H) hordozó mutáns.

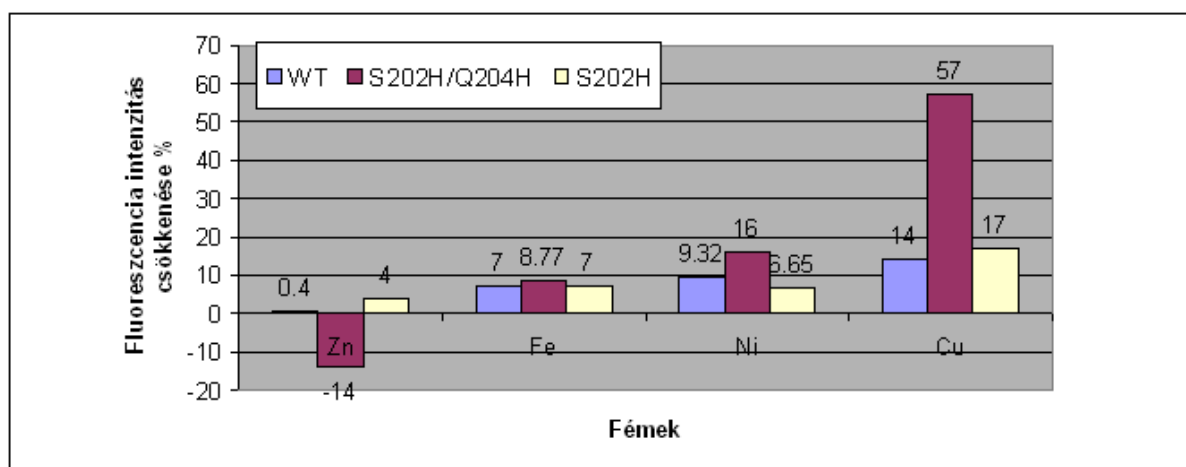
Denaturációs sebességi állandók

1. Táblázat

GuHCl koncentráció	S202H-EGFP mutáns fehérje	S202H/Q204H-EGFP mutáns fehérje
	<i>Denaturációs sebességi állandó, k (perc⁻¹)</i>	<i>Denaturációs sebességi állandó, k (perc⁻¹)</i>
6.4 M	0.244	0.0642
5.6 M	0.0553	0.0154
4.8 M	0.01736	0.005230
4 M	0.0021	0.001136

3.4. Fémionok hatásának vizsgálata

Vizsgáltuk a különböző fémionok hatását a vad típusú valamint a mutáns fehérjék fluoreszcenciájára. A szakirodalomból tudjuk, hogy bizonyos fémionok, ha elég közel kerülnek a fehérje kromofor csoportjához, akkor kioltják a fehérje fluoreszcenciáját [11]. Fluoreszcencia kioltásról beszélünk, amikor a fluorofór által kibocsátott fény intenzitása csökken olyan molekulák vagy ionok jelenlétében, melyek elektronszerkezete megfelelő ahhoz, hogy a fluorofórral kölcsönhatásba léphessenek [12]. A 6. ábra a cink, vas, nikkel valamint a réz ionok fluoreszcencia kioltó hatását szemlélteti.



6. ábra

A vad típusú (WT) illetve mutáns fehérjék érzékenysége a rézionokra

Amint azt a 6. ábrán is látható, a rézionok jelenlétében csökkent leginkább a fehérjék fluoreszcenciája. A vad típusú EGFP illetve az S202H/EGFP kevésbé érzékeny a fémek jelenlétére, mint az S202H/Q204H/EGFP mutáns. Az S202H/EGFP mutáns érzékenysége közel azonos a vad típusú EGFP érzé-

kenységével. Látható, hogy a cinkionok jelenlétében az S202H/Q204H/EGFP mutáns fluoreszcenciája 14%-al megnövekedett. Ez az eredmény kissé meglepő, de a szakirodalomban találtunk hasonló eredményeket [13]. Az S202H/Q204H/EGFP mutáns fokozott érzékenysége a fémionok iránt azzal magyarázható, hogy a fémionok, miután hozzákötődnek a mutáció során bevitt hisztidinekhez, ezáltal elég közel kerülnek a kromofor csoporthoz, és interakcióba lépnek vele. Kialakul egy komplex az adott fémion és a gerjesztett állapotban lévő kromofor között, majd a gerjesztett kromofor átadja az energiáját a fémionnak.

KÖVETKEZTETÉSEK

A kapott eredményeink azt igazolják, hogy a fehérje szerkezete és tulajdonságai szoros összefüggésben állnak. Ez a kapcsolat még szembetűnőbb a kromofor közelében lévő aminosavak kicserélése esetén. Az általunk elvégzett mutáció a kromofor közelében lévő aminosavakat érintette (távolság $<10\text{\AA}$), amelyeknek szerepe lehet a fehérje spektrális tulajdonságainak kifejeződésében. A standard körülmények (298K, pH 7) között felvett fehérje-spektrumok nem különböznek jelentősen, ami azt sugallja, hogy a mutációnak nem volt jelentős hatása a fehérje spektrális tulajdonságaira.

A fémek fluoreszcencia csökkentő hatása leginkább az S202H/Q204H/EGFP mutánsnál érvényesült. Tehát a mutáció (S202H/Q204H) hatására megnövekedett az EGFP érzékenysége a fémionok iránt. Azt feltételezzük, hogy az általunk bevitt két hisztidin potenciális fémkötő helyként viselkedik, ezáltal elősegíti a fémionok kromofor közelébe való jutását.

FELHASZNÁLT IRODALOM

- [1] R. Y. Tsien, The green fluorescent protein, Annual review of biochemistry, 1998, 67, 509-544
- [2] D. Prasher, V. Eckenrode, W. Ward, F. Prendergast, M. Cormier, Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein, Gene, 1992, 111/2, 229-233
- [3] F. Yang, L.G. Moss, G.N. Phillips, The molecular structure of green fluorescent protein, Nature biotechnology, 1996, 14, 1246-1251
- [4] S. G. Olenych, N. S. Claxton, G. K. Ottenberg, M. W. Davidson, The fluorescent protein color palette, The Florida State University, Tallahassee, Florida, 1-34
- [5] M. Ormo, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein, Science, 1996, 273, 1392-1395
- [6] B.P. Cormack, R. Valdivia, S. Falkow, FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP), Gene, 1996, 173, 33-38
- [7] A. Cubitt, R. Heim, S. Adams, A. Boyd, L. Gross, R. Y. Tsien, Understanding, improving and using green fluorescent proteins, Trends in biochemical sciences, 1995, 20, 448-455
- [8] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward, D. Prasher, Green fluorescent protein as a marker for gene expression, Science, 1994, 263 /5148, 802-805
- [9] M. Chalfie, S. R. Kain, Green fluorescent protein. Properties, applications, and protocols, Second edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2006
- [10] D. Chudakov, S. Lukyanov, K. Lukyanov, Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging, Trends Biotechnology, 2005, 23/12, 605-613
- [11] T. A. Richmond, T. T. Takahashi, Riti Shimkhada, Jennifer Bernsdorf, Engineered metal binding sites on green fluorescence protein, Biochemical and biophysical research communications, 2000, 268, 462-465
- [12] J. R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, Third Edition, USA, 2006, 9-15
- [13] D. P. Barondeau, C. J. Kassmann, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, Structural chemistry of a green fluorescent protein Zn biosensor, J. Am. Chem. Soc., 2002, 124 /14, 3522-3524