



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Szerves Kémia és Technológia Tanszék

TDK Dolgozat

**Enzimek kovalens rögzítésére alkalmas szilikagél alapú
hordozók fejlesztése biokatalitikus célokra**

Készítette:

Suba Szandra

Témavezető:

Dr. Poppe László

Egyetemi tanár

Konzulens:

Oláh Márk

PhD hallgató

Budapest

2015

Rövidítések jegyzéke

A TDK dolgozatban előforduló rövidítések

MAT540	Matspheres Series 540®
G-DGE	gliceril-diglicidiléter
BD-DGE	1,4-butándiol-diglicidiléter
HD-DGE	1,6-hexándiol-diglicidiléter
PE-DGE	polietilén-diglicidiléter
CD-DGE	ciklohexil-dimetanol-diglicidiléter
NP-DGE	neopentilglikol-diglicidiléter
N435	Novozym® 435
CV T2-150	Chiral Vision® T2-150 jelzésű hordozó
CaLB	<i>Candida antarctica</i> B lipáz
CaLA	<i>Candida antarctica</i> A lipáz
Triton-X100	4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilén glikol
MTBE	<i>terc</i> -butil-metil-éter

Tartalom

Rövidítések jegyzéke	2
1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. Enzimek	7
2.2. Lipázok	12
2.2.1. A <i>CaLB</i> enzim	12
2.3. Szilárd hordozók	13
2.3.1. Aktív szén	14
2.3.2. Polimer hordozók	14
2.3.3. Üveg hordozók	15
2.3.4. Szilikagél hordozók	15
2.4. Enzimrögzítési módok	16
2.4.1. Kovalens rögzítés	18
3. Eredmények és értékelésük	20
3.1. Kovalens rögzítésre alkalmas hordozók fejlesztése	20
3.2. <i>CaLB</i> enzim kovalens rögzítése	22
3.3. Fehérjék kovalens rögzülésének vizsgálata	23
3.4. A kovalens enzimkészítmények biokatalitikus aktivitásának vizsgálata	23
3.4.1. Szakaszos üzemű kinetikus rezolválás	24
3.4.2. Folytonos üzemű kinetikus rezolválás	26
3.4.3. Enzimkészítmények újrahasznosíthatóságának vizsgálata	29
4. Kísérleti rész	34
4.1. Felhasznált anyagok	34
4.2. Módszerek	34
4.3. MAT540 szilika hordozó módosítása diglicidiléterekkel	35
4.4. <i>CaLB</i> rögzítés módosított MAT540 szilikára	35
4.5. Enzimek deszorbeálhatóságának vizsgálata	36
4.6. Szakaszos üzemű kinetikus rezolválás	36
4.7. Folytonos üzemű kinetikus rezolválás	37
4.8. Enzimkészítmények visszaforgathatóságának vizsgálata	38
5. Összefoglalás	40

6. Köszönetnyilvánítás.....	42
7. Irodalomjegyzék	43

1. Bevezetés

Az enzimeknek, azaz az élő szervezet katalizátorainak jelentősége az elmúlt évtizedekben fokozódik az ipari technológiákban, egyre nagyobb szerepet kap az alkalmazott biokatalízis, vagyis biotechnológia tudományterületén belül a biokatalizátorok gyakorlati alkalmazása. A biokatalizátoroknak számos előnyös tulajdonságuk van, ezek közül talán legfontosabb specifitásuk, valamint enyhe reakciókörülmények mellett is képesek kifejteni katalitikus hatásukat, így környezetkímélőek, kevésbé kockázatosak és balesetveszélyes a reakciók vezetése.

Ahhoz azonban, hogy enzimeket széleskörűen alkalmazhassuk (pl. folyamatos eljárásokban, egymást követő reakcióciklusokban felhasználhassuk) valamilyen módon rögzítenünk (szilárd hordozón történő rögzítés) vagy stabilizálni kell őket, így nyerhetőek széles körben alkalmazható szilárd fázisú biokatalizátorok.

A rögzített enzimek gyakorlati alkalmazása népszerű az ipari termelőeljárásokban, az analitika, élelmiszeripar, valamint a gyógyászat területén. Felhasználják őket a például sajtgyártásban, a sörgyártásban és az etanolgyártásban, de növelhetik a folyamatok gazdaságosságát például a gyümölcslevek és illóolajok előállításánál, vagy javíthatják a termék minőségét például a kenyérsütésnél és a tej feldolgozásánál. A gyógyszeriparban jelentős szerephez jutott a fermentáció, melynek termékei közé tartoznak például az antibiotikumok, melyek közül többet már hatékonyan állítottak elő rögzített enzimmészítmények segítségével. A rögzített biokatalizátorokkal történő antibiotikum-fermentáció mellett jelentősek például a biotranszformációk, szteroidátalakítások száma is, illetve a vegyiparban (szintetikus aminosav-racématok rezolválására). Szakaszos analitikai eljárásokban a klinikai kémiában fontos vérsavó illetve glükóztartalom meghatározásoknál hatékonyan alkalmazhatóak a megfelelő enzimek rögzített formái. A folyamatos rendszerekben is, főként a folyadékáramba való mintainjektálási módszereknél (FIA) alkalmaznak szilárd fázisú enzimeket, de igen jelentősek az enzimelektrodok kialakításánál is. Az orvosi gyakorlatban a rögzített enzim lehet gyógyszer, vagy terápiás készülék funkcionális eleme (aszparagináz klinikai terápia), a szabad enzimre nagy koncentrációban van szükség, de fiziológiás körülmények között kevésbé aktív, toxikus hatásokat fejt ki több szervre és immunválaszt válthat ki. Az enzim alkalmazását tumorok kezelésénél, mellékhatások jelentkezése nélkül csak a rögzített forma használata teszi lehetővé. De állítottak már elő félig mesterséges szervet

vörösvérsejt kiürített membránjába zárt enzimmal, valamint alkalmaztak folyamatos üzemű reaktorban rögzített ureázt karbamid hidrolizálására is.^{1,2}

TDK dolgozatomban kovalens enzimirögzítési módszerrel foglalkoztam. A munka során célunk volt szférikus szilikagélek felületének módosítása különböző biszepoxidokkal, hogy azok kovalens enzimirögzítésre legyenek alkalmasak. A hordozókhöz *Candida antarctica* B lipázt immobilizáltam, majd modell-reakciónak a racém 1-feniletanol kinetikus rezolválását választottuk. Kísérleteket végeztünk szakaszos és folytonos üzemű laborreaktorokban is, illetve vizsgálni akartuk az enzimmészítmények stabilitását visszaforgatásos kísérletekben.

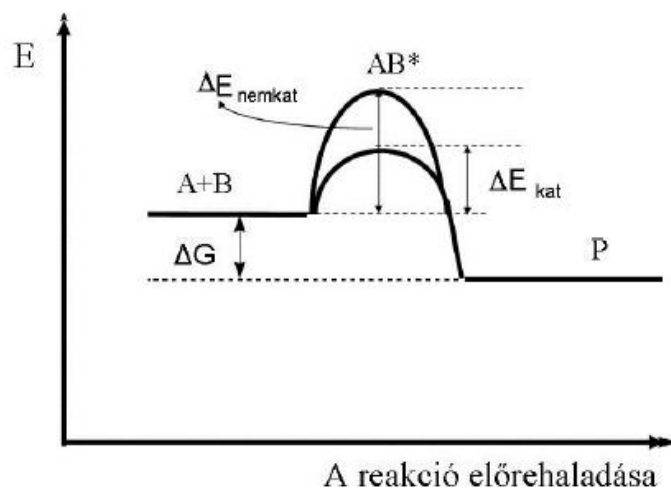
2. Irodalmi áttekintés

2.1. Enzimek

Az enzimek a molekulák egy különleges csoportját alkotják, amelyeknek feladata a biokémiai folyamatok elősegítése. A sejtekben spontán végbemenő nagyszámú, termodinamikailag lehetséges (azaz szabadenergia-csökkenéssel járó) reakciók az élő szervezetben uralkodó enyhe körülmények miatt (30°C körüli hőmérséklet, 1 bar körüli nyomás, semleges körüli pH) igen lassan játszódna le. Ezen folyamatok végbemenetelét támogatják, gyorsítják az enzimek a katalízis mechanizmusával. A katalizátorok olyan vegyületek, amelyek az aktiválási energia csökkentésével, azaz egy energetikailag kedvezőbb út megnyitásával, az egyensúlyi helyzet befolyásolása nélkül növelik meg a reakciók sebességét (1. ábra). Tehát a katalizátorok nem befolyásolják a

reakciók irányát, csak elősegítik, hogy a kémiai reakció egyensúlya gyorsabban beálljon, s bár reagálnak a reakcióban résztvevő anyagokkal, a folyamat végén az eredeti, kiindulási állapotukat veszik fel. Sokféle anyag lehet katalizátor: szerves és szervetlen vegyületek, sőt elemek is. A katalizátorok már az élet kialakulásában is

fontos szerepet játszhattak, például az óceánok vízében megtalálható vas, az egyéb fémek és a foszfát is katalizátorként viselkedhetett az UV sugárzás vagy az óceáni forró vizes kúrtók hatására, így segítve bizonyos anyagcsere utak létrejövetelét.³ Az enzimek olyan katalizátorok, melyek magas specifitással és hatékonysággal segítik nagyszámú reakció lejátszódását, így számos területen alkalmazzák őket, beleértve például az ipari ágazatokat és az orvostudományt.⁴ Az enzimes katalízis mechanizmusának legfontosabb tulajdonsága tehát, hogy csökkenti a reakciók lejátszódásához szükséges aktiválási



1. Ábra: Az aktiválási energia csökkentése katalizátorral⁶

energiát, így előidézve a reakciósebesség növelését. Az enzimes katalízis sebessége akár millió-milliárdszorta gyorsabb lehet egy szerves katalizátor által okozottnál.

Az enzimek döntő többsége fehérje szerkezetű, ezek egy speciális csoportját képezik. Léteznek azonban tisztán RNS (ribonukleinsav), ezek a ribozimek, illetve fehérje kapcsolt RNS enzimek, vagyis riboszómák is. Tehát az élő szervezet felépítésében, működésében szerepet játszó fehérjéknek egy fontos osztályát az enzimek képviselik, viszont az élő anyagban lejátszódó reakciókat nem csak fehérje alapú enzimek katalizálják. Katalitikus hatásukkal a biokémiai történésekben részt vesznek a már említett ribozimek, a tRNS-ek (transzfer ribonukleinsav), az ATP (adenozin-trifoszfát), a NAD (nikotinamid-adenin-dinukleotid). Az élő szervezetben sok RNS-katalizátor ma is fontos szerepet játszik a folyamatok végbemenetelésében, bizonyítva azt a feltételezést, hogy az evolúció során előbb létezett a nukleinsav alapú reakciókatalízis, mint a fehérjéhez kötött. Ez az "RNS-világ" azonban kevésbé hatékony, hiszen jóval kisebb sebességnövelést eredményeznek az RNS-katalizátorok, mint a fehérjék. Ennek köszönhetően az élő szervezet katalitikus rendszere átalakult fehérjealapúvá, ma már döntő többségben fehérje alapú enzimek segítik a biokémiai folyamatok lejátszódását.^{5,6} Dolgozatom témájához a fehérje alapú enzimek kapcsolódnak, így a továbbiakban ezeket tárgyalom.

Az enzimek biokatalizátornak tekinthetők több szempont alapján is:

- az élő szervezetben segítik az energiagát átugrását, melynek csökkenése olyan jelentős mértékű lehet, hogy a reakció sebessége akár több milliószorosára is nőhet az eredetinek;
- a szervezetre gyakorolt hatásuk miatt szabályozásuk rendkívül jelentős, a sejt metabolizmusának szempontjából kiemelt fontosságú;
- kizárólag termodinamikailag lehetséges reakciókat katalizálnak, mivel az aktivációs energiát csökkentik, így megnövelve a reakcióba lépő molekulák számát;
- mivel döntő többségük fehérje, reakcióra és/vagy szubsztrátra specifikusak;
- a reakció végbemenetele során nem változnak, lejátszódása után eredeti formában visszanyerhetőek.⁷

Amellett, hogy az enzimek segítenek abban, hogy a kémiai reakció egyensúlya gyorsabban beálljon, meghatározhatják a reakció irányultságát. Ha például a katalizált reakcióban van egy anyagunk (szubsztrát), amely az adott körülmények között képes több

eltérő anyaggá is átalakulni (termék), akkor az enzim azon reakció lejátszódását fogja támogatni, amely reakció szabadentalpia változása a legkedvezőbb. Ezt hívják az enzim specifitásának. A reakciók szabadentalpiájának változása meghatározó fontosságú. Egyensúlyi állapotnak nevezzük azt az állapotot, mikor nincs szabadentalpia változás, a reakció mind a két irányban ugyanolyan gyorsan játszódik le. Spontán módon egy reakció csak olyan irányban játszódik le, amely során a szabadentalpia csökken, azaz felszabadul energia ($\Delta G < 0$), fordított reakció csakis speciális körülmények között jöhet létre. Erélyes körülményeket (magas nyomás vagy hőmérséklet) elő szervezetben nem lehetséges megteremteni, azonban az enzimek segítségével még egy ilyen fordított irányú reakció végbemenetele is lehetséges. Ugyanis független reakciókat kapcsolhatnak össze az enzimek, így az energetikailag nem preferált reakció hozzákapcsolódik egy energetikailag preferált reakcióhoz. Ha az így kapott kapcsoltság eredményeként a két reakció szabadentalpia változásának eredője negatív, akkor a reakció végbemehet. Ezt, az energetikai szempontból szintén fontos tulajdonságot, a kapcsoltság megteremtésének nevezzük.^{7,8}

Az enzimekre általánosságban jellemző, hogy enyhe körülmények között nagyfokú aktivitásra képesek, vagyis magas átalakítási arányt produkálnak. Továbbá az enzimek egyik legfontosabb tulajdonsága a nagyfokú specifitás, ami megnyilvánulhat szubsztrát-, reakció-, régió- és sztereo-specifitásban melyek meghatározzák, hogy milyen reakciókban vehetnek részt. Azt pedig, hogy az adott reakció milyen körülmények között mehet végbe, az enzimek szerkezete, azaz a fehérje váz határozza meg. Mivel az enzimek túlnyomó többsége fehérje, emiatt működésük erősen függ a pH-tól, a hőmérséklettől, az ionkoncentrációtól. Az evolúciós folyamatoknak köszönhetően egy adott enzimre jellemző hőmérsékleti- és pH-optimum arra a közegre jellemző, ahol a feladatát el kell látnia. Ennek köszönhetően a különböző enzimek tulajdonságaikban szélsőségesen eltérhetnek, ismerünk erősen savas és erősen lúgos közegben, alacsony illetve magas hőmérsékleten működőket is.

A mai napig nem ismert pontosan, hogy hogyan működnek az enzimek. Viszont számos enzim térszerkezete ismert, mely alapján más enzimekre kiterjeszhető átfogó működési sémákat ismerünk. Nagyszámú kísérleti eredmény alátámasztja, hogy létezik az úgynevezett aktivált komplex (enzim-szubsztrát komplex). Általánosan elfogadott az is, hogy az enzimeknek van egy (vagy több) szubsztrátkötő helye. Ezen a helyen az enzim képes specifikusan megköti az átalakítandó szubsztrátot, a nem-szubsztrát molekulák kötésének affinitása jóval kisebb. Az aktív helyen történik az átalakulás, azonban a

szubsztrátkötő hely és az aktív hely nem feltétlenül egyezik, lehet, hogy azonosak, lehet, hogy különböznek, ekkor lehetnek egymáshoz közel illetve egymástól távol is elhelyezkedhetnek. Ráadásul egy enzim molekulán a szubsztrátkötő helytől eltérő, egyéb molekulákat megkötő helyek is létezhetnek (például aktivátor-, inhibitor-, koszubsztrátkötő helyek). Fontos, hogy a megkötésben szerepet játszó kitüntetett régiókat kötőhelynek, az átalakításért felelős régiókat aktív helyeknek (aktív centrumnak) nevezzük. Ezen régiók az enzim molecula felületének csak egy relatíve kis részét foglalják el.^{5,6}

Az enzimes katalízis létrehozásának hátterében több különböző tényező áll. Általánosan jellemző az enzimekre, hogy:

- azáltal, hogy az enzimek megkötik a szubsztrátokat, megnövelik a katalitikus hely környezetében a lokális szubsztrát-koncentrációt;
- az enzim-szubsztrát komplex létrehozásában gyenge és erős kötőerők is közreműködhetnek, gyakran a parciális elektromos töltések vonzása (illetve más Van der Waals-erők) vagy hidrogénhidak tartják össze a komplexet, de előfordulhat ionos vagy akár kovalens kötés is;
- abban az orientációban tartják az atomokat, ahogy azt a reakció megkívánja;
- a szubsztrátkötési energia hozzájárul a közvetlen katalízishez.

A szubsztrát molekulák több különböző geometriájú és energiájú állapotban mennek keresztül, mire a legvégső, késztermék formába jutnak (a katalízis során az enzim átrendezi a szubsztrát molekulák elektroneloszlását, részleges pozitív és negatív részeket eredményezve). A legstabilabb átmeneti állapot felvételéhez szükséges szabadenergia-mennyiség az aktivációs energia, ez határozza meg a reakció sebességét. Az enzimek sokkal nagyobb affinitással bírnak az átmeneti állapotú szubsztrát, mint a stabil forma irányába (az enzim megfeszíti a megkötött szubsztrát molekulákat, ezzel az átmeneti állapot felé tolva). Ez a kötés csökkenti nagymértékben az aktivációs energiát, jelentősen gyorsítja a reakciót.^{6,7}

Mechanikusan vizsgálva az enzim működést a következő folyamathoz jutunk: az enzim megkötöi a szubsztrát molekulát, átalakítja azt termékké, majd a termék leválik az enzimről, amely így ismét alkalmas egy másik szubsztrát megkötésére. Több kötődési modell is magyarázza az enzim-szubsztrát kötődésnek a kialakulását. Az első ilyen elmélet a kulcs-zár elmélet volt, amely szerint a szubsztrát pont úgy illeszkedik az enzimbe, mint a kulcs a zárba, tehát a szubsztrátkötő hely felülete pontosan az inverze a

szubsztrát felületének. Ez az elmélet jól magyarázza az enzim szubsztrát-specifikusságát, kimondja, hogy a fehérjemolekulák aminosavláncai úgy hajtogatódnak, csavaródnak a térben hogy a reaktív aminosav-oldalláncok megfelelő csoportjai a szubsztrát megkötéséhez specifikusan alkalmas térbeli konformációt hozzanak létre. Egy modernebb elmélet szerint az enzim felülete csak a kapcsolódás során alakul a szubsztrát formájára, előtte nem volt a pontos inverze. Ezen átalakuláshoz az szükséges, hogy a szubsztrát megfelelően orientált helyzetben kellően megközelítse az enzim kötő-, illetve aktív helyét. Ezt a modellt indukált illeszkedés elméletének nevezzük. Egy harmadik elképzelés, a fluktuációs modell szerint az enzim konformációja állandóan változik, csak egy bizonyos térszerkezetben képes arra, hogy megkösse a szubsztrátot.^{5,6}

Ez enzimeket nem szerkezetük alapján osztályozzuk, hanem a hasonló reakciókat katalizáló enzimeket egyazon csoportba soroljuk, mely csoportosítás nemzetközileg elfogadott. Az „Enzyme Commission” (EC) létrehozott egy négy szintű besorolási rendszert, amelyben minden enzimnek van egy négy számjegyű azonosítója. Az első számjegy egy hatágú besorolás alapján adódik, tehát egytől hatig változhat, jelölve azt, hogy milyen reakció típust katalizál az adott enzim. A második és harmadik számjegy alcsoportokat jelöl, míg a negyedik definiálja, hogy pontosan melyik enzimről van szó. Az első számjegy által jelölt csoportok a következők:

1. Oxidoreduktázok, oxidációs-redukciós folyamatokat katalizálnak, melyek során elektronok vagy hidrogénatom kerül át az egyik molekuláról a másikra. Például: glukóz-oxidáz.
2. Transzferázok, egy meghatározott atomcsoportot visznek át egyik molekuláról egy másikra. Például: metil-transzferáz.
3. Hidrolázok, fehérjék peptid kötéseit, poliszacharidok glikozidkötéseit, zsírok, foszfátok észterkötéseit hasítják. Például: lipázok, proteázok, észterázok.
4. Liázok, a szubsztrátum egy adott csoportját hidrolitikusan eltávolítják. Például: aldoláz.
5. Izomerázok, különböző átrendeződéses reakciókat katalizálnak. Például: trióz-foszfát izomeráz.
6. Ligázok, két molekula összekapcsolódását katalizálják. Például: szintetázok, karboxilázok.

A csoportokon belül minden enzim specifikus, viszonylag szűk szubsztrát tartományban egy adott reakciót katalizál, gyakran csak egy adott szubsztrát átalakítására képes.^{7,9}

2.2. Lipázok

A lipázok (EC 3.1.1.3) olyan enzimek, amelyek a hidrolázok csoportjába tartoznak, tehát hidrolízisen keresztül kötéseket hasítanak, főleg triglicerideket és más karbon-észtereket bontanak vizes közegben. A lipázok minden élőlényben előfordulnak, tipikusan a zsírok, olajok lebontásában játszanak szerepet, észterkötéseket hasító enzimek, fontos szerepük van az élő szervezetben, elsősorban az emésztés során. A lipázok többek között segítik a zsírfelvételt, mivel a zsír csak vizes emulzió formájában képes felszívódni és a vérbe kerülni.

Biotechnológiai szempontból igen jelentősek a lipázok, régóta vizsgálják illetve használják ezeket a sokoldalúan hasznosítható enzimeket. A legszélesebb körben tanulmányozott lipázok extracelluláris enzimek, melyeket elsősorban penészgombák fermentációjával nyernek, de a táptalaj olajokkal vagy zsírokkal való kiegészítése után az élesztőgombák és baktériumok is kiválasztják fermentlevükbe a fermentáció során. Alkalmazzák őket a például a tejiparban, a takarmányozásban, vegyiparban és gyógyszeriparban, bioüzemanyag készítésénél (ezáltal szerepet kaphatnak az alternatív energia stratégiák fejlesztésében),¹⁰ de fontos szerepet töltenek be az enzimtechnológiában is, mind a hidrolízisen keresztüli kötéshasítással, mind a szintézises reakciókban. Felhasználják őket peszticid készítmények gyártásánál, aromák készítésénél, transzészterezésnél illetve aszimmetrikus szintéziseknél.^{11,12} Kutatás bizonyítja, hogy a lipázok képesek aktívan működni hidrofób szerves oldószerben is, ha az tartalmaz minimális mennyiségben vizet, illetve ha a kémiai egyensúly el van tolva az észter szintézis irányába.¹³ Ez az eredmény is elősegíti a biotranszformáció egyre nagyobb térnyerését a szintetikus kémiában, bizonyítja, hogy enzimes reakciók megvalósíthatók vizes és szerves oldószeres közegben egyaránt.

Az enzimtechnológia folyamatos fejlődésének hatására a biokatalízis szintetikus kémiai használata mára már jelentős, számos enzimet alkalmaznak laboratóriumi méretekben, és egyre több folyamatot dolgoznak ki az ipar számára. Új területeket hódítanak meg a lipáz enzimet alkalmazó eljárások, például a rögzített enzimkészítmények fejlesztése, alkalmazása.¹⁴⁻¹⁶

2.2.1. A *CaLB* enzim

Ipari mértékben és laboratóriumi felhasználás szempontjából is a *CaLB* a legnagyobb mértékben alkalmazott lipáz enzim. Ezt az enzimet a *Candida antarctica*, más néven a *Pseudozyma antarctica* nevű bazídiumos gomba termeli. A *Candida*

antarctica B lipáz azaz *CaLB* enzimen kívül még egy lipázt termel ez a gomba, mégpedig a *Candida antarctica* A lipázt, azaz *CaLA* enzimet. Az A-jelzésű enzim Ca-függő és hőstabil, míg a B-jelzésű nem Ca-függő és kevésbé hőstabil, valamint szelektivitásukban is különböznek.

A *CaLB* előnyös tulajdonságaihoz tartozik, hogy enyhe körülmények között (légköri nyomás, szobahőmérséklet) megvalósítható reakcióiban kivételes szelektivitással rendelkezik. Az optimális katalitikus pH-ja 7, de vizes közegben széles pH-skálán stabil marad (pH=3,5-9,5). Denaturálási hőmérséklete 50-60°C között van (alacsonyabb pH-nál nagyobb termostabilitást mutat), mely érték növelhető az enzim rögzítésével.^{17,18}

2.3. Szilárd hordozók

A biotechnológia fejlődése során egyre nagyobb szerepet kap a biomolekulák, mikroorganizmusok rögzítési technikáinak fejlesztése.¹ Az 1950-es évektől napjainkig számos kutatás zajlik azzal a céllal, hogy minél magasabb hatékonyságú rögzített enzimmészítményt állítsanak elő. Mint minden kutatási területen, a rögzített enzimmészítmények fejlesztésénél is fontos szempontok többek között a gazdaságosság követelményei, az újrafelhasználhatóság illetve visszaforgathatóság, a stabilitás.¹⁹ A rögzített enzimmészítményeknek tehát több elvárással szemben kell megfelelniük, fontos, hogy a változtatható paraméterek kutatásánál, fejlesztésénél az optimális viselkedéshez egyre közelebb jussanak.

Az enzimek és sejtek rögzítéséhez előnyös fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkező hordozókra van szükség. A rögzített enzimmészítmények előállításakor az első felmerülő kérdés, hogy milyen hordozót alkalmazzanak a kísérlet során, ahol az előnyös fizikai és kémiai tulajdonságokon kívül fontos szempont, hogy az adott hordozó folyamatosan, nagy mennyiségben és minél olcsóbban hozzáférhető legyen az ipar számára. Felületüket tekintve a hordozók meghatározó tulajdonsága lehet a részecskék alakja (lehetőleg gömb), felületének jellege illetve a fajlagos felület nagysága. Mechanikai szempontból a minél nagyobb nyomás- és kopásállóság a kedvező. Eredetüket tekintve lehetnek természetes illetve mesterséges hordozók, szerves illetve szervetlen vegyületek. Szervetlen hordozók például az aktív-szén, a homok, a nem porózus és porózus üveg, magnetitszemcsék, szilikagél, stb. A természetes eredetű, szerves hordozók kiemelkedő jelentőségű csoportját alkotják a poliszacharidok

(keményítő, cellulóz-származékok, dextrans, agaróz), melyeket általában szintetikusán módosítanak.¹

2.3.1. Aktív szén

Az aktív szén jól alkalmazható enzimrögzítésekhez, köszönhetően a nagy pórusméreteinek, az erős adszorpciós kapacitásának, és jó mechanikai tulajdonságainak. Az aktív szén előnyös tulajdonságai közé tartozik, hogy nem mérgező, inert rendszer. Mezopórusos szenet használnak különféle aktiválási folyamatoknál, aktiváló szerek készítésénél. S noha jó hatékonysággal rögzítenek aktív szénre enzimet, az előállításának magas költsége az ipari folyamatokban való alkalmazásakor hátrányt jelent, viszont a biomasszából előállított aktív szén megoldást jelenthet erre a problémára.²⁰

Kimutatták, hogy a felületén módosított aktív szén (SMAC) felhasználásával készült enzimműanyagok stabilak és hatékonyan alkalmazhatóak. Kémiai módosításokkal elérték, hogy az aktív szén felületén található reaktív csoportok dúsuljanak, így többpontos kovalens rögzítéssel kapcsolódhatott a hordozó az enzimhez, növelve a készítmény stabilitását. Bár a készítmény stabil, a gazdaságosság szempontjából még fejleszthető, mivel a rendelkezésre álló enzimmennyiségből egyelőre keveset képes megkötni (3,25%).²¹ Az aktív szén egy sokoldalú hordozó, mely tulajdonságai alapján számos területen alkalmazható például CO₂ megkötésére,²² szennyvíztisztításra a környezetvédelemben²³, enzimrögzítésre az enzimtechnológiában,²⁰ hordozóként használva rezolvációs technológiában.²⁴

2.3.2. Polimer hordozók

A polimer hordozók esetében talán a legfontosabb tulajdonságok a vázat alkotó anyag kémiai szerkezete illetve a keresztkötések száma. Az egyik legkorábban alkalmazott szilárd hordozó, a polisztirol mind a mai napig a gyakran alkalmazott polimer hordozók közé esik, habár a keresztkötések száma igen alacsony ebben a hordozóban (1-2%).^{25,26} A polimer hordozók egy csoportosítása is a keresztkötések számával áll kapcsolatban, megkülönböztetünk makropórusos (sok keresztkötést tartalmazó, >5%) és mikropórusos (keves keresztkötést tartalmazó, 1-2%) gyantákat.^{27,28}

A polisztirolon kívül gyakran alkalmazott polimer hordozó a poliakrilamid. Felhasználásával többek között állítottak elő olyan hordozót, melynek glutáraldehides kezelésével enzimrögzítéshez szükséges aldehidcsoportokat tartalmazó készítményt kaptak (a glutáraldehid valószínűleg az akrilamid szabad amidcsoportjával reagált).^{1,29}

Egy értékes műanyag, a poli(vinil-alkohol), azaz a PVA is alkalmazható szilárd hordozóként. A PVA mint hidrofil polimer, gélképzésre hajlamos. Különböző reaktív hordozókat állítottak elő PVA-ból enzimek rögzítéséhez, például polietilén tartalmú papíripari pépet PVA-val kezelve kaptak előnyös tulajdonságú, kémiaiilag aktív hordozókat. Az alkalmazott aktiválási eljárások között szerepelt a glutárdialdehydes kezelés.^{1,30}

2.3.3. Üveg hordozók

Porózus szerkezet alakul ki a megfelelően megválasztott összetételű boroszilikát üvegben hevítés hatására. Az rendszerben két összekeveredett, folytonos fázis alakul ki a hő közlés következtében. Az egyik fázis szilikátdús és savas oldatokkal szemben ellenálló, a másik fázis bór-oxidban gazdag, és savakban oldódik. Ennek, a bórsavban gazdag fázisnak a kioldásával nyerhető egy nagyon nagy szilikáttartalmú porózus szerkezet. Kutatások bizonyítják, hogy a porózus szerkezetű üveg hordozóknak több hátránya is van, például a pórusokon belül gátolt a szubsztrát és a termék diffúziója, valamint a pórusok eltömődhetnek. Nem porózus üveggyöngyök alkalmasak enzimrögzítésre, felületükre felvitt enzim másodlagosan glutáraldehydes keresztkötésekkel fixálható.¹

2.3.4. Szilikagél hordozók

A szilícium a Földön a második, a világegyetemben a hatodik leggyakoribb elem, azonban elemi szilícium a természetben nem fordul elő, csak vegyületei gyakoriak, legfontosabb ásványai a kvarc (SiO_2) és a különböző szilikátok. Gyakorisága azzal magyarázható, hogy atommagja igen stabil (leggyakoribb izotópjában 14 neutron és 14 proton, azaz 28 nukleon található).

Már a XVIII. század végén kimutatták, hogy egyes gombákban SiO_2 található, sokáig az volt az általános vélemény, hogy a szilíciumvegyületeknek semmiféle élettani jelentőségük nincs. Az azóta eltelt években viszont kimutatták, hogy a szilíciumvegyületek nem csak hogy megtalálhatóak a növényi és állati szervezetekben is, de a szilícium az esszenciális mikroelemek közé sorolható.³¹ A szilícium a természetben különféle szilícium(IV)-oxid módosulatok, továbbá agyagásványok, azbesztek, csillámok és szilikátok formájában fordul elő. A szilikagél a szilícium(IV)-oxid hidratált formája. Jó adszorpciós képessége miatt alkalmas vivőanyag.³² A szilikagél hordozók felületét gyakran módosítják különböző szénláncokkal, hiszen az adszorpció többnyire hidrofób

kölcsönhatások révén jön létre a felület és az enzim között.³³ A felületükön módosított szilikagél hordozók bizonyítottan alkalmasak enzimek rögzítésére adszorpciós kötésen keresztül,³⁴ illetve kovalens kötésen keresztül is.³⁵

2.4. Enzimirögzítési módok

A biokatalizátorok kiemelt szerepe miatt fontos, hogy a natív állapotban gyakran nem kielégítő eredményeket produkáló enzimek ismételt felhasználása, folyamatos eljárásokban való alkalmazhatósága megvalósítható legyen. Ennek érdekében rögzíteni, más néven immobilizálni célszerű őket szilárd fázisú hordozók felületére, így könnyen megvalósítható velük heterogén katalízis. A rögzített enzimek számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek az oldott enzimekhez képest, nem szennyeznek a folyamat során keletkező terméket, hiszen elválasztásuk általában egyszerű (szűréssel, centrifugálással megvalósítható), elkülönítésük után újra felhasználhatóak, tehát fajlagos költségük kisebb. Folyamatos üzemben is alkalmazhatóak, melynek eredményeként a folyamatok jobban kontrollálhatóak, a hozam tekintetében is javulás érhető el. Általánosan jellemző, hogy a rögzített állapotban lévő enzim veszít az aktivitásából, de ez eredményezheti az enzim aktív konformációjának rögzülését, ami a stabilitás növekedéséhez vezethet. Így a rögzített enzimek általában könnyen eltarthatóak, szállíthatóak és újra felhasználhatóak, valamint kevésbé támadhatóak a különböző mikroorganizmusok által.^{36,37}

Az immobilizált enzimeknek tehát lényegében két követelménynek kell megfelelniük, egyrészt a nem-katalitikus tulajdonságokon alapuló követelmények a könnyű izolálhatóság, a megfelelő stabilitás, az újrafelhasználhatóság, míg a katalitikus tulajdonságokkal szemben támasztott követelmények tekintetében a megfelelő aktivitás, produktivitás és hozam elérését jelentik. Ezen tulajdonságok persze folyamatfüggők, a rögzítés alapanyagát, módját és körülményeit az adott reakció, a szubsztrát, a termék, a reakcióközeg határozzák meg, amely tényezőket figyelembe véve kell keresni enzimirögzítésnél a változtatható paraméterek optimumát.^{1,19,38}

A biokatalizátorok és a hordozó anyagok közötti kölcsönhatások, a kötés típusa és erőssége alapján sokféle lehetőség ismert a rögzített enzimek előállítására. Az enzimek rögzítése a hordozókhöz történhet fizikai illetve kémiai módszerekkel. A fizikai módszerek között az enzim bezárásának, beágyazásának technikai elterjedtebbek. Az egyik legegyszerűbb módja az enzim rögzítésének, ha azt féligáteresztő hártály közé zárják. A hártály a szubsztrát- és a termékmolekulák számára átjárható. Előnye, hogy

maga az enzim molekula attól függetlenül, hogy nem szabadulhat, nem, vagy kismértékű adszorpciós kölcsönhatással kötődik a hártárhoz.

Az enzimek beágyazhatóak természetes vagy mesterséges eredetű térhálós, vízben oldhatatlan polimerek belső terébe. Ha a polimer megfelelő pórusméretű, az enzim molekulák nem tudnak kijutni a mátrixból, ezzel szemben a szubsztrátok és termékek áthatolnak a gél szerkezeten.

A bezáráshoz használt gélrendszerek mechanikai tulajdonságai sokszor nem kielégítőek, ennek kiküszöbölésére alkalmazhatóak a kapszulák, mikrokapszulák. A kapszulák gömbhéj formájú féligáteresztő, vékony és erős hártából, membránból, és az azon belül elhelyezkedő, folyékony magból állnak. A kapszulát körülvevő hártá a méretük szerint korlátozza a nagy enzim molekulák mozgását, illetve engedi a kis szubsztrát- és termék molekulák áramlását.

Liposzómaképzésnél az enzim vizes oldatát lágy, deformálható és közel cseppfolyós lipid kettős membránba zárják be.¹

Egy enzim és egy oldhatatlan hordozó közötti kötődés megteremtésének legrégebbi fajtája az adszorpciós kölcsönhatás. A módszer előnye, hogy nagyon egyszerű és nem igényel erőteljes kémiai behatásokat. Az enzim molekulák a hordozó felületén nagyon gyenge Van der Waals-erőkkel, esetleg hidrogénhidakkal rögzülnek. Az egységnyi mennyiségű hordozóra felvihető sejttömeg növelése érdekében célszerű a porózus hordozók alkalmazása, melyek rendelkeznek belső „hasznos” felülettel is, melyen megtapadhatnak az enzimek.³⁹ A kölcsönhatás megteremtésének érdekében az enzim vizes oldatát hozzák a hordozóval érintkezésbe, ez a művelet négyféle képen végrehajtható:

- statikus eljárás,
- elektrodepozíció,
- adszorpció a reaktorban,
- adszorpció keverés és rázatás segítségével.

Laboratóriumban leggyakrabban az utolsó megoldást alkalmazzák. Az enzim oldatához hozzáadják a hordozót és ezt a szuszpenziót a szorpciós egyensúly beálltáig kevertetik vagy ráztatják. Az adszorpciós módszer hátránya, hogy gyenge kötőerők tartják össze az enzimkészítményeket, használatuknál a reakció körülmények megváltozása (például szubsztrát- és ionkoncentráció változások, hőmérséklet emelkedés) deszorpcióhoz vezethet. Szükség esetén (például erős gázfejlődés, nagy szubsztrátkoncentráció) az

adszorbeáltatott enzimek másodlagosan bifunkciós reagensekkel, például glutáraldehiddel rögzíthetők.¹

A kémiai rögzítések közül a legjelentősebb a kovalens rögzítés, de más módon is létrehozható erős kölcsönhatás az enzim és hordozó között.

Ionos kötés kialakításával erősebb kölcsönhatás hozható létre, mint az adszorpció esetében, de gyengébb a kovalens rögzítésnél. Ionos, azaz heteropoláros kölcsönhatás az enzim és a hordozó ellentétes töltésű csoportjai közötti, elektrosztatikus vonzás révén jön létre. A módszer jelentős előnye a hordozó regenerálhatósága, a kovalens rögzítéssel szemben hátránya viszont a más ionok által fellépő zavaró hatás lehet. Alkalmazásakor különös figyelmet kell fordítani a megfelelő pH és ionerősség biztosítására a reakcióelegyben, különben a kötés felbomolhat az enzim és a hordozó között.⁴⁰ Alkalmazható kémiai beépítés polimerek szerkezetébe vagy fémkelátkomplexek kialakítása is.¹

2.4.1. Kovalens rögzítés

A kovalens kötésekben keresztüli rögzítés esetében a biokatalizátor és a hordozó között megosztott elektrópár képez kapcsolatot, így erős kötés alakítható ki az enzim és a hordozó bizonyos funkciós csoportjai között. Előnye, hogy nagyon széles szubsztrát-koncentráció tartományban alkalmazható, kevésbé érzékeny a környezet változásaira. Kémiai értelemben az eredeti enzim katalitikus aktivitását megtartó, új polimer vegyület keletkezik. Úgy kell alakítani a rögzítést, hogy az enzimnek a katalitikus-aktivitás szempontjából közömbös, a stabilitást nem befolyásoló aminosav oldalláncai vegyenek részt a kötésekben. A kovalens rögzítés kialakításának legáltalánosabb módszerei:

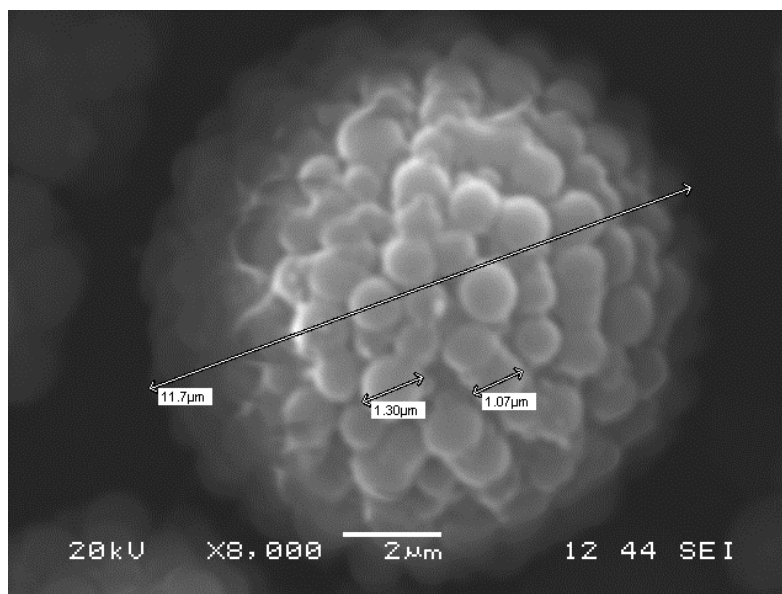
- diazotálás,
- amidkötés képzése,
- alkilezés és arilezés,
- Schiff-bázis képzése,
- Ugi-reakció,
- aminidálási reakciók,
- fémmerkaptid-képzés Hg^{2+} ionnal,
- γ -besugárzás által indukált kapcsolás.

Az adszorpció és ionos rögzítésnél általában érélyesebb körülmények szükségesek a kovalens kötésekben keresztüli rögzítéshez. A kémiai módosítás

következtében előfordulhat, hogy megváltozik az enzim konformációja, az aktív centrum részlegesen károsodhat. Ez csökkenthető, ha a hordozó funkciós csoportjait aktiválják, és nem az enzim aminosav-oldalláncait. Csak jól ellenőrzött körülmények között lehet nagy aktivitású rögzített enzimkészítményhez jutni kovalens rögzítés esetében.^{1,41}

3. Eredmények és értékelésük

Munkám során célom volt, hogy biszepoxidokkal módosított szférikus szilikagél alapú hordozók felületét úgy módosítsam, hogy az enzimek kovalens immobilizálására legyen alkalmas. Egy kanadai partner cégtől, a Materium Innovationstól kaptunk hordozót – a Matsperes Series 540® szférikus szilikagélt (2. ábra) – kísérleteinkhez enzimrögzítés céljából. Kísérleteinkben *Candida antarctica* B lipázt kovalensen rögzítettünk és az így előállított enzimkészítmény biokatalitikus aktivitását a racém 1-feniletanol kinetikus rezolválásában vizsgáltuk. Az aktivitás (konverzió) és a szelektivitás (enenatiomer-tisztaság) értékek és az előállítási paraméter közti összefüggést vizsgálva, a technológiát fejlesztése volt a cél, a hatékonyság növelése érdekében a változtatható paraméterek optimumának keresésével. A különböző biszepoxidokkal végzett kísérletek során a kovalens rögzítésre széles körben alkalmazott, erősen mérgező és nehezen kezelhető glutáraldehid produktív alternatíváit is kerestük. A saját termékeinket összehasonlítottuk párhuzamos kísérletekben kereskedelmi forgalomban kapható kovalens enzimkészítményekkel is.

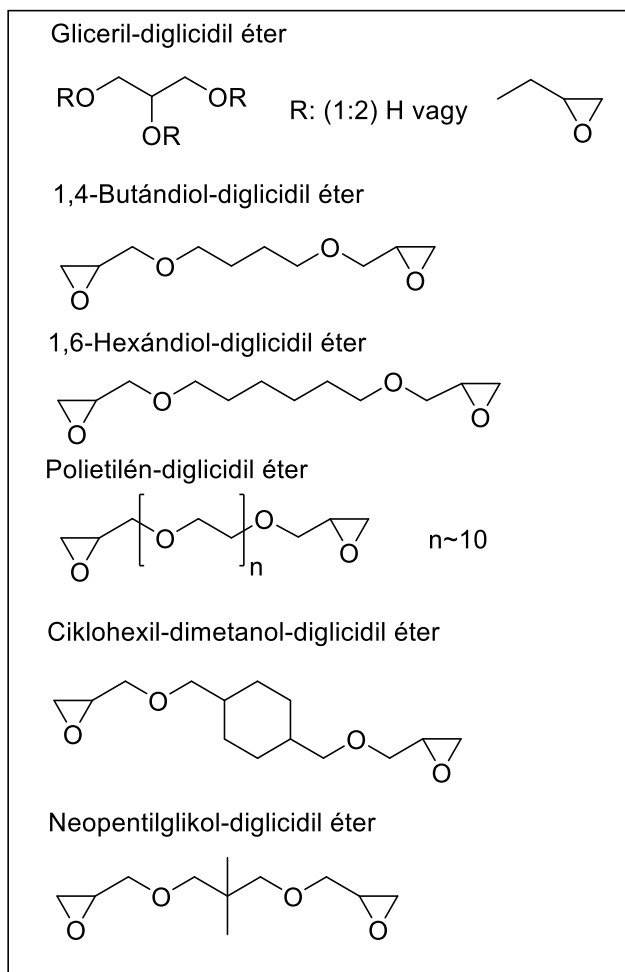


2. Ábra: Matspheres 540® szilikagél elektronmikroszkópos képe

3.1. Kovalens rögzítésre alkalmas hordozók fejlesztése

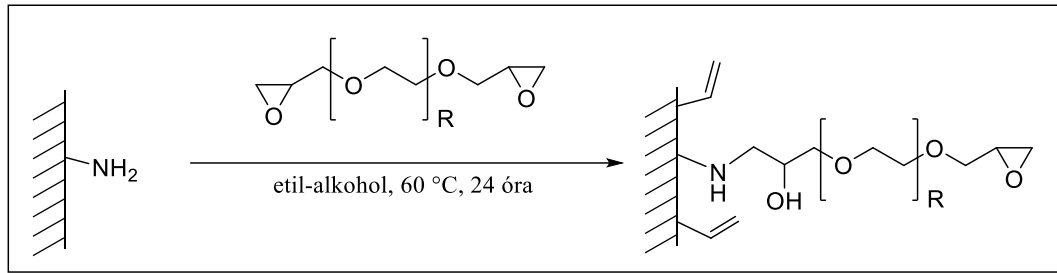
A kutatócsoport korábbi eredményei alapján egyértelművé vált, hogy a felületmódosításnak meghatározó szerepe van mind a kovalens, mind az adszorpciós enzimrögzítés esetében. A szilikagélek felületét hat különböző biszepoxid (G-DGE,

BD-DGE, HD-DGE, PE-DGE, CD-DGE, NP-DGE) felhasználásával (3. ábra) módosítottam, valamint referenciaként glutáraldehides módosítást is elvégeztem.



3. ábra: A módosításhoz felhasznált biszepoxidok szerkezete

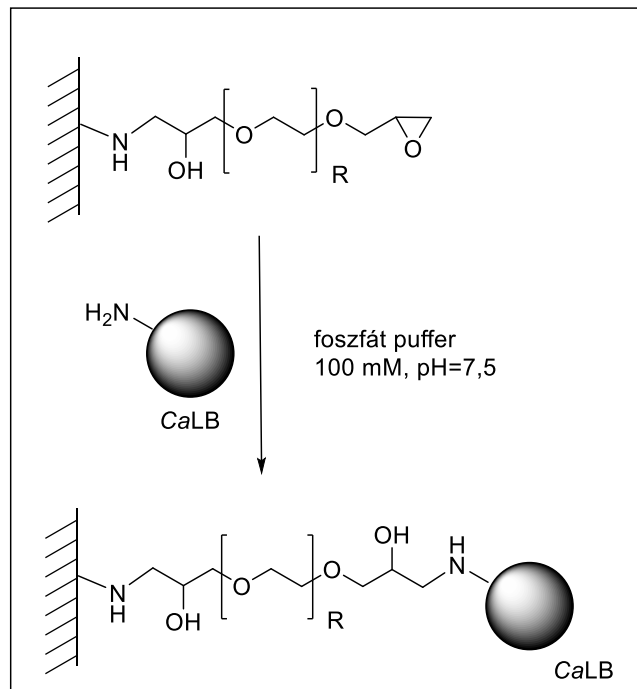
A kísérletek során biszepoxidokból etanolos törzsoldatot készítettem, majd minden törzsoldatból hozzápipettáztam a megfelelő mennyiséget a pontosan kimért szilikákhoz. A szuszpenziókat 24 órán át 60°C -on rázattam, ami alatt megtörtént a biszepoxidok hordozóhoz való kapcsolása kovalens kötéssel (4. ábra). A rázatás idejének letelte után a mintákat üvegszűrőn szűrtem (G4), majd Patosolvval és hexánnal újra szuszpendáltam és szűrtem, a mintákat levegőn szárítottam. A módosítás elvégzésével olyan reaktív csoportokat kaptam, melyek szabad epoxi-funkcióikon keresztül képesek további kovalens kötések kialakítására, nukleofilekkel támadhatók.



4. Ábra: A hordozók módosítása biszepoxidokkal

3.2. *CaLB* enzim kovalens rögzítése

Következő lépés a rögzített enzimmészítmények kialakítása volt, ezt a száraz, módosított szilikagél hordozók felületére történő *CaLB* kovalens rögzítésével valósítottam meg a következő módon (5. ábra). *CaLB*-ból és foszfát pufferből törzsoldatot készítettem, amelyből a megfelelő mennyiséget pipettáztam a biszepoxidokkal és a glutaraldehyddel módosított szilikagélekhez, mind a módosítatlan MAT540 szilikához, illetve a CV T2-150 polimer alapú hordozóhoz. A szuszpenziókat 24 órán át szobahőmérsékleten rázattam, majd a mintákat üvegszűrőn szűrtem, vízzel, 2-propanollal és végül hexánnal mostam, végül levegőn szárítottam. Így összesen nyolc kovalens készítményt (hat biszepoxidos és egy glutaraldehydes szilika, egy referencia kereskedelmi polimer alapú) és egy pusztán adszorpcióval rögzült enzimmészítményt kaptam (módosítatlan szilika).

5. Ábra: *CaLB* enzim kovalens rögzítése

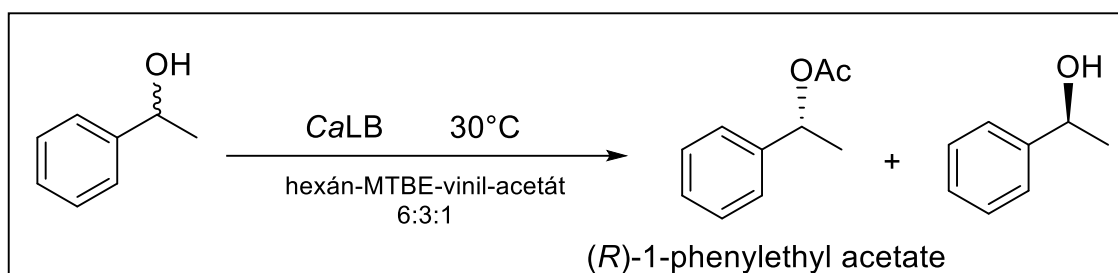
3.3. Fehérjék kovalens rögzülésének vizsgálata

Munkám során céлом volt, hogy a kovalens enzimrögzítés hatékonyságát vizsgáljam, ennek érdekében az előállított enzimkészítményeket egy utókezelésnek tettük ki, hogy megállapítsuk az enzimek mekkora része rögzült kovalensen és mekkora pusztán másodlagos kötőerőkkel (adszorpcióval).

A 3.2. pontban leírtak alapján elkészített enzimkészítményeket egy nem-ionos felületaktív anyaggal, a Triton-X 100 segítségével utókezeltük, ezzel vizsgálva a rögzített enzimek deszorbeálhatóságát. Ehhez Triton-X 100-ból és foszfát pufferből törzsoldatot készítettem, amelyből a megfelelő mennyiséget hozzá pipettáztam a kimért hordozókhoz, majd a szuszpenziókat 2 órán keresztül szobahőmérsékleten rázattam, ez után a mintákat centrifugáltam, majd a pufferes Triton-X 100 oldatot leöntöttem róluk. Desztillált vízben újra szuszpendáltam és ismét centrifugálással üleptettem a szilárd készítményeket, majd a vizes fázist leöntöttem. Ezt a mosást tízszer ismételtem meg, míg az összes Triton-X 100-at el nem távolítottam a rendszerből, vagyis habmentes nem lett a felülúszó. Végül 2-propanollal és hexánnal mostam a mintákat, majd levegőn szárítottam.

3.4. A kovalens enzimkészítmények biokatalitikus aktivitásának vizsgálata

A fejlesztett enzimkészítmények biokatalitikus aktivitásának vizsgálatát az 1-feniletanol kinetikus rezolválásában teszteltük és gázkromatográfiásan követtük királis állófázis alkalmazásával (6. ábra). A reakciók során vinil-acetétot használtunk acilezőszerként és hexán illetve *terc*-butil-metil-étert (MTBE) használtunk oldószerként.



6. ábra: A racém 1-feniletanol kinetikus rezolválása

A rögzített enzimkészítmények biokatalitikus aktivitásának jellemzésére alapvetően két fontos paraméter meghatározása szükséges. Ezek közül az egyik, hogy a kiindulási anyagot mekkora mértékben alakítja át a biokatalizátor (konverzió, *c*) és a másik kérdés, hogy az egyes enantiomerek között mennyire tud különbséget tenni, vagyis

az enantio-szelektivitása milyen az enzimnek, erre gyakran használják az enantiomer-felesleget (enantiomeric excess, *ee*). Ezek mellett használják még az aktivitás összehasonlítására az időegység alatt egységnyi tömegű katalizátor által átalakított molekulák számát, vagyis a produktivitás értékeket szakaszos ($r_{szakaszos}$) és folytonos üzemben ($r_{folytonos}$). A produktivitás értékek számítása a 7. ábrán látható képletekkel történt, ahol m_P a termék mennyisége [μmol], t az eltelt reakcióidő [perc], m_B a biokatalizátor tömege [gramm], P a termék koncentrációja [$\mu\text{mol} \times \text{mL}^{-1}$], v a reakcióelegy térfogatára [$\text{mL} \times \text{perc}^{-1}$].⁴²

$$r_{szakaszos} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{perc} \times \text{gramm}} \right) = \frac{m_P}{t * m_B}$$

$$r_{folytonos} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{perc} \times \text{gramm}} \right) = \frac{P}{v * m_B}$$

7. Ábra: Szakaszos és folytonos üzemű reakciók produktivitásának képletei

Az enantiomer-felesleg számítása a 8. ábrán látható képlettel történt, ahol X^* a főenantiómer móltörtje, X a másik enantiómer móltörtje, az értékeket többnyire százalékos formában adják meg.⁴³

$$e. e. (\%) = \frac{X^* - X}{X^* + X} * 100$$

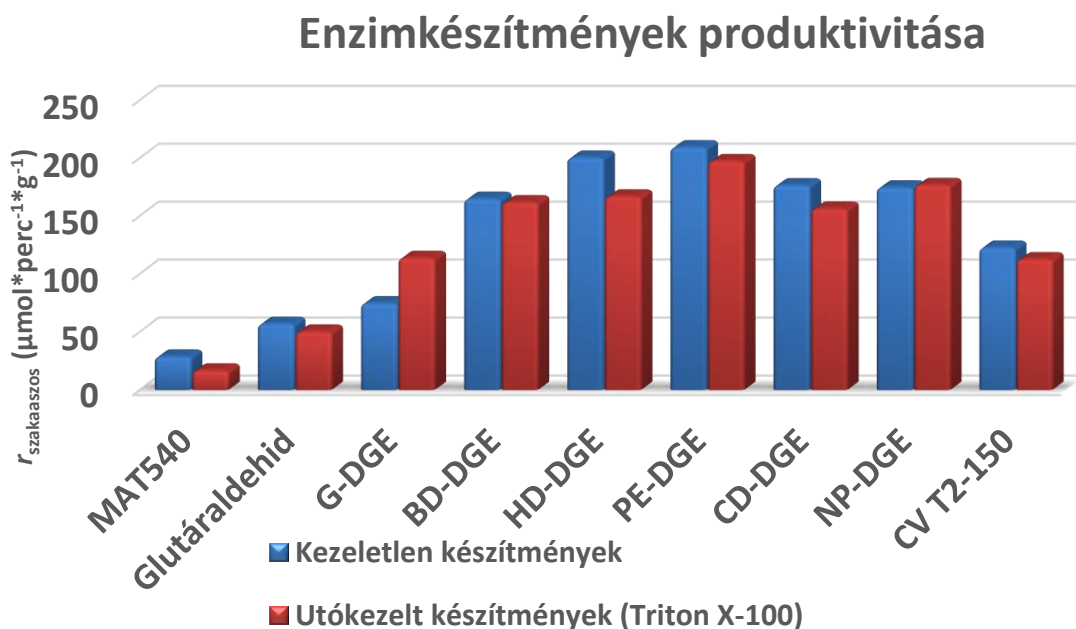
8. Ábra: Az enantiomer-felesleg képlete

3.4.1. Szakaszos üzemű kinetikus rezolválás

A 3.4. pontban leírtak szerint hajtottam végre a szakaszos üzemű kinetikus rezolválásokat, a reakciókat termosztálható rázógépen (Heidolph Vibramax 100) 4,0 mL-es teflon zárólemezes, menetes kupak segítségével légmentesen lezárt reakció edényben végeztem. Az elkészített törzsoldatból a megfelelő mennyiségeket pipettáztam minden enzimmérszítványekhez, majd a szuszpenziókat 30°C-on rázattam, a reakcióelegyekből különböző időközönként (0,5; 1; 2 óra) mintát vettem, majd etanollal hígítottam és királis állófázisú GC-vel vizsgáltam. Összesen 18 párhuzamos reakciót végeztem, ahol összesen 9 különböző rögzítés (a hat epoxidos, egy glutáraldehydes, egy módosítatlan és a referencia CV T2-150) szerepelt két párhuzamos kísérlet sorozatban (egy utókezelés nélküli és egy Triton-X 100-al utókezelt) vizsgáltam az aktivitásukat.

A készítmények produktivitás értékeit ($r_{szakaszos}$) az 1. diagramon ábrázoltam amin látszik, hogy az adszorpciós, felületén módosítatlan hordozó minden kovalens készítménynél alacsonyabb produktivitást mutatott, vagyis ez kötötte meg a legkevesebb

enzimet aktív formában. A második legalacsonyabb produktivitas a glutáraldehiddel kezelt szilikagélhez tartozik, tehát az összes biszepoxiddal kezelt készítmény produktívabb. Egyedül a G-DGE felhasználásával készült hordozó mutat alacsonyabb produktivitást a kereskedelmi kovalens enzimműködésénél, azaz a CV T2-150-nél, a másik öt biszepoxid hatásosabbnak bizonyult. Jól látszik a diagramon, hogy a Triton-X 100-zal való kezelés nem csökkentette drasztikusan a készítmények produktivitasát, átlagban több mint 90 %-át megtartották az aktivitásnak, sőt a G-DGE esetében még növelte is azt. Ez kifejezetten érdekes eredmény, azonban a teljes kísérletsorozat, vagyis a hordozók felületmódosításának, az enzim rögzítésének és a rezolválások újbóli megismétlésének elvégzése után is ugyanilyen eredményt kaptunk. Ennek valószínűsíthetően az oka az enzim szerkezetének megváltozásával, reaktív csoport(ok) hozzáféréseinek növelésével magyarázható.



1. Diagram: Kezeletlen illetve utókezelt enzimműködés produktivitas

A három legmagasabb produktivitást mutató enzimműködés a PE-DGE, HD-DGE, NP-DGE biszepoxidok felhasználásával készült hordozók. E három készítmény konverziója az utókezelés után is 15 % fölött volt, mely érték jóval magasabb, mint a kereskedelmi enzimműködés, azaz a CV T2-150 kezeletlen mintájának eredménye, amely 11,7 %-nak adódott. Ezek a készítmények hatékonyabbnak bizonyultak, mint a glutáraldehid, így ezek produktívabb alternatívái lehetnek az erősen mérgező és nehezen kezelhető dialdehidnek. Legjobb felületmódosított hordozónak a

polietilén-diglicidiléterrel módosított szférikus szilikagél bizonyult a maga 19,9 %-os konverziójával, mely utókezelés hatására 18,8%-ra csökkent (94,5 %-át megtartotta).

A biszepoxidos minták enantiomer-tisztasága az utókezelés után is 98,0 % fölött maradt, a legjobbnak ítélt három minta produktivitása az utókezelés után is meghaladta a kereskedelmi enzimek készítmény által hozott maximumot, illetve magasan felülmúlta a glutáraldehides készítmény eredményeit.

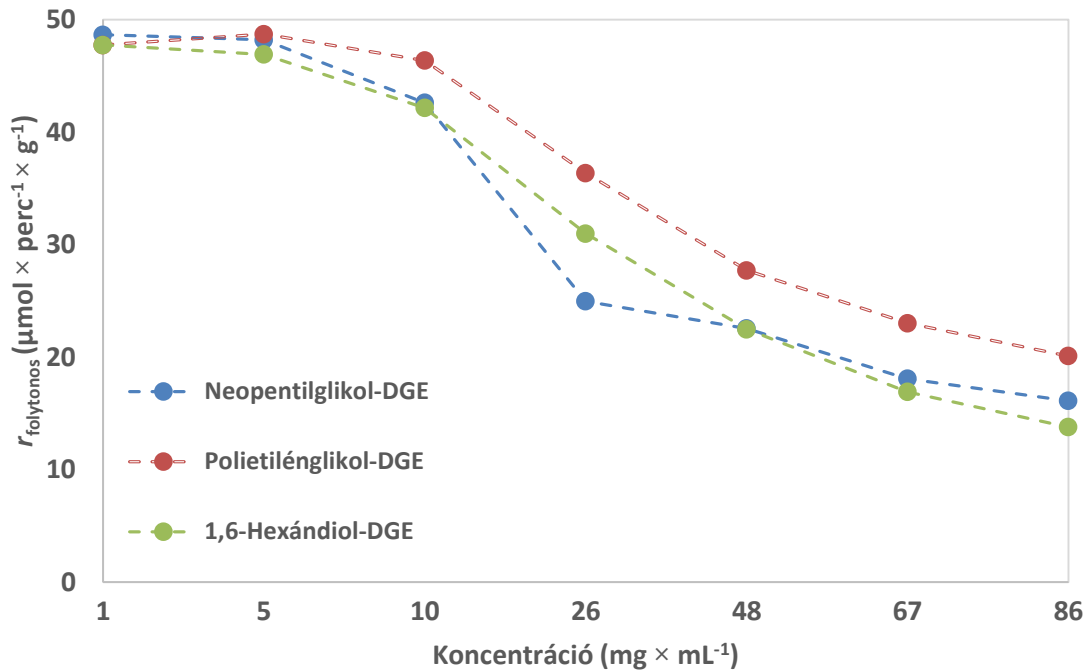
3.4.2. Folytonos üzemű kinetikus rezolválás

Az enzimek készítmények vizsgálata során fontos szempont volt, hogy azok felhasználhatóságát széleskörűen megvizsgáljuk és teszteljük, így a szakaszos üzemű kísérletek során a három legjobbnak adódott készítménnyel (PE-DGE, HD-DGE, NP-DGE) folytonos üzemű kísérleteket is végeztem. Ezzel célunk volt a produktivitás növelése is. A három diglicidiléteres biokatalizátort (PE-DGE, HD-DGE, NP-DGE) acél CatCart™ oszlopokba töltöttem vákuumban és teflon záró elemet használtam a lezáráshoz. Mind a három enzimek készítménnyel megtöltöttem két-két oszlopot, az egyik sorozattal különböző a szubsztrát koncentráció-függését végeztem el a hordozóknak, míg a második sorozattal a hőmérsékletfüggést vizsgáltuk.

Először az oldószerekkel mostuk át az oszlopokat, majd a kiindulási reakcióelegy különböző (1, 5, 10, 26, 48, 67, 86 mg×mL⁻¹) koncentrációjú elegyét áramoltattam át a három különböző oszlopon 0,2 mL×perc⁻¹ térfogatárammal 30°C-on. A kifolyó elegyekből a stacioner állapot beállta után (~40 perc) mintát vettem, majd etanollal hígítottam és királis állófázisú GC-vel vizsgáltam. Egy olyan koncentráció beállítására irányult ez a kísérletsorozat, ahol a biokatalizátorokkal elérhető konverzió a 10-20 %-os tartományon belül van, hiszen egy ilyen tartomány megtalálása szükséges 30°C-on, hogy ezzel a koncentrációjú szubsztrát oldattal hőmérsékletfüggést végezzünk a továbbiakban, hiszen ettől alacsonyabb hőmérsékleten kisebb konverzió értékek, míg magasabb hőmérsékleten magasabb értékek várhatók.

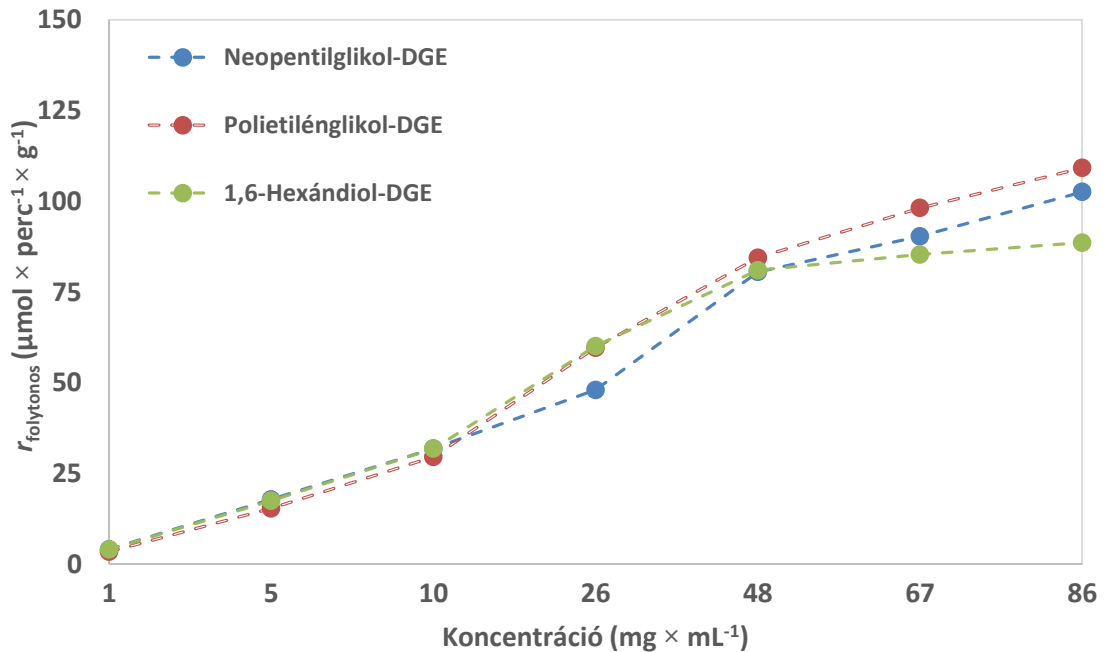
A 2. diagramon a szubsztrát koncentráció függvényében ábrázoltam a kapott konverzió értékeket ahol jól látszik, hogy a három enzimek készítmény 86 mg×mL⁻¹-es szubsztrát koncentráció mellett éri el a 20 % körüli konverziót, vagyis ez tekinthető az optimális koncentrációnak, hiszen itt még az enzimek kinetikai szempontból a lineárisan növekvő szakaszban vannak.

Konverzió a koncentráció függvényében



2. Diagram: Enzimkészítmények konverziója a koncentráció függvényében, a folytonos üzemű, töltött ágyas reaktorban végzett kísérletek során

Enzimkészítmények produktivitása a koncentráció függvényében

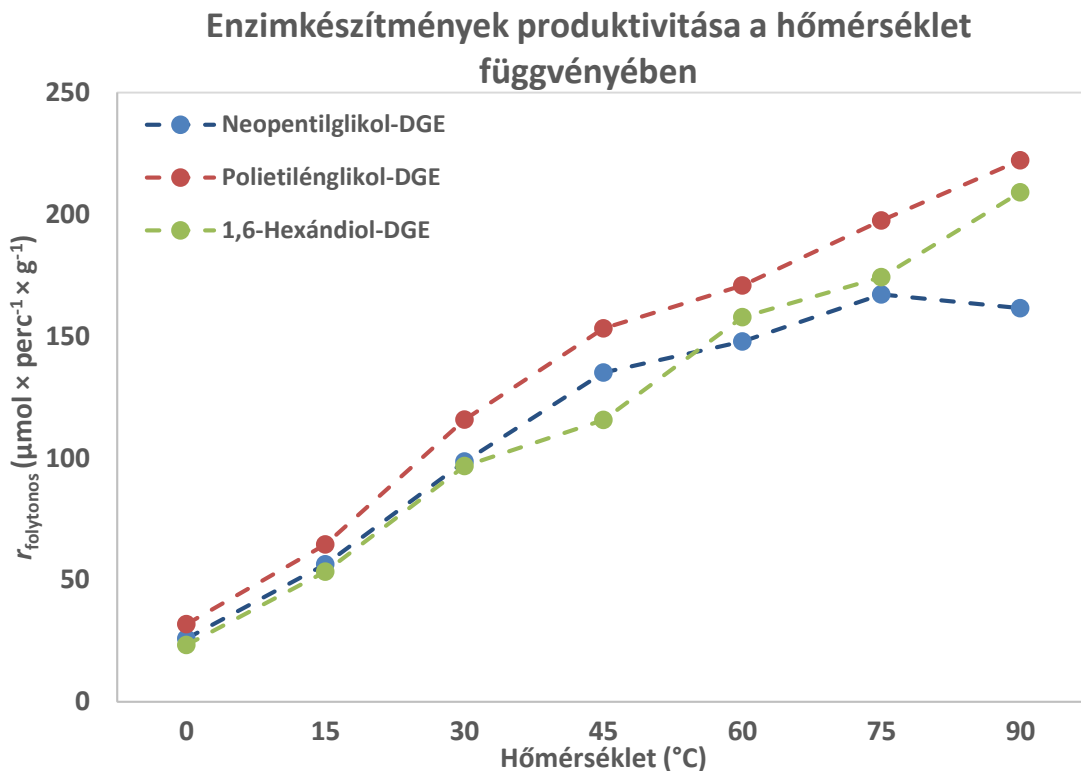


3. Diagram: Enzimkészítmények produktivitása a koncentráció függvényében, a folytonos üzemű, töltött ágyas reaktorban végzett kísérlet során

A 3. diagramon ugyanezen három párhuzamos kísérlet eredményeit láthatjuk, azonban itt a koncentráció függvényében a produktivitás értékeket ábrázoltuk. A HD-DGE-vel módosított hordozó mutatja a leggyengébb eredményeket. Látható, hogy míg a PE-DGE-vel és NP-DGE-vel készült enzimmészítmények produktivitása $67 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ -es koncentráció után is növekszik, a HD-DGE-s hordozó teljesítménye már csak kis mértékben növekszik. A 2. és 3. diagramokon látszik, hogy ebben a kísérletben is a PE-DGE felhasználásával előállított készítmény a leghatékonyabb, a koncentráció növelésével a produktivitása folyamatosan emelkedik, a $86 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ -es értéknél is még a lineáris szakaszban van a növekedés. A készítmény konverziója a kezdeti magas értékekről lecsökken ugyan, de ennek a csökkenésnek a mértéke kisebb, mint a többi hordozónál, a kísérlet végén is 20% fölötti értéket mutat.

Az előzőekben megállapított megfelelő koncentráción ($86 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$) vizsgáltam a második tesztorozat során az enzimmészítmények hőmérséklettűrését, ekkor $0-90^\circ\text{C}$ -os tartományban, 15°C -os lépésközzel növeltük a hőmérsékletet. Az előző kísérletek alapján kiválasztott $86 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ -es koncentrációjú reakcióelegyet áramoltattam át a második három oszlopon, ahol szintén a stacioner állapot beállta után vettünk mintát és elemeztük azt. Ahogy az a 4. diagramon is látszik, az enzimmészítmények produktivitása a hőmérséklet növelésével nőtt, a görbék lefutása hasonló 75°C -ig, mely érték fölött azonban NP-DGE felhasználásával készült hordozó csökkenő produktivitást mutat, vagyis a rögzített enzimek stabilitása ezen a hőmérsékleten már erősen lecsökken. A készítmények közül ebben a kísérletben is a PE-DGE-vel kezelt hordozó adta a legmagasabb értékeket, de a HD-DGE-s készítmény is folyamatosan növekvő produktivitást mutat, ezen készítmények egyértelműen hőstabilak, magasabb hőmérsékleten végzett kísérletekben is alkalmazhatóak.

A PE-DGE-vel illetve a HD-DGE-vel kezelt hordozókból fejlesztett enzimmészítmények konverziója meghaladta a 30 %-ot 90°C -on, az enantiomer-tisztaság pedig a teszt során végig 98,5 % fölött volt mind a három készítménynél.



4. Diagram: Enzimmészítmények produktivitása a hőmérséklet függvényében, a folytonos üzemű, töltött ágyas reaktorban végzett kísérletek során

Az áramlásos tesztek eredményei alapján mondhatjuk, hogy a fejlesztett hordozókkal nem csak magas produktivitást érhetünk el folyamatos üzemben történő alkalmazásukkal, de meg is tarthatjuk azt hosszabb távú használat során akár magasabb hőmérsékleteken is.

3.4.3. Enzimmészítmények újrahasznosíthatóságának vizsgálata

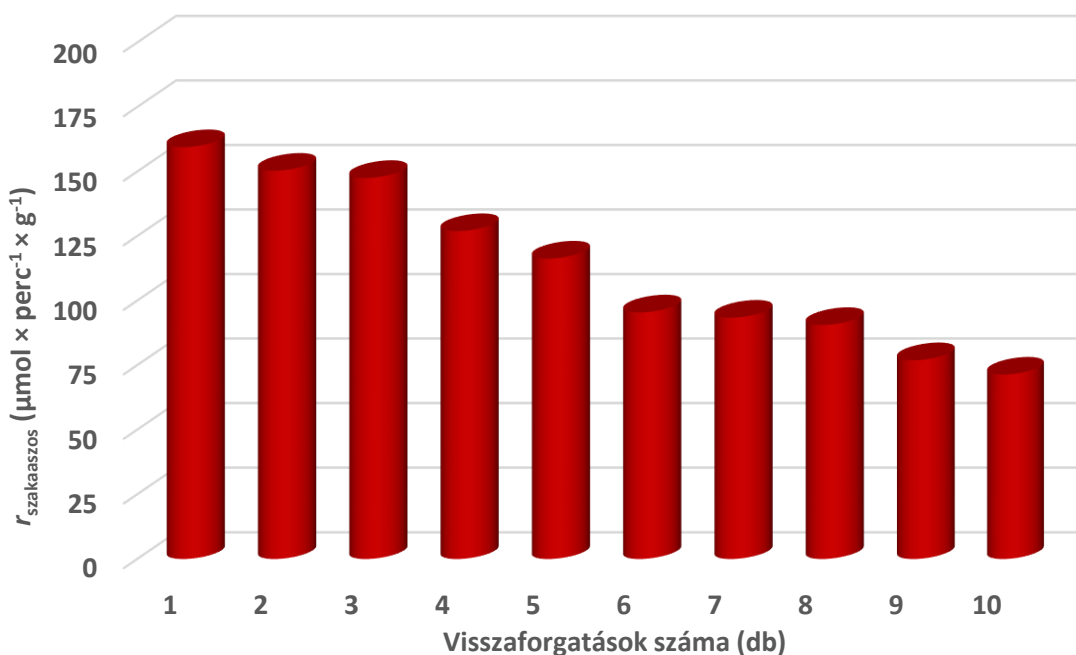
Az enzimmészítmények újrafelhasználhatósága visszaforgatásos kísérletekben szemléltethető a legegyszerűbben, így kísérleteket végeztünk olyan céllal, hogy megvizsgáljuk a készítmények „élettartamát” illetve összehasonlítsuk azt a kereskedelmi enzimmészítményekével. A három legjobbnak ítélt hordozót (PE-DGE, HD-DGE, NP-DGE biszepoxidokkal módosított MAT540 szilika) hasonlítottam össze N435 adszorpciós enzimmészítménnyel, illetve CV T2-150 hordozóval szintén az 1-feniletanol kinetikus rezolválásán keresztül szakaszos üzemben.

A pontosan kimért hordozókhöz hozzáadtam a reakcióelegy törzsoldatából a 3.4.1. pontban alkalmazott arányoknak megfelelően, majd fél órán keresztül rázattuk az enzimmészítményeket és mintavétel után a biokatalizátorokat kiszűrtük a reakcióelegyből,

hexánnal, MTBE-vel, majd ismét hexánnal mostuk. 15 percig szárítottam őket üvegszűrőn, visszamértük a tömegüket, majd előről kezdve a ciklust ismét hozzáadtuk a mintákhoz a reakcióelegyet. Összesen tíz kört végeztünk el.

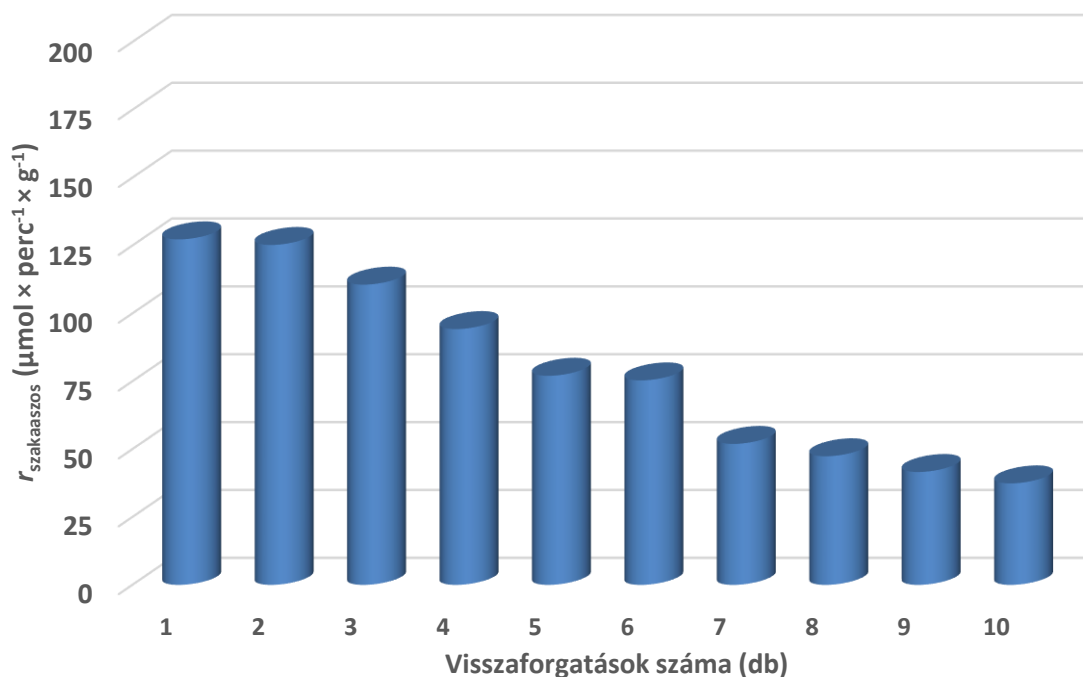
A visszaforgatásos kísérletek során mért eredményeket az 5-9. diagramokon ábrázoltam és az 1. táblázatban foglaltuk össze. A diglicidiléteres készítmények produktivitása magasabbnak bizonyult a 10 ciklus után, mint a kereskedelmi kovalens készítményé (CV T2-150), valamint élettartamuk stabilabbnak mutatkozik a kereskedelmi adszorpciós készítményénél, mivel produktivitásuk kisebb mértékben romlott a visszaforgatásos tesztek alatt, tehát stabilabbnak bizonyultak. A legmagasabb produktivitást a kovalens készítmények közül itt is PE-DGE felhasználásával készült hordozó mutatta a teszt sorozat végén (1. kör: $r_{\text{szakaszos}}=159$, illetve 10. kör: $71 \text{ mol} \times \text{perc}^{-1} \times \text{g}^{-1}$, 45%-át megtartotta).

Enzimkészítmények újrahasznosíthatósága (PE-DGE)



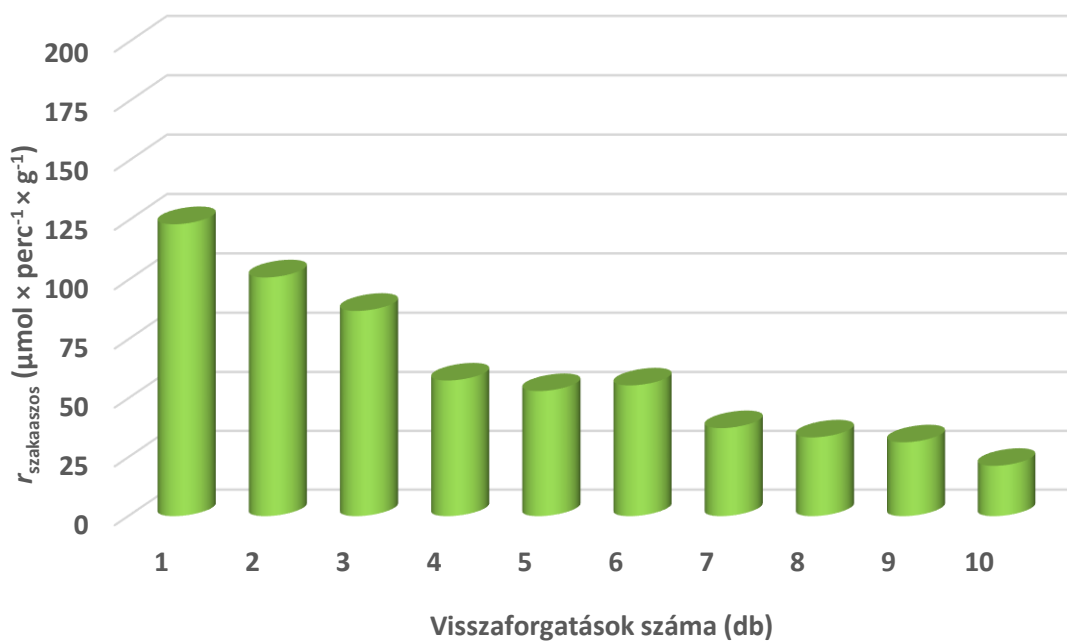
5. Diagram: Polietilén-diglicidiléterrel kezelt hordozó produktivitása a visszaforgatás ismétlésének függvényében

Enzimek újrahaznosíthatósága (NP-DGE)

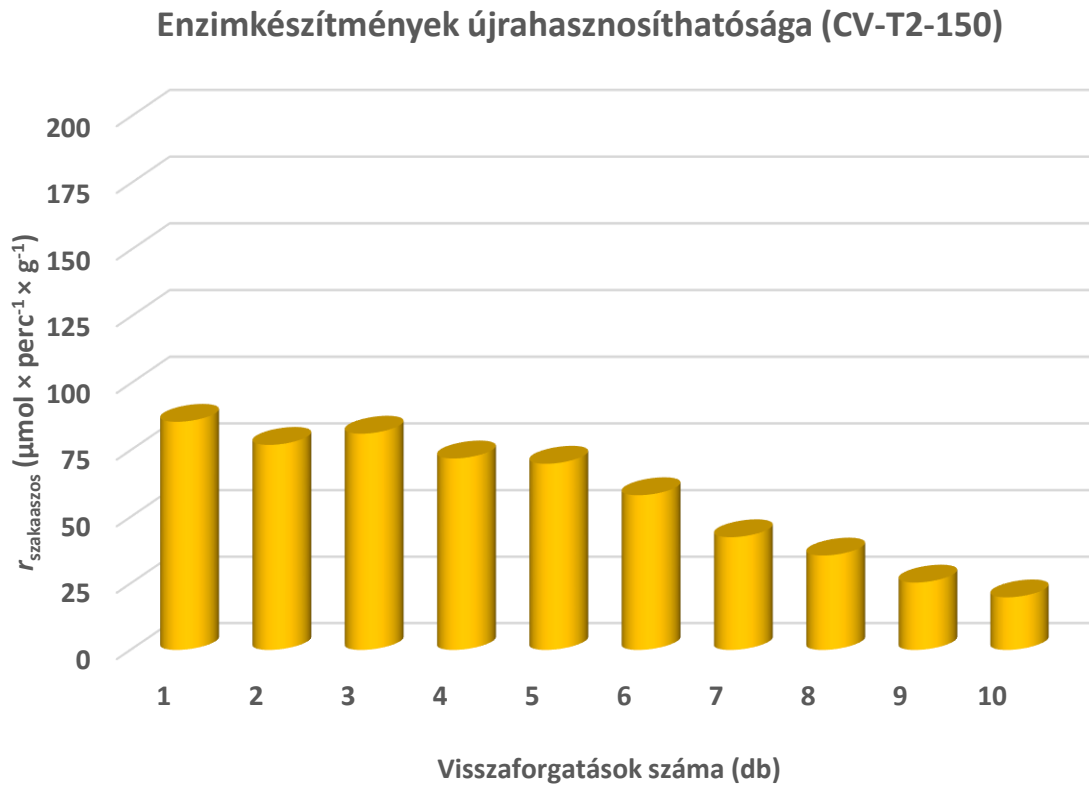


6. Diagram: Neopentilglikol-diglicidiléterrel kezelt hordozó produktivitása a visszaforgatás ismétlésének függvényében

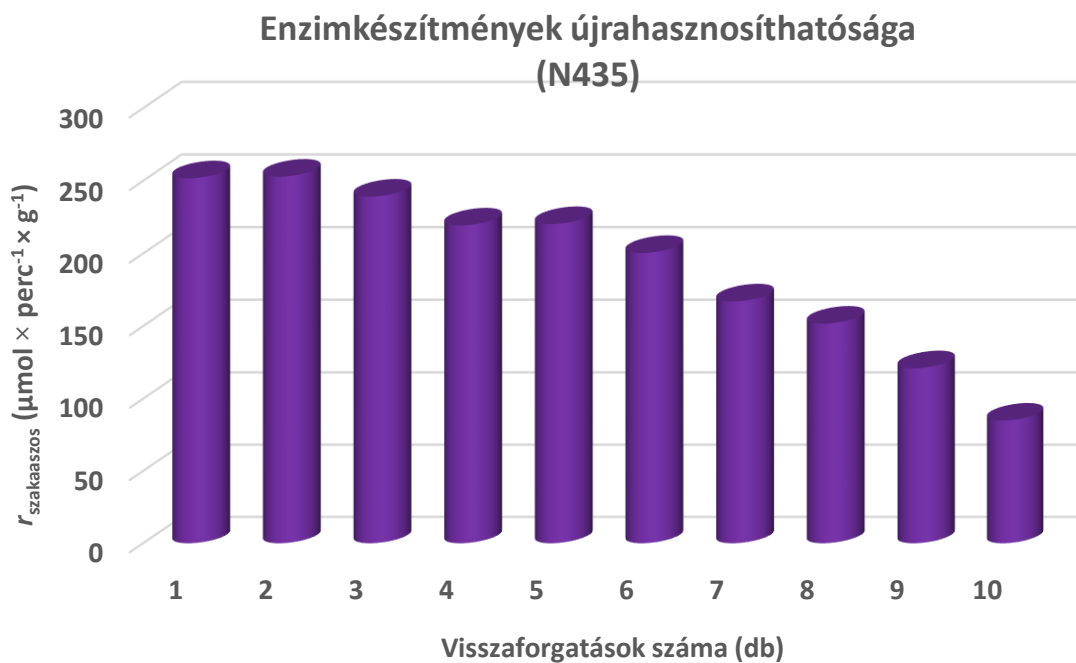
Enzimek újrahaznosíthatósága (HD-DGE)



7. Diagram: 1,6-Hexándiol-diglicidiléter kezelt hordozó produktivitása a visszaforgatás ismétlésének függvényében



8. Diagram: CV T2-150 enzimek újrahasonosíthatósága a visszaforgatás ismétlésének függvényében



9. Diagram: Kereskedelmi adszorpciós enzimek újrahasonosíthatósága a visszaforgatás ismétlésének függvényében

A visszaforgatásos kísérletek eredményei is azt mutatják, hogy a fejlesztett hordozók alkalmasak hosszú élettartamú kovalens biokatalizátorok gyártására, a produktivitás megfelelően magas marad huzamosabb igénybevétel után is, ráadásul a készítmények fizikailag is stabilak. Az általunk vizsgált módokban (szakaszos üzem, folytonos üzem, visszaforgatás) hatékonyabbnak bizonyultak a glutáraldehiddel rögzített és a kereskedelmi kovalens készítménnyel szemben is.

1. Táblázat: A visszaforgatásos kísérletek eredményei

Hordozó	Ciklus száma	Biokat. tömeg (mg)	Enantiomer-tisztaság (%)	Konverzió (%)	Produktivitás (mol×perc ⁻¹ ×g ⁻¹)
NP-DGE	1	200,0	99,0	12,1	127,3
NP-DGE	5	182,0	98,4	7,6	77,0
NP-DGE	10	133,0	98,6	4,6	37,4
PE-DGE	1	200,0	98,9	15,2	159,4
PE-DGE	5	169,0	99,0	10,7	116,3
PE-DGE	10	106,0	99,2	7,2	71,3
HD-DGE	1	200,0	99,0	11,7	123,5
HD-DGE	5	191,0	98,4	6,1	53,1
HD-DGE	10	130,0	98,9	3,6	21,4
CV-T2-150	1	200,0	99,0	8,1	85,7
CV-T2-150	5	178,0	98,6	6,8	70,0
CV-T2-150	10	159,0	98,9	3,0	19,8
N435	1	200,0	99,2	23,9	251,8
N435	5	160,0	99,0	21,3	220,3
N435	10	132,0	99,2	14,6	85,0

4. Kísérleti rész

4.1. Felhasznált anyagok

A felhasznált vegyszerek (1-feniletanol, Triton-X 100, nátrium-dihidrogén-foszfát, sósav, nátrium-hidroxid, glutáraldehid) és oldószerek (hexán, etanol, 2-propanol, Patosolv, vinil-acetát, MTBE) a Sigma-Aldrich, a Fluka, a Merck, az Alfa Aesar, a Reanal és a Molar Chemicals termékei, a hordozófejlesztés alapjául szolgáló Matspheres 540® szilikagélt a Materium Innovations gyártja, míg CV-T2-150 a Chiral Vision terméke. A rögzítéshez használt *CaLB*-t a C-Lecta gyártja. A felhasznált biszepoxidok (polietilén-diglicidiléter, neopentilglikol-diglicidiléter, 1,6-hexándiol-diglicidiléter, 1,4-butándiol-diglicidiléter, ciklohexil-dimetanol-diglicidiléter) az IPOX Chemicals termékei.

4.2. Módszerek

A gázkromatográfiás méréseket Agilent 4890 készüléken végeztem, Hydrodex β -6TBDM (25m \times 0,25 mm \times 0,25 mm film, t-butil-dimetilszililezett β -ciklodextrin; Macherey&Nagel) enantiomer szelektív királis állófázist tartalmazó kolonnával. Vivőgázként hidrogént használtam (fejnyomás 12 psi, split 50 : 1). Injektor és FID detektor hőmérséklete: 250°C. A reakciók követéséhez a GC-hez szükséges mintákat közvetlenül a reakcióelegyből vettem, majd diklórmetánnal hígítottam megfelelő koncentrációra (1-2 mg \times mL⁻¹).

GC programok és retenciók idők az 1-feniletanol és az 1-feniletil-acetát mérésekor Hydrodex β -6TBDM kolonnával.

(*S*)-1-feniletil-acetát:

GC (Hydrodex β -6TBDM; 120°C izoterm, 8 perc):

3,4 perc

(*R*)-1-feniletil-acetát:

GC (Hydrodex β -6TBDM; 120°C izoterm, 8 perc):

3,7 perc

(*R*)-1-feniletanol:

GC (Hydrodex β -6TBDM; 120°C izoterm, 8 perc):

4,7 perc

(*S*)-1-feniletanol:

GC (Hydrodex β -6TBDM; 120°C izoterm, 8 perc):

4,9 perc

4.3. MAT540 szilika hordozó módosítása diglicidiléterekkel

A kísérletet 40 mL-es zárható üvegekben végeztem. A megfelelő biszepoxidokból (G-DGE, BD-DGE, HD-DGE, PE-DGE, CD-DGE, NP-DGE) törzsoldatokat készítettem (1000 mg hordozóhoz: 16 mL etanol, 2,94 mmol biszepoxid, 642 mg G-DGE, 596 mg BD-DGE, 678 mg HD-DGE, 1678 mg PE-DGE, 754 mg CD-DGE, 636 mg NP-DGE, arányban), majd ebből 32 mL-eket pipettáztam a már kimért szilikákhoz (6*2000 mg). A glutáraldehides készítményhez törzsoldatot készítettem (1000 mg hordozóhoz: 16 ml etanol, 2,94 mmol, 592 mg glutáraldehid arányban), majd ebből 16 mL-t pipettáztam a kimért 1000 mg hordozóhoz. A szuszpenziókat 24 órán át 60°C-on rázógépen (Heidolph Vibramax 100) rázattam olyan fordulaton, hogy az üvegek tartalma ne ülepedjen ki (kb. 350 rpm).

2. táblázat: A felhasznált biszepoxidok és glutáraldehid mennyisége

Név	Tömeg (mg)	Mennyiség (mmol)
G-DGE	1284	2,94
BD-DGE	1192	2,94
HD-DGE	1356	2,94
PE-DGE	3356	2,94
CD-DGE	1508	2,94
NP-DGE	1272	2,94
Glutáraldehid	592	2,94

24 óra után a mintákat üvegszűrőn (G4) szűrtem, majd kétszer Patosolvval és egyszer hexánnal felszuszpendáltam és újra szűrtem. A mintákat levegőn szárítottam, majd felhasználásig argon alatt tároltam.

4.4. CaLB rögzítés módosított MAT540 szilikára

A kísérletet 60 mL-es csavaros kupakkal ellátott üvegekben végeztem. 2800 mg szilárd CaLB enzimből és 700 mL foszfát-pufferből (100 mM, pH=7,5) törzsoldatot készítettem, amelyből 37,5 mL-t pipettáztam mind a 6 biszepoxidos illetve a

glutáraldehides hordozó 750-750 mg-jához (egy típusú hordozóból 1500 mg-hoz). A törzsoldatból 25 mL-t pipettáztam a referencia mérések céljából előkészített hordozók (CV T2-150, módosítatlan MAT540) 500-500 mg-jához (egy típusú hordozóból 1000 mg-hoz). A szuszpenziókat 24 órán át szobahőmérsékleten rázógépen (Heidolph Vibramax 100) rázattam.

24 óra után a mintákat üvegszűrőn (G4) szűrtem, majd kétszer vízzel, 2-propanollal és hexánnal mostam, végül a mintákat levegőn szárítottam és felhasználásig argon alatt tároltam.

4.5. Enzimek deszorbeálhatóságának vizsgálata

A kísérletet 15 mL-es fugacsövekben végeztem. 220 mg Triton-X100-ból és 220 mL foszfát-pufferből (100 mM, pH=7,5) törzsoldatot készítettem, amelyből 7 mL-t pipettáztam minden hordozó (hat biszepoxidos, egy glutáradehid, módosítatlan szilikagél, CV T2-150) 200 mg-jához. A szuszpenziókat 2 órán át szobahőmérsékleten rázattam.

2 óra után a mintákat centrifugáltam 3500 rpm-en 5 percig, majd a puffert leöntöttem róluk. Desztillált vízben szuszpendáltam a mintákat és ismét centrifugáltam őket 3500 rpm-en 5 percig, majd a vizes fázist leöntöttem. Ezt a mosást tízszer ismételt meg, végül hexánban szuszpendáltam a mintákat, centrifugáltam őket 3500 rpm-en 5 percig, majd leöntöttem a folyadékot. A mintákat levegőn szárítottam, majd felhasználásukig argon alatt tároltam őket.

4.6. Szakaszos üzemű kinetikus rezolválás

A racém 1-feniletanolból, vinil-acetátból, MTBE-ből illetve hexánból törzsoldatot készítettem a 3. táblázatnak megfelelő arányban.

3. táblázat: Tesztreakciók összetétele

Név	Tömeg (mg)	Mennyiség (mmol)	Térfogat (mL)
enzimkészítmények	20*25,0	-	-
<i>rac</i> -1-feniletanol	4084	33,4	4,0
hexán	-	-	48
MTBE	-	-	24
vinil-acetát	7456	86,6	8

A reakciókat termosztálható rázógépen (Heidolph Vibramax 100) 4,0 mL-es teflon zárólemezes, menetes kupak segítségével légmentesen lezárt reakció edényben végeztem (30°C, 750 rpm). Az elkészített törzsoldatból 2,0 mL-t pipettáztam az üvegekbe, amelyekbe már előzőleg kimértem 25,0-25,0 mg-ot mind a 9 enzimkészítményből, illetve a 9 készítmény utókezelt mintáiból is (összesen 18 minta). A reakcióelegyekből különböző időközönként (0,5; 1; 2 óra) 20 µL mintát vettem, majd 1 mL etanollal hígítottam és királis állófázisú GC-vel vizsgáltam.

4.7. Folytonos üzemű kinetikus rezolválás

A három legjobbnak bizonyult biszepoxidos enzimkészítményt (PE-DGE, NP-DGE, HD-DGE) CatCart™ acél oszlopokba töltöttem vákuum segítségével, majd teflon záróelemek felhasználásával zártam. Oldatot készítettem a *rac*-1-feniletanol, MTBE, vinil-acetát 6 : 3 : 1 arányú oldószer elegyben készítettem. Az oldatok áramoltatása HPLC pumpák segítségével (Knauer, Azura 4.1S), a hőmérséklet-szabályozás folyadék termosztáttal történt (Lauda, Alpha RA8) és a rendszerben uralkodó valós hőmérsékletet egy kontakthőmérővel ellenőriztük

Első körben a *CaLB* enzimkészítmények koncentráció-függését vizsgáltuk az átfolyós rendszerben. Ehhez a különböző rögzített enzimes töltött CatCart™ átfolyós reaktorokon keresztül áramoltattuk át a különböző koncentrációjú (1, 5, 10, 26, 48, 67, 86 mg×mL⁻¹) racém 1-feniletanol oldatokat 0,2 mL×perc⁻¹ térfogatárammal 30°C hőmérsékletre termosztálva a rendszert. A kifolyó elegyekből folyamatosan mintát vettünk és gázkromatográfiásan vizsgáltuk (Hydrodex-β-6-TBDM kolonna), a stacioner állapot beállta után változtattuk a szubsztrát oldat koncentrációját a legkisebttől a legnagyobb felé haladva.

Második kísérletsorozatunkban a biszepoxidos enzimkészítmények hőmérsékletfüggését vizsgáltuk 0-90°C hőmérséklettartományban 15°C lépésekkel haladva 0°C-tól 90°C-ig. Az átáramoltatott racém 1-feniletanol oldat koncentrációja 86 mg×mL⁻¹, a térfogatáram 0,2 mL×perc⁻¹ volt.

A 4. táblázatba foglaltam össze az oszlopok töltetömegeit, ahol a „hőm.” jelzésűeket használtam a folytonos teszteknel a hőmérsékletfüggési vizsgálatokhoz, míg a jelzés nélkülieket a koncentráció-függés esetén.

4. Táblázat: Töltött oszlopok töltetömege.

Enzimmészítmény	Tömeg (mg)
PE-DGE	259
PE-DGE (hőm.)	217
NP-DGE	221
NP-DGE (hőm.)	236
HD-DGE	219
HD-DGE (hőm.)	214

4.8. Enzimmészítmények visszaforgathatóságának vizsgálata

Az enzimmészítmények visszaforgatásos teszteléséhez a három legjobbnak ítélt biszepoxidos készítményből (PE-DGE, NP-DGE, HD-DGE), illetve a kereskedelmi enzimmészítményekből (CV T2-150 hordozóra általunk kovalensen rögzített *CaLB* enzimes készítmény, N435 enzimmészítmény) kimértem 200,0-200,0 mg-ot 20 mL-es zárható üvegekbe. A készítményekhez hozzápipettáztam 16 mL a 4.6. pontban leírt összetételű reakcióelegyet. A szuszpenziókat termosztálható rázógépen (Heidolph Vibramax 100) harminc percen keresztül 30°C-on rázattam olyan fordulaton, hogy az üvegek tartalma ne ülepedjen vissza (350 rpm).

A fél óra leteltével az oldatokból 20 µl mintát vettem, 1 mL etanollal hígítottam és királis állófázisú GC-vel vizsgáltam őket az 1-feniletanol kinetikus rezolválásán keresztül. A mintavétel után az oldatokat üvegszűrőn (G4) szűrtem, majd egyszer hexánnal, kétszer MTBE-vel és végül szintén hexánnal mostam. Az üvegszűrőn 15 percig száradni hagytam a készítményeket.

A negyedóra eltelte után a készítményeket visszamértem tiszta 20 mL-es zárható üvegekbe a tömegüket feljegyezve, majd 16 mL, a 4.5. pontban leírt összetételű reakcióelegyet pipettáztam hozzájuk. A szuszpenziókat termosztálható rázógépen (Heidolph Vibramax 100) harminc percen keresztül 30°C-on rázattam. A rázatás után a már említett módon mintát vettem az oldatokból és királis állófázisú GC-vel vizsgáltam őket. A mintavétel után az oldatokat üvegszűrőn (G4) szűrtem, majd egyszer hexánnal, kétszer MTBE-vel és végül szintén hexánnal mostam. Az üvegszűrőn 15 percig száradni hagytam a készítményeket. Ezt a ciklust ismételt meg összesen tízszer. A biokatalizátorok tömegét az egyes ciklusokban a 5. táblázatban foglaltam össze.

5. Táblázat: A biokatalizátorok mennyisége a visszaforgatásos kísérletekben

Ciklus száma	PE-DGE (mg)	HD-DGE (mg)	NP-DGE (mg)	CV-T2-150 (mg)	N435 (mg)
1	200	200	200	200	200
2	200	200	200	195	180
3	187	200	200	192	174
4	181	198	197	184	170
5	169	191	182	178	160
6	166	179	177	172	147
7	148	169	170	166	143
8	135	156	157	163	137
9	120	143	150	162	135
10	106	130	133	159	132

5. Összefoglalás

Az alkalmazott biotechnológia területén egyre szélesebb körben használnak rögzített enzimkészítményeket biotranszformációs célra. Az immobilizálás által az enzimek stabilitása (hőmérséklet, pH tűrés) és eltarthatósága növekszik, felhasználhatósági területük jelentősen kiszélesedik és könnyen visszanyerhetők a reakcióelegyből egyszerű fizikai szeparáció (szűrés, centrifugálás) útján, sőt akár újra fel is használhatók. TDK munkám is ehhez a területhez kapcsolódik, hiszen dolgozatomban egy kovalens enzimirögzítési módszerrel foglalkoztam.

Munkám során módosított szférikus szilikagél alapú hordozók fejlesztésén dolgoztam, mely hordozók alkalmasak célfehérjék kovalens rögzítésére. A Matspheres Innovations cégtől kapott MAT540 szférikus szilikagélt különböző biszepoxidokkal módosítottam, majd ezekhez *Candida antarctica* B lipáz (CaLB) enzimet rögzítettem. A biokatalizátorok aktivitását a racém 1-feniletanol kinetikus rezolválásában vizsgáltam, a reakciókat királis állófázisú gázkromatográfiával követtem. Az enzimkészítmények biokatalitikus aktivitása és az előállítási paraméterek közti összefüggést vizsgálva, a technológia fejlesztése, a produktivitás és szelektivitás növelése érdekében a változtatható paraméterek optimumának megtalálására törekedtem. A kovalens rögzítésre széles körben alkalmazott, erősen mérgező és nehezen kezelhető glutáraldehidnek hatékonyabb és gazdaságosabb alternatíváját kerestük. Kereskedelmi forgalomban kapható készítményekkel (Chiral Vision®; CV T2-150) is összehasonlítottuk saját fejlesztésű készítményeinket. Összesen hatféle biszepoxidot vizsgáltam (G-DGE, BD-DGE, HD-DGE, PE-DGE, CD-DGE, NP-DGE), amelyek a két epoxigyűrű közötti szénláncban különböztek.

A rögzített enzimek stabilitását Triton-X 100 nem-ionos felület aktív anyaggal végzett utókezeléssel vizsgáltuk. A kezeletlen és az utókezelt készítményeket párhuzamos kísérlet sorozatban szakaszos üzemű rázatott lombikos tesztekben vizsgáltuk. Az eredményekből egyértelműen megállapítható, hogy a 6hat biszepoxid bizonyult hatékonyabbnak a glutáraldehiddel rögzített készítménynél, míg a CV T2-150 hordozónál öt epoxid volt produktívabb. A Triton-X 100-as utókezelés hatására a biokatalizátorok 90-95 %-ban megtartották aktivitásukat és magas értékeket produktivitás értékeket értek el ($r_{szakaszos}$: PE-DGE= 197, NP-DGE= 176, HD-GDE= 166 $\mu\text{mol} \times \text{perc}^{-1} \times \text{g}^{-1}$). Emellett az enantio-szelektivitás értékek is minden esetben 98,8 % felett voltak.

Szakaszos üzemben a három legjobbnak bizonyult biszepoxidos készítményt (PE-DGE, NP-DGE, HD-GDE) folytonos üzemű kinetikus rezolválásban is vizsgáltam. A biokatalizátorokat CatCart™ acél oszlopokba töltöttem vákuum segítségével és teflon szűrő és záróelemekkel rögzítettük és egy precízen termosztálható alumínium reaktorblokkon áramoltattuk át HPLC pumpák segítségével. Elvégeztük a készítmények szubsztrát-függésének vizsgálatát különböző koncentrációjú 1-feniletanol elegyek átáramoltásával (1, 5, 10, 26, 48, 67, 86 mg×mL⁻¹) 0,2 mL×perc⁻¹ térfogatárammal 30°C-on. A koncentráció növelésével a készítmények produktivitása is növekedett, a legaktívabb PE-DGE még 86 mg×mL⁻¹-es koncentráció mellett is 20 % körüli konverziót ért el. Ezek után megvizsgáltuk a rögzített enzimekészítmények hőmérsékletfüggését, ehhez 0-90°C között 15°C-os lépéssel növeltem a hőmérsékletet és áramoltattam át 86 mg×mL⁻¹ koncentrációjú oldatot 0,2 mL×perc⁻¹ térfogatárammal. A készítmények 75°C-ig növekvő produktivitást mutattak, majd 90°C-on már a HD-GDE értékei csökkentek (90°C: $r_{\text{folytonos}}$ PE-DGE= 222, NP-DGE= 162, HD-GDE= 209 $\mu\text{mol}\times\text{perc}^{-1}\times\text{g}^{-1}$).

A három legjobb készítmény stabilitását visszaforgatásos kísérletekben is vizsgáltuk, összehasonlítva a kereskedelmi kovalens CV T2-150 és az adszorpciós N435 készítményekkel. A kísérleti eredmények összhangban vannak a szakaszos és folytonos üzemben végzett kísérletekkel, hiszen itt is a PE-DGE adódott a legjobbnak, még 10 visszaforgatási kör után is megtartotta aktivitásának 45 %-át ($r_{\text{szakaszos}}$: 1. kör: PE-DGE= 159, 10. kör: 71 $\mu\text{mol}\times\text{perc}^{-1}\times\text{g}^{-1}$).

Összességében elmondható, hogy a kitűzött céljainkat teljesítettük, hiszen sikerült olyan mechanikailag stabil, kovalens rögzítésre alkalmas hordozókat előállítani, amelyek alkalmasak heterogén fázisú biokatalízis megvalósítására szakaszos és folytonos üzemben. A szakaszos üzemben végzett kinetikus rezolvások után három biszepoxidot választottunk ki (PE-DGE, NP-DGE, HD-DGE), amelyeknek a legmagasabb volt a produktivitása ($r_{\text{szakaszos}}$), majd ezzel a három készítménnyel végeztünk folytonos üzemű tesztek. A folytonos laborreaktorban végzett hőmérsékletfüggés során a PE-DGE adódott a leghőstabilabbnak, hiszen még 90°C-on is magas produktivitás érték ($r_{\text{folytonos}}$ PE-DGE= 222 $\mu\text{mol}\times\text{perc}^{-1}\times\text{g}^{-1}$) mellett 98,9 %-os enantiomer-felesleget ért el. A hordozóink előállítása gazdaságos, hiszen a technológia nem igényel drága vegyszereket és oldószereket, illetve extrém technológiai körülményeket.

6. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Poppe Lászlónak, a szakmai tanácsai és támogatása nélkül a TDK dolgozatom nem jöhetett volna létre. Hálás köszönettel tartozom Oláh Márknak, konzulensemnek is, hiszen az Ő szakmai segítsége és lelki támogatása nagymértékben hozzájárult ahhoz, hogy munkámat sikeresen végezhettem a kutatócsoport részeként.

Hálás köszönettel tartozom ipari partnereinknek, a SynBiocat és a Materium Innovations Kft-nek.

Szeretném megköszönni a „Déli2” laborban dolgozó technikusainknak, Molnárné Bernáth Ritának és Czerman Ádámnak, a munkám során nyújtott közvetlen és közvetett segítségüket.

Hálával tartozom a BioOrganikus Kutatócsoport minden tagjának, valamint családomnak, amiért támogattak munkám során.

7. Irodalomjegyzék

1. L. Boross, Cs. Sisak, B. Szajáni, Szilárd fázisú biokatalizátorok, *Akadémia Kiadó*, Budapest, **2008**
2. Cs. Sisak, Zs. Csanádi, B. Szajáni, *Magyar Kémiai Folyóirat - Összefoglaló közlemények*, **2007**, 113 évfolyam, 3. szám, 91–101.
3. M. A. Keller, A. V. Turchyn, M. Ralsler, *Molecular Systems Biology*, **2014**, 10, 725.
4. L. John Kennedy, P. K. Selvi, A. Padmanabhan, K. N. Hema, G. Sekaran, *Chemosphere*, **2007**, 69, 262–270.
5. L. Wunderlich, A. Szarka, A biokémia alapjai, *Typotex*, Budapest, **2013**
6. B. Sevelle, Biomérnöki műveletek és folyamatok, *Typotex*, Budapest, **2011**
7. A. Szarka, Biokémia II., *Typotex*, Budapest, **2014**
8. K. László, A. Grofcsik, M. Kállay, M. Kubinyi, Fizikai kémia I. – Kémiai termodinamika, *Typotex*, Budapest, **2012**
9. L. Poppe, L. Novák, „*Selective Biocatalysis – A Synthetic Approach*”, Wiley-VCH, Weinheim, **1991**.
10. M.G. Kulkarni, A. K. Dalai, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2006**, 45, 2901–13.
11. M. Inagaki, J. Hiratake, T. Nishioka, J. Oda, *Journal of the American Chemical Society*, **1991**, 113, 9360–9361.
12. A. M. Klibanov, *Accounts of Chemical Research*, **1990**, 23, 114–120.
13. A. Zaks, A. M. Klibanov, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1985**, 82, 3192–3196.
14. K. Bagi, L. M. Simon, B. Szajáni, *Enzyme and Microbial Technology*, **1977**, 20, 531–535.
15. A. Tomina, D. Weiser, G. Hellner, Zs. Bata, L. Corici, F. Péter, B. Koczka, L. Poppe, *Process Biochemistry*, **2011**, 46, 52–58.
16. A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, 409, 258–268.
17. K. E. Jaeger, T. Eggert, *Current Opinion in Biotechnology*, **2002**, 13, 390–397.
18. Z. Boros, P. Falus, M. Márkus, D. Weiser, M. Oláh, G. Hornyánszky, J. Nagy, L. Poppe, *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, **2013**, 85-86, 119–125.
19. L. Cao, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2005**, 9, 217–226.

20. A. Jain, V. Ong, S. Jayaraman, R. Balasubramanian, M. P. Srinivasan, *The Journal of Supercritical Fluids*, **2015**, online elérhető
21. P. Raveendran, Y. Ikushima, S. L. Wallen, *Accounts of chemical research*, **2005**, *38*, 478–485.
22. F. Montagnaro, A. Silvestre-Albero, J. Silvestre-Albero, F. Rodríguez-Reinoso, A. Erto, A. Lancia, M. Balsamo, *Microporous and Mesoporous Materials*, **2015**, *209*, 157–164.
23. G. Öllös, M. Szilágyi, *Csatornamű Információ*, **1996**, *3*, 4–12.
24. F. Faigl, A. Thurner, M. Battancs, F. Farkas, L. Poppe, V. Bódai, I. Kmezc and B. Simándi, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, *Volume 16, Issue 23*, 3841–3847.
25. S. Pickup, F. D. Blum, W. T. Ford, M. Periyasamy, *Journal of the American Chemical Society*, **1986**, *108*, 3987–3990.
26. P. Hodge, *Chemical Society Reviews*, **1997**, *26*, 417–424.
27. F. Z. Dörwald, *Organic Synthesis on Solid Phase*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**
28. S. Rana, P. White, M. Bradley, *Journal of Combinatorial Chemistry*, **2001**, *3*, 9–15.
29. A. Johansson, K. Mosbach, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1974**, *370*, 339–347.
30. G. Manecke, H. G. Vogt, *Biochimie*, **1980**, *62*, 603–613.
31. Ö. Wagner, P. Hencsei, *Bioszervetlen kémia*, *Műegyetemi Kiadó*, **2001**
32. P. Hencsei, Ö. Wagner, *Biokatív szilíciumvagyületek és szilikonok alkalmazása a gyógyászatban*, *Műegyetemi Kiadó*, **1994**
33. T. Gitlesen, M. Bauer, P. Adlercreutz, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1997**, 188–196.
34. Z. Boros, E. Abaházi, M. Oláh, P. Sátorhelyi, B. Erdélyi, L. Poppe, *Chiral Technologies - chimica oggi/Chemistry Today*, **2012**, *30*, 28–31.
35. Z. Boros, D. Weiser, M. Márkus, E. Abaházi, Á. Magyar, A. Tomin, B. Koczka, P. Kovács, L. Poppe, *Process Biochemistry*, **2013**, *48*, 1039–1047.
36. A. M. Klibanov, *Analytical Biochemistry*, **1979**, *93*, 1–25.
37. T. Godfrey, J. Reichelt. *Industrial enzymology: The application of enzymes in industry*, *Macmillan Ltd.*, London, **1983**
38. I. Hegedűs, E. Faragó, M. Kálmán, E. Nagy, *Műszaki szemle*, **2011**, *56*, 10–20.
39. K. Iwasaki, M. Nakajima, H. Sasahara, *Process Biochemistry*, **1993**, *28*, 39–45.
40. T. Godjevargova, R. Nenkova, V. Konsulov, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2006**, *38*, 59–64.

41. I. Chibata, T. Tosa, K. Yamamoto, I. Takata, *Methods in Enzymology*, **1987**, *136*, 455–463.
42. Cs.Csajági, G. Sztzker, E. R. Tőke, L. Üрге, F. Darvas, L. Poppe, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 237–246.
43. L. Poppe, L. Novák: *Selective Biocatalysis: A Synthetic Approach*, Wiley, New York, **1992**