



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar

Új mágneses nanobiokatalizátorok

TDK dolgozat

Juhász Viktória Judit

BSc hallgató

Témavezető

Prof. Dr. Poppe László

Weiser Diána

2015

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	2
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. Enzimek	4
2.2. Lipázok	5
2.2.1. Az egyik legsokoldalúbb lipáz, a <i>Candida antarctica</i> B.....	6
2.3. Enzimrögzítési technikák.....	6
2.4. Mágneses nanorészecskék mint enzimhordozók	8
2.4.1. Mágneses nanorészecskék előállítása.....	10
2.5. A szol-gél eljárás enzimek rögzítésére	12
3. Kísérleti leírás.....	14
3.1. Alkalmazott anyagok.....	14
3.2. Alkalmazott készülékek.....	14
3.3. Módszerek.....	15
4. Eredmények.....	18
4.1. Mágneses nanorészecskék előállítása.....	18
4.2. A mágneses nanorészecskék bevonása.....	22
4.3. Enzimrögzítés funkcionális mágneses nanorészecskéken.....	25
4.3.1. A mágneses nanorészecske méretének hatása az enzim rögzítésére.....	30
4.3.2. A rögzítés hőmérsékletének hatása	31
4.4. Enzimrögzítés kompozitban – mágneses nanorészecskéhez kötés és szol-gélbe zárás ötvözése.....	32
4.4.1. Kompozit rendszerek hőstabilitása	35
4.5. Az új mágneses nanobiokatalizátorok alkalmazása alkoholok észterezésében	36
5. Összefoglalás.....	39
Irodalomjegyzék.....	40

1. Bevezetés

A dinamikusan fejlődő iparágak egyre hatékonyabb, fenntartható és környezetbarát technológiákat követelnek meg, és ezzel a növekvő igénnyel a biotechnológiának lépést kell tartania. Ebben nyújthatnak segítséget a korszerű biokatalizátorok [1].

Az enzimek kedvező tulajdonságait évezredek óta kihasználja az ember élelmiszerek előállítására, ma már azonban szintézisekhez és más ipari eljárásokhoz is sikeresen alkalmazzuk őket [2]. Sok esetben enzimkatalizált eljárással lényegesen kedvezőbb reakciókörülmények között, hatékonyabban lehetséges enantiomertiszta vegyületek előállítása, mint a klasszikus szintetikus útvonalak alkalmazásával. Ennek okán napjainkban az enzimeknek nagyobb szerep jut a gyógyszeripar optikailag tiszta hatóanyagainak, illetve köztitermékeinek biokatalizált módon történő előállításában [3,4]. A legtöbb enzimet oldott fázisú, homogén rendszerekben alkalmazzák, azonban izolálásuk a reakcióelegyből igen nehézkes, visszaforgatásuk, regenerálásuk szinte lehetetlen. Komoly problémát jelenthet emellett, hogy a sok esetben az oldott enzim nehezen tolerálja az adott reakció, szintézisút körülményeit, így aktivitását, szelektivitását idejekorán elveszítheti. Ezekre a problémákra megfelelő megoldást jelenthetnek a különböző enzimrögzítési technikák [5– 8].

Az enzimek rögzítéséhez gyakran alkalmaznak különböző szilárd hordozókat, melyekkel szemben elvárás, hogy legyenek inertek, biokompatibilisek, könnyen elérhetőek, és legyenek kémiaiilag stabilak [9,10]. A modern biotechnológia eszköztárában egyre nagyobb teret hódítanak az úgynevezett nanoanyagok. Különösen nagy lehetőség rejlik a nanoméretű vas-oxid alapú hordozókban, amelyek méretükből fakadóan nagy fajlagos felülettel rendelkeznek, felszínük módosítható, különlegessé pedig mágnesezhető tulajdonságuk teszi őket, ami jelentősen megkönnyíti a fázisszeparációs műveleteket [11,12].

A mágneses nanorészecskék felületére közvetlenül történő enzimrögzítésre számos példa létezik. Azonban sok esetben gondot okoz a részecskék aggregációja, illetve az enzim nem kellően stabilis, vagy kedvezőtlen konformációban történő rögzülése. [13,14].

Célkitűzés

TDK munkám célja olyan mágneses, nanoméretű részecskék szintézise és felületi funkcionálása, amelyek alkalmasak lehetnek enzimmolekulák eredményes és stabil immobilizálására. Részletesen foglalkoztunk a mágnesezhető nanorészecskék méretének, a funkciós csoportok felületi elhelyezkedésének és az enzimrögzítés körülményeinek optimalizálásával. Az enzimrögzítési kísérletekhez egy gyógyszeriparban is releváns enzimet, a *Candida antarctica* B lipázt alkalmaztuk. Az így létrehozott mágneses nanobiokatalizátorokat dinamikus fényszóródás mérés, pásztázó elektronmikroszkóp és energiadiszperzív röntgenspektroszkópia segítségével jellemeztük. Az enzimkészítmények képességeit racém alkoholok szelektív acilezési reakciókban vizsgáltuk, az enzimkészítmények biokatalitikus aktivitását és szelektivitását királis állófázisú gázkromatográfia segítségével határoztuk meg.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Enzimek

Az enzimek – klasszikus definíciójuk szerint – katalizátorok: olyan molekulák, amelyek az élő szervezetek kémiai folyamatainak lefolyását segítik elő. Döntő többségük fehérje, de léteznek RNS enzimek (ribozimek), illetve fehérjéhez kapcsolt RNS enzimek (például riboszómák) is. A katalitikus tulajdonság azt jelenti, hogy ezek a molekulák termodinamikailag lehetséges reakciók aktiválási energiáját csökkentik anélkül, hogy megváltoztatnák a folyamat irányát. Erre azért van szükség, mert a metabolizmushoz nélkülözhetetlen folyamatok fiziológiás körülmények között (általában 30 °C körüli hőmérséklet, 1 bar körüli nyomás, semleges pH , vizes oldatok) sokszor csak végtelenül lassan zajlanának le [5,15].

A fehérjetermészetű enzimekre korlátozva az ismertetést, ezek a molekulák egy vagy több fehérjeláncból álló, természetes aminosavakból felépülő lineáris polimerek [16]. A katalízis pontos molekuláris mechanizmusát nem ismerjük, az azonban általánosan elfogadott, hogy a molekuláknak van egy aktív centruma, ami szubsztrátkötő- és katalitikus helyből áll. Előbbihez tud kapcsolódni – nagyon specifikus módon – az adott (típusú) molekula, és utóbbiban történik az átalakítás. Az aktív centrum az enzim molekulának csak egy kis része, melynek háromdimenziós szerkezetét a fehérjeláncban egymástól akár nagyon távol eső aminosavak alakítják ki. A szubsztrát-enzim-kötődésben a kovalens kölcsönhatások mellett egyéb (H-híd, ionos, van der Waals, stb.) kötések is szerepet játszhatnak. Az aktív centrumok hasadékok vagy rések, amelyek csak nagyon ritkán polárisak, a vízmolekulák többnyire kizáródnak belőlük [17]. A fentiek miatt nyilvánvaló, hogy az enzim molekulák szerkezetét csak nagyon óvatosan lehet módosítani, a hordozókhöz való kötésnél különös tekintettel kell lenni arra, hogy a katalízishez nélkülözhetetlen aminosavakat ne rögzítsük, az aktív centrum működését ne változtassuk.

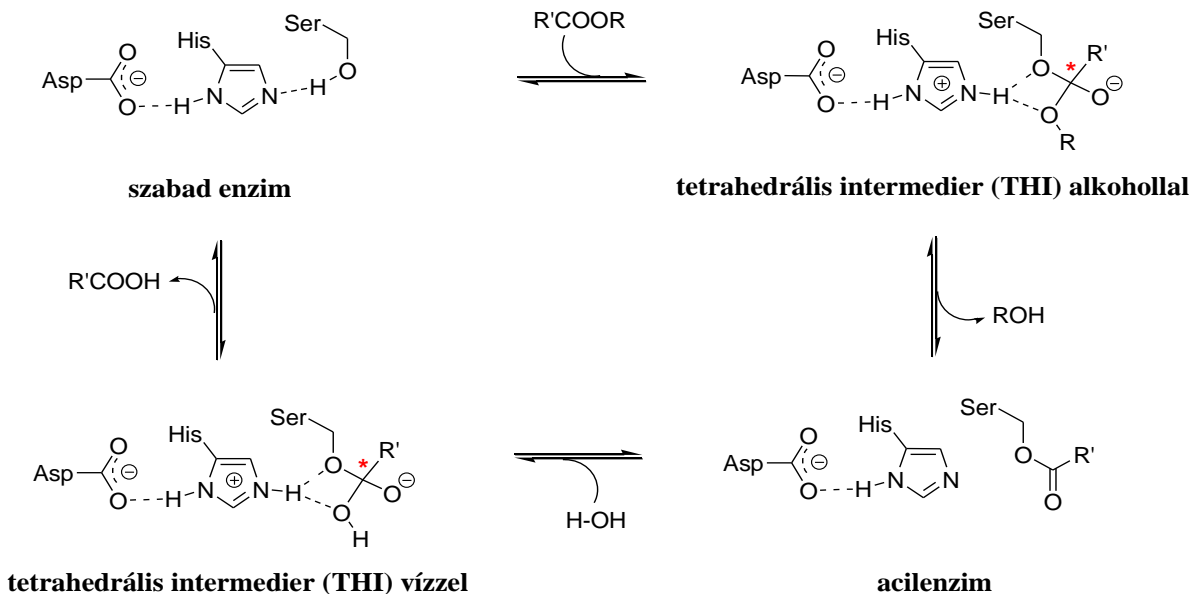
Szintén fontos a körülmények megválasztása, ugyanis az enzimaktivitást nagymértékben befolyásolják olyan külső tényezők, mint a pH , a hőmérséklet és a fémionok. A hőmérsékletfüggésre igaz, hogy a reakciósebesség az Arrhenius-egyenlet szerint a hőmérséklet növelésével nő, majd a hődenaturáció miatt elkezd csökkenni [18].

Az enzimek talán legjelentősebb tulajdonsága a specifikusságuk. Előnyben részesíthetnek egy adott típusú funkciós csoportot vagy reakciót, képesek lehetnek optikai izomereket szétválasztani (sztereospecifitás), lehetnek régióspecifikusak, vagy akár egyetlen szubsztrátot átalakítók is [5].

2.2. Lipázok

A lipázok zsírbontó (lipolitikus) enzimek, észterkötések hidrolízisére képesek. Az élő szervezetben is megtalálhatók, de a biotechnológiában is széles körben alkalmazzák őket. Elsősorban a glicerín zsírsavakkal képzett hármassztereit, a triglicerideket bontják zsírsavakra és glicerinre, de észterezési és acilezési reakciókat is katalizálnak [19]. Előállítanak belőlük gyógyszereket, emésztést elősegítő pankreászlipáz-pótló készítményeket, a sajtoknál ízjavítóként alkalmazhatók (*P. raquefartii* spóra), a *Candida* lipázokat a mosószer- és szappanipar is használja, illetve felhasználják őket szintézisekben, átészterezési és észterképzési reakciókban, rezolválásokban. A biotranszformációk nagy hányadát lipázok segítségével hajtják végre, mivel enantiomerszelektívek, könnyen hozzáférhetőek, az ipar olcsón és viszonylag egyszerűen állítja elő őket, illetve nem igényelnek kofaktorokat a működésükhöz. Leghatékonyabban emulziókban, zsír és víz határfelületén működnek, azaz a katalízis heterogén. Aktivitásuk általában lúgos közegben maximális: optimális pH-juk 7,0 és 8,8 között van. Hőmérsékleti optimumuk 30 – 40 °C. A legfontosabb lipáztermelő mikroorganizmusok az *Aspergillus*, a *Mucor*, a *Rhizopus*, és a *Candida* nemzetségek [20].

A lipáz enzimek működése során a szerin nukleofil támadással addíciónál az észter karbonilcsoportjára, majd a kilépő alkohol távozásával kialakul az acil-enzim. A belépő alkohollal ezután tetrahedrális intermedier (THI) képződik (1. ábra), amely átmenetileg új aszimmetriacentrum kialakulását okozza.



1. ábra Lipázok működésének mechanizmusa [21]

2.2.1. Az egyik legsokoldalúbb lipáz, a *Candida antarctica* B

A *Candida antarctica* B lipáz (CaL B) a hidrolázok családjába tartozó, 342 aminosavból felépülő, 33 kDa molekulatömegű enzim [22]. Szerkezetét tekintve egy monomer, konzervált belső struktúrával, melyet egy 8 szálú, többnyire párhuzamosan csavart elhelyezkedésű β -redő alkot, amihez oldalról α -hélixek kapcsolódnak. A katalitikus helyet egy aminosav-triád (Ser-His-Asp/Glu) alkotja, a szubsztrátkötőhelyen pedig acilcsoport és másodlagos alkoholok tudnak kapcsolódni [23].



2. ábra CaL B szerkezete egy szubsztrát analóg jelenlétében

Az enzim a hőmérséklet és a pH változásait jól tűri, szubsztrátjait nagyfokú specifitással, jó minőségben, minimális melléktermék képzésével, hatékonyan tudja átalakítani. Kedvező tulajdonságai miatt széles körben alkalmazzák, például aminolízishez, észterezéshez és átészterezéshez, glikolipidek szintéziséhez, enantiomer- és régiószelektív biotranszformációkban, vízben és szerves oldószerekben is [24].

Mivel vízoldható, az iparban megkövetelt hosszú távú stabilitás érdekében kívánatos az enzim rögzítése. Számos kísérlet alapján a CaL B alkalmas arra, hogy szilárd hordozóhoz rögzítsük [23]. A lipáz immobilizált formája ideális biokatalizátornak tűnik racém alkoholok és aminok szakaszos és folyamatos üzemben végzett kinetikus rezolválására.

2.3. Enzimrögzítési technikák

Az enzimek általában vízoldhatóak, vizes rendszerben könnyen alkalmazhatók. Ennek azonban számos hátránya van, ugyanis ilyenkor az enzim szennyezheti a terméket, valamint visszanyerése drága és nehézkes. A reakciókörülmények helytelen megválasztása a biokatalizátorok aktivitásának, stabilitásának csökkenéséhez, akár elvesztéséhez is vezethet [5].

A rögzített enzimek esetén is előfordulhat aktivitáscsökkenés, azonban a legtöbbször így is érdemes a katalizátorokat heterogén rendszerben alkalmazni. A hatékony immobilizálás

lehetővé teszi az enzimek többszöri felhasználását, így nagy mennyiségben, gazdaságosan alakíthatunk át szubsztrátokat, és egyszerűsödik a terméktől való elválasztás. Nagy előnyt jelenthet, hogy a rögzített enzimek folytonos üzemű reaktorokban is alkalmazhatók, és a reakciót bármikor egyszerűen le lehet állítani az enzim és a szubsztrát kontaktusának megszüntetésével. Az immobilizált enzimek gyakran stabilabbak az oldottaknál, a megfelelő rögzítés növelheti a pH- és hőstabilitásukat, egy stabilis szilárd rögzítési forma pedig a biokatalizátor mechanikai ellenállóképességét is fokozhatja. A rögzített készítmények tárolása, eltarthatósága és kezelése is sok esetben könnyebb, mint az oldatban lévő formáé [25,26].

Az enzimrögzítési módszereket osztályozhatjuk a hordozó típusa, vagy az enzim és a hordozó között kialakuló kötés jellege szerint. Ez utóbbi alapján fizikai és kémiai módszereket foglalja össze az alábbi táblázat. [27,28]

1.Táblázat Enzimrögzítési módszerek osztályozása

Kémiai módszerek			Fizikai módszerek		
	✓	x		✓	x
Kovalens kötés hordozóhoz	stabil, egyszerű	csökkent aktivitás	Adszorpció	egyszerű, gyors, hatékony	deszorpció
Keresztkötések (CLEAs)	egyszerű, olcsó, univerzális	gyenge stabilitás	Gélbe zárás	stabil, magas védettség	gátolt diffúzió
Egyedi enzim nanorészecskék (SEns)	nanoformula, stabil	drága, bonyolult	Szol-gélbe zárás	stabil, magas védettség	gátolt diffúzió

A számos enzimrögzítési technika közül sok esetben kiválaszthatóak az adott alkalmazáshoz leginkább megfelelő eljárások. A kovalens kémiai kötések révén kialakuló rögzítés igen stabil kapcsolatot jelent az enzimmolekula és a hordozó között, ezáltal az enzim a szilárd hordozóval együtt könnyedén izolálhatóvá válik a reakcióelegyből. Hátrányos lehet azonban, ha a kovalens kötődés az enzim olyan szerkezeti elemeit is érinti, amely fontos szerepet játszik a biokatalízis végbemenetelében. Ennek negatív következménye lehet az enzim aktivitás- és/vagy szelektivitáscsökkenése. A keresztkötések létrehozása során szintén erős kovalens kötések alakulnak ki bifunkciós reagensek révén enzim molekulák között (Keresztkötött enzimaggregátumok, Cross Linked Enzyme Aggregates – CLEAs) [29]. Fontos kiemelni, hogy bár a kémiai rögzítések közé sorolható ez a technika, de a rögzített

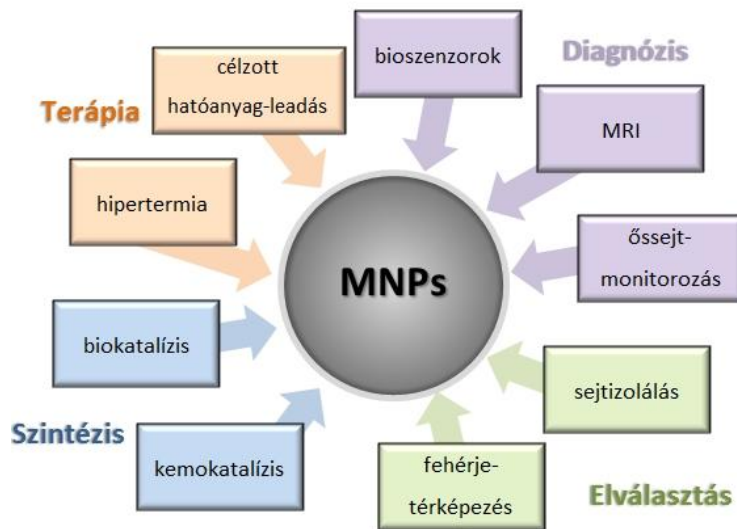
enzimkészítmény kizárólag egymással összekapcsolt enzimmolekulákból áll, szilárd hordozó nélkül. Ebből kifolyólag, bár a magas enzimtartalom révén igen jó biokatalitikus aktivitások érhetőek el, a csupán fehérjéből felépített rögzített enzymkészítmény stabilitása gyenge, mechanikai sajátságai kifejezetten kedvezőtlenek. Újdonságnak számítanak az ún. egyedi enzim nanorészecskék (Single Enzyme Nanoparticles – SENs), melynek nagy előnye, hogy egy enzimmolekulát tartalmazó polimer nanorészecske rendkívül kis méretéből adódóan új lehetőségeket jelenthet a fehérjék terápiás célokra történő alkalmazásaiban [30]. A módszer hátrányos oldala a bonyolult eljárásban mutatkozik meg, mely során az enzimmolekula bizonyos régióit kémiai úton módosítják, majd a módosító csoportokon kiindulva egy komplett polimerizációt hajtanak végre az enzim felületén. A módosítások gyakran a fehérjeszerkezet megváltozásához vezethetnek, amely sok esetben kedvezőtlen.

A fizikai módszerek gyengébb, másodlagos kötések révén (például ionos kölcsönhatás, Van der Waals kötés, H-hidas kötés) rögzítik az enzimet a hordozóhoz. A különböző szilárd, pórusos hordozók különösen jól alkalmazhatóak e rögzítési technikákra, megfelelő pórusméret esetén ugyanis kellő számú enzim képes a póruscsatornában rögzülni [31]. A módszerrel könnyen, hatékonyan igen jó rögzülés hozható létre, amennyiben a hordozó fizikai-kémiai és geometriai paraméterei is megfelelőek. Hátrányos azonban, hogy az enzimek könnyedén leoldódhatnak a hordozóról, ami ezáltal a biokatalizátor kimerüléséhez vezethet. A gélbe zárás technikai szintén a népszerű enzimrögzítési technikákhoz sorolható, amely során az enzimeket valamilyen térhálós szerkezetbe, kapszulába zárjuk. A módszer előnye, hogy a gél- illetve térhálóképzés körülményeivel *in situ* befolyásolható az enzimet körülvevő környezet. A bezárt, kapszulába csomagolt enzimek nagyfokú stabilitással rendelkeznek, hiszen az őket körülvevő mátrix képes tompítani a környezeti hatásokat. Ezzel azonban a gátoltabb anyagátadás óhatatlanul együtt jár, így a gélbe zárt készítmények biokatalitikus aktivitása sok esetben alacsonyabb, mint az egyszerű adszorpció révén rögzült készítményé [29].

2.4. Mágneses nanorészecskék mint enzimhordozók

A nanoméretű anyagok közös jellemzője, hogy rendkívül nagy fajlagos felülettel rendelkeznek, ezáltal hatékony hordozó anyagként funkcionálhatnak. A nanorészecskék, bár szilárd anyagok, kis méretükből adódóan jól közelítik a homogén folyadék fázisú reakciókörülményeket, így a különböző transzport folyamatok, anyagátadási folyamatok hatékonyan mehetnek végbe. A nanorészecskék fent említett előnyei révén azonban nehezen izolálhatóak a reakcióelegyből, hiszen ülepítésük, szűrésük sokszor komoly technológiai

kihívást jelenthet. Ezt képes kiküszöbölni a mágnesezhető tulajdonság, hiszen a kisméretű, mozgékony részecskék mágneses erőter hatására könnyedén mozgathatók, irányíthatók, avagy izolálhatók. Ezen előnyös tulajdonságaiknál fogva a mágnesezhető (röviden mágneses) nanorészecskék (Magnetic nanoparticles – MNPs) ígéretesek lehetnek mint hordozók. A modern vegyészmérnöki, biotechnológiai, villamosmérnöki alkalmazási területeken és az orvostudományban kiemelten fontosak (3. ábra) [32– 34].



3. ábra Mágneses nanorészecskék alkalmazási területei

A mágneses nanorészecskék egyre sokrétűbb alkalmazása nagyon jó kiegészítője a modern technikai, diagnosztikai és analitikai eszközöknek is, melyekre egyre erősebben jellemző miniaturizálás.

Enzimek rögzítésére is alkalmasak lehetnek mint szilárd hordozók: megfelelő felületi és geometriai paraméterek esetén a mágneses nanorészecskéhez kötött enzimek jól közelíthetik az oldott fehérjemolekulák viselkedését, ám lényegesen könnyebben elválaszthatók az alkalmazott közegtől [35]. Segítségükkel sikeresen végezhetők el kemo- illetve sztereoselektív reakciók [36]. A mágneses nanorészecskékre rögzített biokatalizátorok alkalmazásában különösen sok lehetőség rejlik, ezért napjainkban számos kutatás és kísérlet zajlik ezekkel kapcsolatban. Kitozánréteggel bevont mágneses nanorészecskékhez rögzített lakkáz enzimekkel például megvalósítható bizonyos szennyezőanyagok bioremediációja, a vércukorszintmérésben is használt glükóz-oxidáz enzimet is lehet nanohordozókhöz rögzíteni, és vas-oxid részecskéknek – melyekkel részletesen foglalkoztunk – is számos alkalmazási területe van. Ezek közül néhányat a 2. táblázat mutat be [37,38].

2. Táblázat Példák mágneses nanorészecskékhez rögzített enzimekre

Enzim	Alkalmazás
koleszterin-oxidáz	koleszterinszint meghatározása [39]
keratináz	keratin szintézise [40]
α -amiláz	keményítő bontása [41]
haloalkén-dehalogenáz	dehalogenáz szekvenciát tartalmazó proteinek előállítása [42]
lipáz	királis gyógyszerhatóanyagok megfelelő izomerjének előállítása [43]

2.4.1. Mágneses nanorészecskék előállítása

A biotechnológiában, orvosbiológiában széles körben használt vas-oxid alapú hordozók a Fe_3O_4 -részecskék. A Fe_3O_4 – más néven magnetit, mágnesvaskő vagy mágnesvasérc – fekete színű vasércásvány. A vas II-es illetve III-as oxidációs számmal van jelen benne, úgynevezett vegyes oxid. Magnetitből a későbbiekben ismertetett módszerekkel viszonylag egyszerűen és sikeresen állíthatók elő nanorészecskék, melyek a szervezetben le tudnak bomlani, mágneses tulajdonsággal rendelkeznek, és felületük bevonható, ami alkalmassá teszi őket arra, hogy immobilizált enzimek hordozói legyenek.

Mivel a mágneses nanorészecskék mérete és alakja meghatározó az enzimrögzítés szempontjából, számos módszert dolgoztak ki a szintézisükre, melyeket folyamatosan finomhangolnak a lehető legegységesebb, megfelelő morfológiájú részecskék előállítása érdekében. Régebbiek a fizikai, úgynevezett „top-down” szintézisek, melyek lényege, hogy a szintézis felülről lefelé, a makro- illetve mikroszkopikus méret felől történik a nano mérettartomány felé. Ilyen technika például az őrlés nanomalmok segítségével, a LASER pirolízises aprítás, az ultrahangos besugárzás vagy a litográfias lebontás. Ezek a módszerek sok esetben bonyolultak, költségesek, valamint az előállított nanorészecskék méreteloszlása és alakja sem teljesen egységes [44].

A tradicionális megközelítéssel szemben hamarosan megjelentek a „bottom-up” módszerek, amelyek nanotechnológiai szemszögből, az atomok, molekulák szintjéről építkezve haladnak a nanoméretű részecskék felé. Az ilyen kémiai úton történő előállítások sokkal kézbe tarthatóbbak, lényegesen egyszerűbbek, mint a fizikai módszerek, és egységesebb részecskék állíthatóak elő a segítségükkel [45,46]. A legfontosabb „bottom-up” szintéziseket és tulajdonságaikat a 3. táblázat foglalja össze.

3. Táblázat Mágneses nanorészecskék előállítására szolgáló módszerek [47– 51]

	ko-precipitációs módszer	mikroemulziós módszer	szolvo-termál módszer	szol-gél módszer
kivitelezés	nagyon egyszerű	bonyolult	egyszerű	egyszerű
méreteloszlás	széles	szűk	nagyon szűk	széles
morfológia kontrollálhatósága	nehézkés	könnyű	nagyon könnyű	nehézkés
hőmérséklet	20-90 °C	20-50 °C	160-300 °C	40-400 °C
nyomás	légköri	légköri	kisfokú túlnyomás	légköri
reakcióközeg	vizes	vizes/szerves	szerves	vizes
reakcióidő	percek	órák	órák	órák
kitermelés	magas	alacsony	közepes	közepes

A bemutatott módszerek közül a ko-precipitációval és a szolvo-termál eljárással foglalkoztunk részletesen. Előbbi a legelterjedtebb a kémiai úton megvalósított szintézisek közül. A módszer $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$ ionok 1:2 molarányú vizes oldatából indul ki, leggyakrabban alkalmazott kiindulási alapanyagai a $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ és a $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$. Ehhez bázikus anyag adagolásának hatására (mely leggyakrabban NH_4OH vagy NaOH vizes oldata) a reakcióelegyből fekete csapadék formájában vas-oxid részecskék válnak ki. A keletkezett részecskék tulajdonságait számos körülmény befolyásolja. Az alak, a méret és az összetétel is függ attól, hogy milyen sókat használunk prekursorként. A Fe^{2+} és a Fe^{3+} arányát a keletkezett szemcsékben meghatározza az oldat pH -ja és a reakcióközeg minősége. A pH értéktől a részecskék mérete is függ, amit még az ionerősség, a hőmérséklet és a kevertetés intenzitása is befolyásolhat [48].

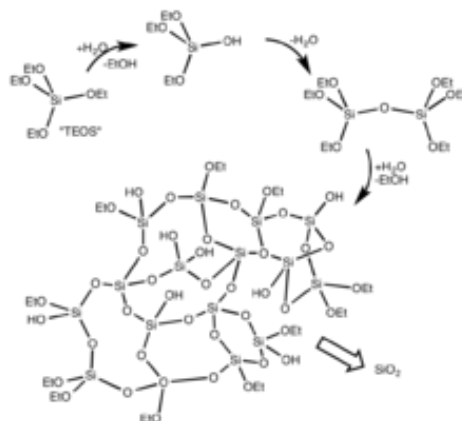
Ezt a fajta szintézist akkor érdemes választani, ha a részecske méreteloszlásával, morfológiájával szemben nincsenek szigorú elvárásaink, mivel a módszer gyors, egyszerű és

olcsó, viszont az említett tulajdonságok nehezen kontrollálhatók. Az eljárás további hátránya, hogy segítségével csak kis mennyiségű vas-oxid állítható elő egyszerre, valamint a reakció során képződő részecskék mérete sem kellően egységes.

A szolvo-termál eljárás során a vizes fázisú ko-precipitációval ellentétben szerves közegben alakulnak ki a mágneses tulajdonságú nanorészecskék. A kiindulási anyag ebben az esetben vas(III)-só, a szerves közeg pedig valamilyen magas forráspontú poliol. A részecskék nátrium-acetát jelenlétében, magas hőmérsékleten jönnek létre. A poliol szerepe sokrétű: oldószerként és redukálószerként is funkcionál, valamint fizikai-kémiai tulajdonságai befolyásolják a képződő részecskék méretét és morfológiáját. A hőmérséklet és a reakcióidő is hatással van a keletkező szemcsék tulajdonságaira. Ezzel a módszerrel általában monodiszperz rendszer jön létre, a körülmények optimalásával a kívánt méretű, szűk méreteloszlású nanorészecskéket tudunk szintetizálni [32,33]. Ez különösen fontos, ha olyan területen szeretnénk a részecskéket felhasználni, ahol fontos az egységes, jól definiálható készítmények előállítása, például biomedicinák esetében. Mivel a módszer mellett, hogy egységes terméket eredményez, viszonylag könnyen is kivitelezhető, ezért megfelelő lehet enzimek immobilizálására alkalmas mágneses nanorészecskék előállítására.

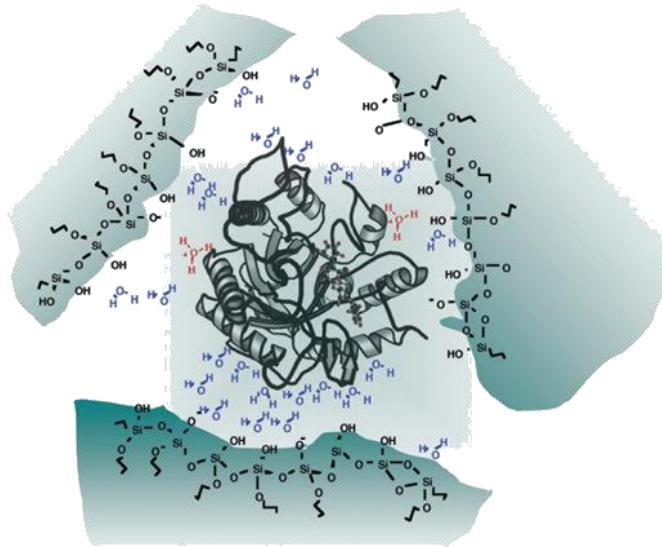
2.5. A szol-gél eljárás enzimek rögzítésére

A szol-gél módszer során kezdetben folyadék közegből olyan szilárd közeget alakítunk ki, amely képes az enzimet magába zárni. Egy tipikus szol-gél immobilizációs folyamat két szakaszból áll: az első lépésben stabil kolloid rendszert (szolt) állítanak elő a prekursor molekulák sav- vagy báziskatalizált hidrolízisével, ezt követően egy kondenzációs lépés jön, melynek végére egy még jelentős folyadékmennyiséget tartalmazó polimer mátrix (gél) képződik (4. ábra).



4. ábra A szol-gél képződés folyamata

A rendszer a megfelelő szárítási, öregítési eljárások után éri el végső, felhasználásra alkalmas állapotát [49]. A rögzítendő enzimet az első lépésben kialakuló szolhoz adják hozzá, majd a megfelelő ideig hagyják lezajlódni a gél képzést. Végeredményben egy szilárd térhálós anyag alakul ki, amely belsejében konzerválja az enzim molekulákat (5. ábra) [25,50].



5. ábra Szol-gél rögzített enzim sematikus rajza

A bezáráson alapuló rögzítés kedvezően hat a fehérjék stabilitására, felhasználhatósági és eltarthatósági idejükre, hiszen a körülöttük *in situ* kialakuló mátrix képes lehet a környezeti behatások ellen hatékony védelmet biztosítani az enzim számára. Az szol-gél rögzítés során leggyakrabban előforduló prekursorok az ún. organoszilánok, ezen belül is a tetraalkoxiszilánok $[\text{Si}(\text{OR})_4]$ és ezek szerves csoporttal módosított származékai $[\text{R}'\text{-Si}(\text{OR})_3]$. Az eddigi kutatások eredményei alapján elmondható, hogy bizonyos segédanyagok jelenléte, mint például a PEG, polihidroxi vegyületek, vagy fehérjék, jelentősen fokozzák ezen enzimkészítmények katalitikus aktivitását [51].

3. Kísérleti leírás

3.1. Alkalmazott anyagok

A kísérletekhez az Alfa Aesar, a Fluka, a Merck, a Molar Chemicals és a Sigma-Aldrich által forgalmazott termékeket használtunk fel. Vegyszerek és oldószerek: FeCl_2 (vízmentes), $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 (vízmentes), sósav, ammónia oldat (35 %-os vizes oldat), tetraetoxiszilán (TEOS), feniltrimetoxiszilán (PTMOS), 3-glicidoxipropiltrimetoxiszilán (GTMOS), feniltriethoxiszilán, propiltriethoxiszilán, 3-glicidoxipropiltriethoxiszilán, viniltriethoxiszilán, 3-aminopropiltriethoxiszilán, nátrium-foszfát-monohidrát, dinátrium-foszfát-heptahidrát, nátrium-acetát, etilénglikol, polietilén-glikol 400 (PEG 400), polietilén-glikol 1000 (PEG 1000), polietilén-glikol 4000 (PEG 4000), polietilén-glikol 8000 (PEG 8000), 2-propanol, etanol, *rac*-1-feniletanol, *n*-hexán, *terc*-butil-metiléter, vinil-acetát, *rac*-1-fenil-2-propanol, *rac*-2-heptanol, trisz-(hidroximetil)-amino-metán (TRIS), nátrium-fluorid, Bradford-reagens.

A rögzítési kísérletekhez használt enzim a *Candida antarctica* B lipáz liofilizált enzimkészítmény (CaL B) a C-Lecta cégtől került beszerzésre. A kereskedelmi forgalomban kapható rögzített CaL B, a Novozyme 435® a Novozyme terméke, a Chiral Vision Immobed T2-150® pedig a Chiral Vision terméke.

3.2. Alkalmazott készülékek

DLS:

A részecskeméret analíziséhez Brookhaven DLS fényszórásmérő berendezést alkalmaztunk. A mintákat ultrahangozás segítségével etanolban diszpergáltuk, majd a stabil szuszpenziót 25°C-on, 488 nm hullámhosszú lézerténnyel sugároztuk be. A besugározott részecskéket a fényszóródás jelenségén alapulva vizsgáltuk a szórt fény detektálásával, amelynek jellemzőiből a vizsgált részecskék tulajdonságaira lehet következtetni. A DLS mérés a szórt fény időbeli intenzitásváltozásának vizsgálata, autokorrelációs függvényének felvételével és analizálásával. A fényszóródás jellege nagyban függ a részecske méretétől. Ha a fotonnal besugárzott részecske nano mérettartományba esik, akkor Reyleigh-szórás jelentkezik, míg a nagyobb, mikrométeres részecskék esetében már inkább a Mie-szórás figyelhető meg.

SEM-EDS:

A részecskék külső megjelenésének és méretének képszerű vizsgálatát pásztázó elektronmikroszkóppal, L JSM JEO -5500LV SEM-EDS készülékkel végeztük. A

mikroszkóp rendelkezik energiadiszipatív analízátorral (EDS/EDX/EDAX) és környezeti (ESEM) üzemmóddal, mely energiadiszipatív röntgen-analízátorral is fel van szerelve.

A mintaelőkészítés során a mintákat kétoldalú karbonszalaggal rögzítettük a készülékbe helyezhető hengerekre, majd a jobb képalkotás érdekében porlasztókészülék segítségével arany nanofilmel vontuk be a mintákat. Az EDAX méréshez a mintaelőkészítések során nem alkalmaztunk vákuumporlasztást, mivel az így felvitt aranybevonat módosítja a minta elemösszetételét. A felvételeket nagyvákuum üzemmódban készítettük el.

UV-VIS:

A fehérjetartalom méréséhez Spectronic Genesys 2 típusú UV-spektrofotométert alkalmaztunk. A készülék segítségével Bradford módszert alkalmazva $\lambda=595$ nm hullámhosszon határoztuk meg a fehérje koncentrációját termosztált körülmények között.

GC vizsgálat

A méréseket Agilent 4890D készülékeken végeztük, Hydrodex- β -6-TBDM (25m \times 0,25 mm \times 0,25 mm film, *t*-butil-dimetilszililezett β -ciklodextrin; Macherey&Nagel), enantiomerszelektív királis állófázist tartalmazó kolonnával. Vivőgázként hidrogént használtunk (fejnyomás 0,83 bar, lefúvatási arány 50:1). Az injektor és a FID detektor hőmérséklete 250°C volt. Hőmérsékletprogram: racém 1-feniletanol [120°C izoterm, 8 perc], racém-1-fenil-2-propanol:[80 °C (5 min), 80–120 °C (2 °C min⁻¹)], racém-2-oktanol [50-150 °C (10 °C min⁻¹)]

3.3. Módszerek

Mágneses nanorészecskék előállítása ko-precipitációs módszerrel

Egy 100 ml-es Erlenmeyer lombikba bemérünk 1,0 ml FeCl₂-oldatot, majd ehhez 4,0 ml FeCl₃-oldatot adunk. A lombikot csapvízzel termosztáljuk. Az elegyet mágnesmag segítségével intenzíven kevertetjük. Ezt követően az elegyhez syringe pumpa (R=50) segítségével 50,0 ml NH₃-oldatot (0,7M) adagolunk. A teljes ammóniaoldat beadagolása után a kevertetést megszüntetjük és a mágneses részecskéket ülepedni hagyjuk.

Mágneses nanorészecskék előállítása szolvo-termál módszerrel

Egy 500 ml-es Erlenmeyer-lombikban 480 ml etilénnglikolban feloldunk 9,75 g FeCl₃ \times 6H₂O-ot erős kevertetés és ultrahangozás segítségével. Ezután az oldathoz adunk 14,4 g Na-acetátot és 12,0 g PEG 4000-et, majd az oldatot kb. fél órán át ultrahangozzuk és kevertetjük addig, míg egy okkersárgás homogén oldatot kapunk. Ezt követően az oldatot 850 ml-es rozsdamentes acél autoklávba töltjük, majd kevertetés mellett a megfelelő

hőmérsékleten és a megfelelő ideig reagáltatjuk. Ezután a mintát mágneses szeparációval, frakciókra szedve desztillált vízzel és etanollal mossuk, majd vegyifülkében állandó elszívás mellett száradni hagyjuk.

Mágneses nanorészecskék bevonása szol-gél módszerrel

200 mg mágneses nanorészecskét és 200 mg PEG 400-at 7,0 ml etanol és 1,0 ml víz elegyében diszpergálunk ultrahang segítségével (10 percen át, melegítés nélkül). Ezt követően 500 µl ammónium-hidroxid oldatot (35 %-os vizes oldat) és megfelelő mennyiségű TEOS prekuzort adunk az elegyhez. A mintát 24 órán át rázatjuk (RT). Ezután desztillált vízzel mossuk, amíg a felülúszó nem lesz neutrális, végül háromszor etanollal mossuk, majd vegyifülkében állandó elszívás mellett száradni hagyjuk.

Mágneses nanorészecskék funkcionálizálása

800 mg TEOS rétegelt mágneses nanorészecskét és 200 mg PEG 400-at 80 ml vízben diszpergálunk ultrahang segítségével (10 percen át, melegítés nélkül). Ezt követően 960 µl PTMOS és GPTMOS prekuzorok megfelelő arányú keverékét 4 ml etanolban oldjuk, majd a szuszpenzióhoz adjuk. A mintát 60 percen át ultrahangozzuk, majd 60 °C-on rázatjuk. Ezután desztillált vízzel mossuk, amíg a felülúszó neutrális nem lesz, végül háromszor etanollal mossuk, majd vegyifülkében elszívás mellett száradni hagyjuk.

Enzimrögzítés

10 mg funkcionálizált felületű mágneses nanorészecskét 1,0 ml Tris pufferben ultrahangozzuk 10 percen át, majd hozzápipettázunk 1,0 ml megfelelő koncentrációjú CaL B-oldatot (Tris pufferben oldva). A mintákat 24 órán át rázatjuk a megfelelő hőmérsékleten. A 24 óra letelte után a mintákat 2x desztillált vízzel, 2x pedig izopropanollal mossuk, majd vegyi fülkében, elszívás mellett száradni hagyjuk őket.

Enzimrögzítés mágneses nanorészecskék és szol-gél módszer kombinálásával

Módszer I.:

120 mg funkcionálizált felületű mágneses nanorészecskét 120 ml Tris pufferben 15 percig ultrahangozzuk. Ezután az elegyhez 12 ml 16 mg/ml koncentrációjú CaL B-oldatot adunk (Tris pufferben oldva). A mintát 24 órán keresztül rázatjuk, majd egyszer vízzel, kétszer izopropanollal mossuk, és hagyjuk megszáradni. Ezután 20-20 mg-ot mérünk ki a készítményből, melyekhez 250 µl izopropanolt pipettázunk, majd a megfelelő összetételű organoszilán-keveréket (csak TEOS esetén 120 µl-t, két prekuzor esetén 60-60 µl-t). Minden mintához 10 µl 1M NaF-oldatot adunk, majd 35 °C-on 24 órán keresztül rázatjuk. A 24 óra letelte után a mintákat egyszer desztillált vízzel, kétszer izopropanollal mossuk.

Módszer II:

Egy 4 ml-es üvegbe 20 mg funkcionizált felületű mágneses nanorészecskét mérünk, és mindegyiket 1,0 ml PEG-Tris pufferben (10 ml Tris és 400 mg PEG 1000 elegye) ultrahangozzuk 15 percen át. Az oldatokhoz egyenként 0,5 ml 64 mg/ml koncentrációjú CaL B-oldatot adunk, és ezt kb. 5 percig rázatjuk. Ezután az első módszerrel analóg módon adjuk a mintákhoz az izopropanolt, az organoszilánokat és a nátrium-fluoridot, majd rázatjuk, mossuk, végül szárítjuk a mintákat.

Rögzített enzimek tesztelése

Minden esetben jól zárható teflonbetétes reakcióedényben 5 mg mágneses enzimkészítményhez hozzáadunk 1050 µl reakcióelegyet. A tesztreakció-elegy összetétele: 600 µl hexán, 300µl *tert*-butil-metiléter, 50 µl szubsztrát, 100 µl vinilacetát. Ezt követően a mintákat termosztálható síkrázógép segítségével rázatjuk (30 °C, ~750 rpm), majd 1 illetve 2 óra elteltével mintát veszünk. A mintavétel során mágnes segítségével üleptjük a részecskéket, majd a felülúszóból 50 µl-nyi mintát veszünk, melyet 1,0 ml etanollal hígítunk. A levett mintákat királis állófázisú GC segítségével vizsgáljuk.

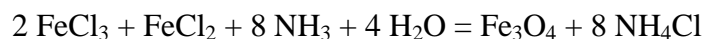
4. Eredmények

TDK munkám célja olyan mágneses tulajdonságú, nanoméretű hordozók szintézise és felületi funkcionalizálása, amelyek alkalmasak lehetnek enzim-molekulák eredményes és stabil immobilizálására. Az irodalomban eddig nem ismert módon, a funkciós csoportokat tartalmazó mágneses nanorészecskékhez történő kovalens enzimrögzítést szol-gél módszerrel is kombináltuk. A két módszer, azaz a kovalens felülethez kötés és a szol-gélbe zárás ötvözése új, nanostrukturált, kompozit rendszereket hoz létre, melyek alkalmasak lehetnek enzimek rögzítésére.

Elsőként a mágneses nanorészecskék előállításának körülményeit vizsgáltuk, amely során az egyik legelterjedtebb módszert, a ko-precipitációs eljárást (avagy együtt lecsapásos technika) és egy újszerű módszert, a szolvo-termális szintézist hasonlítottuk össze. A nanorészecskék szintézise után célunk volt egy olyan felületi bevonat kialakítása, amely kellően képes stabilizálni a mágneses nanorészecskéket, valamint jó alapréteget biztosít a további, enzimrögzítésre alkalmas funkciós csoportok kialakítására. Ezen szempontokat figyelembe véve a részecskék felületén szilícium-dioxid bevonatot képeztünk tetraetoxiszilán prekursor alkalmazásával. Ezt követően a bevont részecskék felületére epoxi-csoportokat vittünk fel, melyek az enzim-molekulákkal kovalens kötésekkel képesek létesíteni. Az ily módon funkcionalizált mágneses nanorészecskéket a *CaL B* enzim immobilizálásban vizsgáltuk. Az így előállított enzimkészítményeket biokatalizátorként alkalmaztuk racém alkoholok szelektív acilezésében.

4.1. Mágneses nanorészecskék előállítása

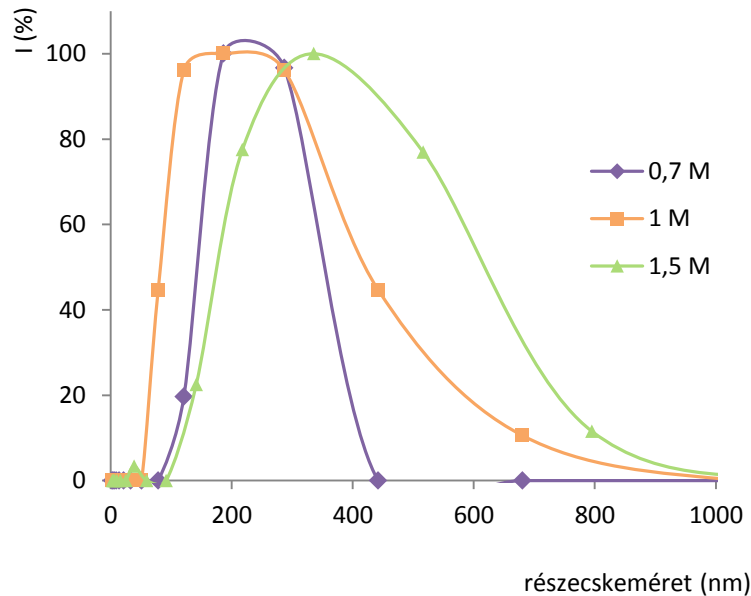
Az irodalomban legelterjedtebb, népszerű módszer a vas-klorid prekursorokból induló ko-precipitáción alapuló eljárás. E reakció során FeCl_2 és FeCl_3 prekursorok 1:2 arányú keverékéből kiindulva a nanorészecskéket a vas vegyes oxidjaként állítottuk elő. A kicsapást vizes ammóniaoldattal végeztük el. A részecskeképzési folyamatot az alábbi egyenlet írja le:



A szintézisek során azt vizsgáltuk, hogy az ammónia mennyisége, adagolási sebessége és a hőmérséklet hogyan hatnak a reakció végkimenetelére és a képződő részecskék méretére.

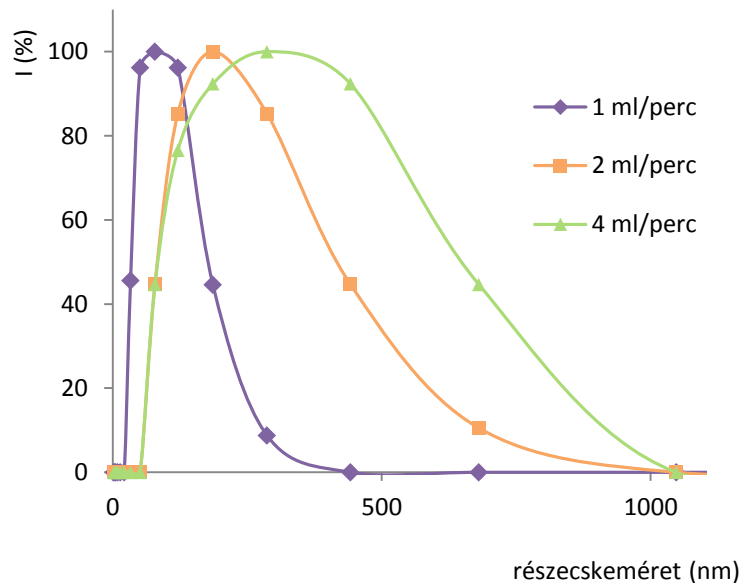
Az ammóniaoldatot (NH_4OH vizes oldat) három különböző koncentrációban juttattuk fecskendőpumpa segítségével a rendszerekbe: 0,7 M-os, 1 M-os és 1,5 M-os koncentrációban, míg az előállítás többi körülményét nem változtattuk. A képződő sötét barnás-fekete szuszpenziók mágnesezhetőnek bizonyultak, a nanorészecskék méreteloszlását dinamikus

fényszóródás mérés (Dynamic Light Scattering, DLS) mérés segítségével vizsgáltuk. Az eredmények azt mutatták, hogy a részecskeátmérő az ammóniakoncentráció növelésével nő, ez látható a 6. ábrán is.



6. ábra Az alkalmazott NH_4OH mennyiségének hatása a képződő nanorészecskék méretére

A diagramon az is látható, hogy a részecskék méreteloszlása mindegyik esetben viszonylag széles intervallumot ölel fel. Ezt magyarázhatja, hogy az ammónia koncentrációját a precipitációk során nehéz állandó értéken tartani, mivel az ammónia könnyen eltávozik vizes oldatból. Így az instabil ammóniamennyiség miatt könnyen lehet egyenetlen a méreteloszlás. Mivel a kisebb részecskeátmérő (ezáltal a nagyobb fajlagos felület) elméletileg előnyösebb, az ammóniaoldat adagolási sebességére vonatkozó vizsgálatokat az 1 M NH_4OH -koncentrációjú oldatot használva végeztük. Szabályozható fecskendőpumpa segítségével három különböző adagolási sebességet állítottunk be: 1, 2, illetve 4 ml/percet, míg a többi paramétert nem változtattuk. A DLS mérések alapján ezúttal azt állapítottuk meg, hogy az alacsony adagolási sebesség kisebb, de egységesebb átmérőjű részecskéket eredményeznek, míg a gyors adagolás következményeképp a részecskeátmérő széles határok között oszlik meg (7. ábra).

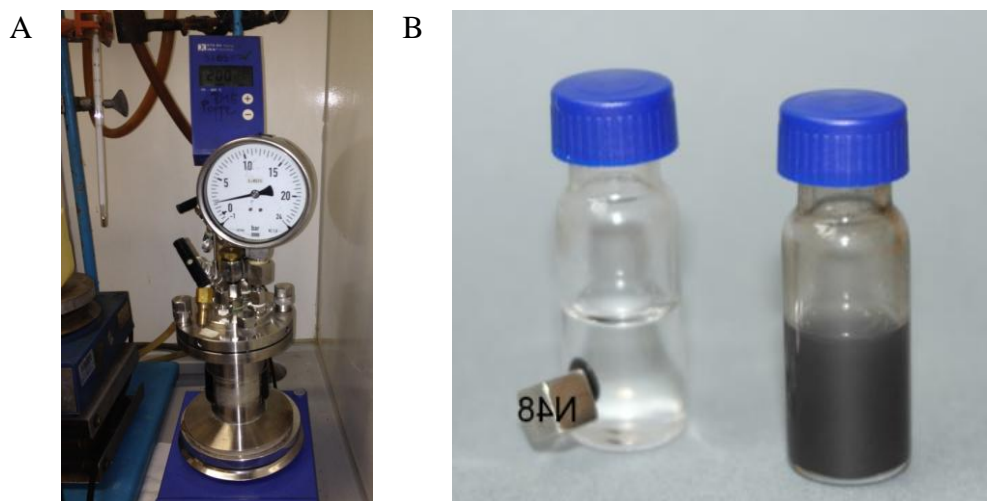


7. ábra Az ammónia adagolási sebességének hatása a részecskeméretre

A görbék közötti különbség oka az lehet, hogy a lassú adagolás során az ammóniának van ideje kiegyenlítődni a rendszerben, ezzel a reaktánsokra nézve homogén elegyet kaphatunk; így jönnek létre a kisebb és monodiszperzebb részecskék.

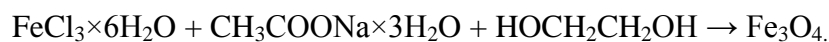
A harmadik körülmény, a hőmérséklet változtatása során, amikor hűtés nélkül, csapvizet illetve jeges hűtéssel végeztük a reakciókat, nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a keletkező szarcsok átlagos részecskeátmérője között, a méreteloszlás pedig itt is nagyon széles volt.

Bár a ko-precipitációs módszerrel egyszerűen és eredményesen állítottunk elő mágneses nanorészecskéket, a széles méreteloszlás és a morfológia nehéz kontrollálhatósága miatt nagyobb hangsúlyt fektettünk a szolvo-termál módszerrel történő előállításokra, mely lehetővé teszi a méret és a méreteloszlás finomhangolását, ugyanakkor ez a fajta előállítás is könnyen kivitelezhető. Az eljárás során 6 kristályvizes FeCl_3 prekursorból kiindulva, etilén-glikolban, nátrium-acetát jelenlétében, rozsdamentes acél autoklávban, magas hőmérsékleten végeztük a szintéziseket (8. ábra).

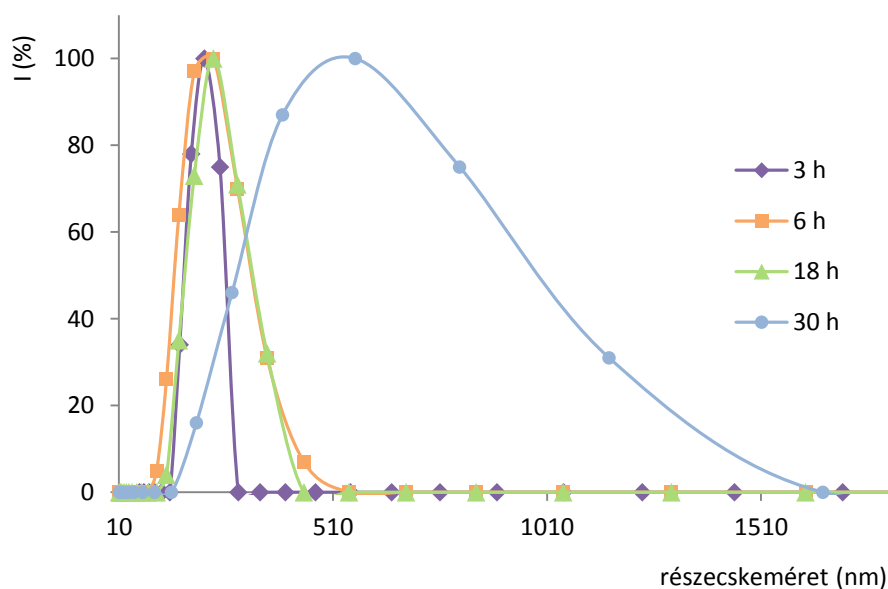


8. ábra Autokláv (A) és a benne képződött mágneses nanorészecske (B)

A szolvo-termál módszer során a vas-oxid nanorészecskék képződése a következők szerint zajlik:

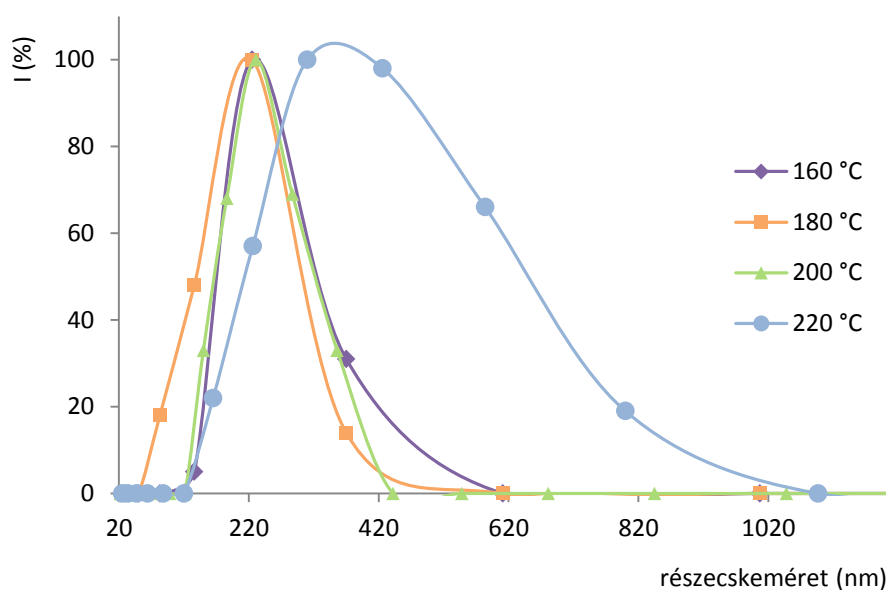


Először azt vizsgáltuk, hogy a reakcióidő milyen hatással van a keletkező részecskék morfológiájára, méreteloszlására. A szintéziseket 3, 6, 18 és 30 órás reakcióidővel, 200°C-on, a többi paraméter állandó értéken tartása mellett végeztük el. A DLS mérések eredményét a 9. ábra szemlélteti. Eszerint a részecskék mérete rendre nő a reakcióidő növelésével, és az első három esetben szűk tartományban oszlik el.



9. ábra A reakcióidő hatása a részecskék méreteloszlására

A továbbiakban más hőmérsékleteken is megvizsgáltuk a részecskeképződés tulajdonságait. A teszteket egységesen a praktikus kivitelezhető 24 órás reakcióidővel végeztük el. (10. ábra)

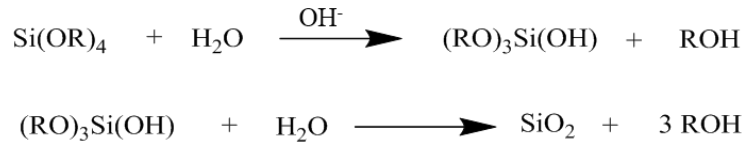


10. ábra A hőmérséklet hatása a részecskék méreteloszlására

A fényszóródásmérés görbéi azt mutatták, hogy 160-200 °C között a hőmérséklet kisebb befolyással rendelkezik a részecskeméretre, nagy eltérést egyedül a 220 °C-os minta mutatott, melynek jellemző részecskeátmérője 310 nm, és a méreteloszlás is szélesebb. Ennek oka valószínűleg az, hogy a magasabb hőmérséklet nagyobb energiaközlést jelent a rendszer számára, ami miatt gyorsabb lesz a gócpontok növekedése, azaz a vas prekursorok ráépülése a részecskékre.

4.2. A mágneses nanorészecskék bevonása

A vas-oxid részecskéken a következőkben olyan stabil bevonatot szerettünk volna létrehozni, amelyeket azután funkcionálizálva kötőhelyeket alakíthatunk ki az enzimmolekulák számára. A részecskék felületén szilícium-dioxid bevonatot képeztünk, amelyet tetraetoxiszilán (TEOS) lúgos körülmények között történő polikondenzációja révén hoztunk létre (11. ábra). A szol-gél alapú bevonásként is nevezhető eljárás során fontos szempont, hogy a rétegeképződés közben a nanorészecskék ne aggregálódjanak, valamint a kezdeti morfológia se változzon meg számottevő mértékben.

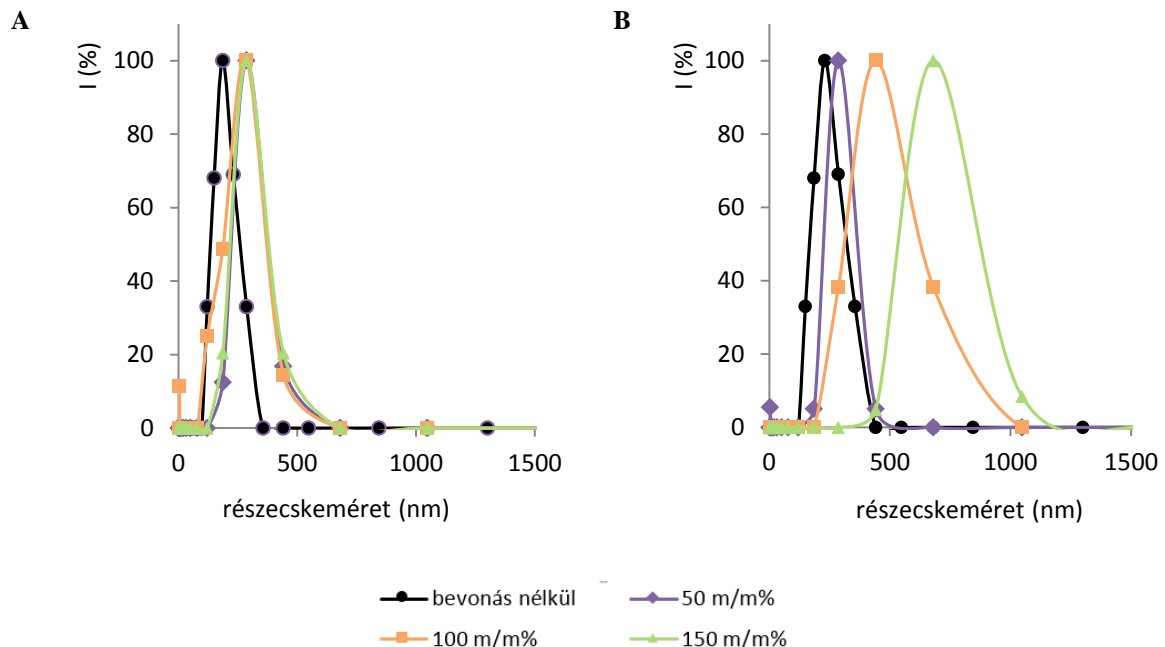


11. ábra SiO₂-réteg kialakulásának folyamata

A módszertől a részecskeméret növekedése volt várható. Ha több ilyen részecske aggregálódik, együttesen záródhatnak a gélbe, ami egyenetlen morfológiát és kedvezőtlen tulajdonságokat eredményez. Az aggregáció megelőzésére egy „semleges”, egyszerű polimert, a polietilén-glikol 400-at választottuk, amely képes a részecskék felületére adszorbeálódni, és egyfajta „távtartóként” viselkedni a részecskék között, ezáltal gátolva azok aggregációját.

A héjréteg vastagságának vizsgálatához az alkalmazott TEOS mennyiségét és a reakcióidőt változtattuk. A kísérletekhez egy kisebb (210 nm) átmérővel rendelkező mágneses nanorészecskét használtuk fel. A részecskék szuszpenziójához a mágneses részecske tömegére vonatkoztatva 50, 100 illetve 150 m/m% arányban adtunk TEOS prekuzort, és a különböző mennyiségek hatását egy rövid és egy hosszabb, 2 illetve 24 óra bevonási idő mellett vizsgáltuk.

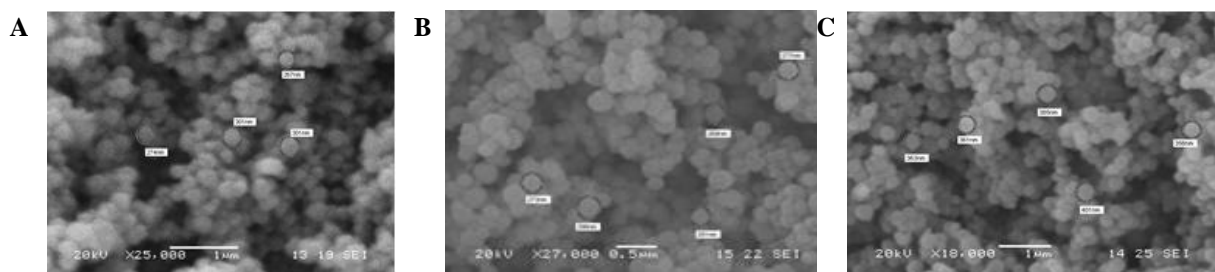
Az így előállított mintákat DLS méréssel analizáltuk (12. ábra A és B).



12. ábra A bevonási idő: 2 óra (A) és 24 óra (B), valamint a TEOS mennyiségének hatása a részecskeméretre

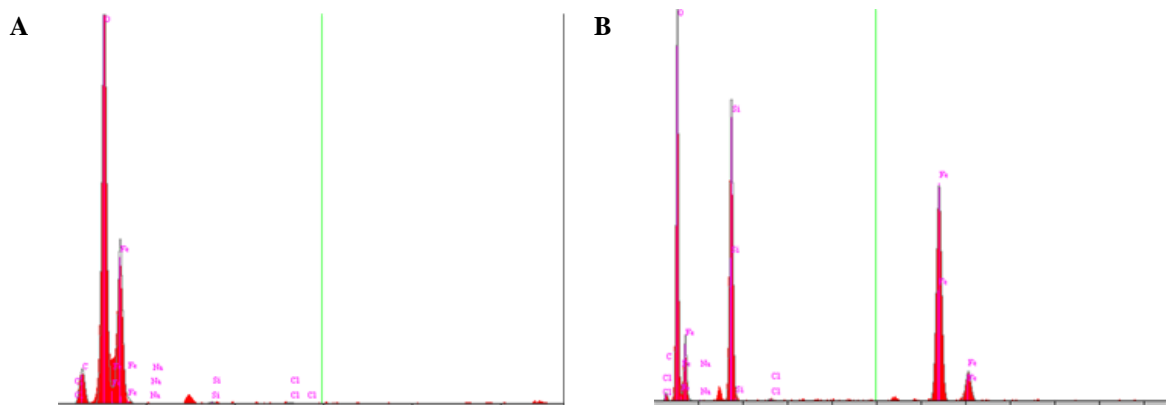
Mindkét esetben látszik, hogy az organoszilánnal történő reagáltatás megnövelte a részecskeméretet a bevonatlan mintához képest. A 2 órás minták esetén nem volt különbség az alkalmazott TEOS-mennyiség között, mindhárom esetben 290 nm-re nőtt az átlagos részecskeátmérő. Ennek az lehet az oka, hogy a 2 óra nem volt elég ahhoz, hogy több TEOS hozzáadásakor a teljes hozzáadott mennyiség beépüljön a bevonatba. Azonban 24 óra után már ez is láthatóvá vált: viszonylag szűk mérettartományban eloszló, 290, 440 és 680 nm átmérőjű részecskéket kaptunk, még a legnagyobb bevitt TEOS mennyiségnek volt kellő ideje arra, hogy a bevonatot képezzen a mágneses nanorészecske felületén. A nagyobb, 440 és 680 nm részecskeátmérők esetén természetesen az is előfordulhatott, hogy egy bevonat kapszulaként viselkedve nemcsak egy egyedi 190 nm-es nanorészecskét, hanem két-három részecskét is magába foglal.

A különböző körülmények között bevont mágneses nanorészecskéket pásztázó elektronmikroszkóp (Scanning Electron Microscope, SEM) segítségével is analizáltuk. A mikroszkóppal egyrészt a részecskék külső megjelenését, morfológiáját vizsgáltuk. Az itt mért részecskeátmérők kissé eltértek a DLS méréssel kapott értékektől, aminek az lehet az egyik oka, hogy az elektronmikroszkópos mérés előtt a jobb láthatóság érdekében a minták felületére egy vékony filmben aranyréteget kellett felvinni, így a SEM készülékkel mért méreteknél benne van a film vastagsága is (13. ábra).



13. ábra TEOS bevonás nélküli mágneses nanorészecskék SEM képe (A), illetve 100 m/m% TEOS-sal bevont mágneses nanorészecskék képe 2 órás (B) és 24 órás (C) bevonási idővel

A bevonás nélküli és a 100 m/m% TEOS-sal bevont, 2 órán át kezelt nanorészecskék képe majdnem azonos nagyításban készült, így a két minta ránézésre is könnyen összehasonlítható. Míg az első képen 240-260 nm körüli részecskeátmérőket látunk, a másodikon 300-as nagyságrendűeket. A harmadik képen hasonló nagyságú részecskéket láthatunk, ez azonban csupán 18000x-szeres nagyításban készült, így jóval nagyobb, 400 nm körüli szemcséket ábrázol. A bevont minták elemösszetételét a SEM készülékhez kapcsolt energiadiszperzív röntgenspektroszkópia (Energy Dispersive X-ray spectroscopy, EDAX) segítségével is vizsgáltuk (14. ábra).

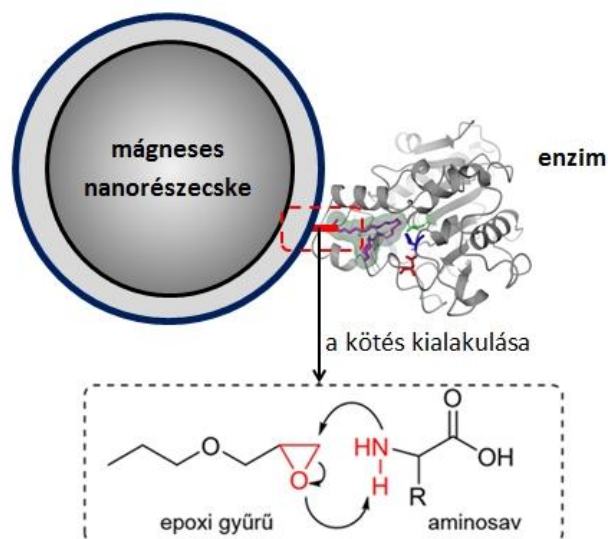


14. ábra A bevonattal nem rendelkező (A) és TEOS prekuzorral bevont (B) nanorészecske elemösszetétele

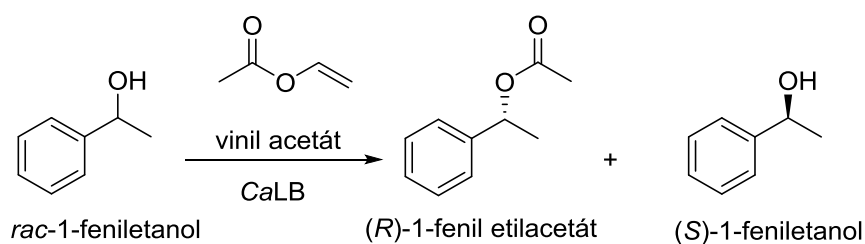
A 14.ábra/A spektrumain jól láthatók az oxigén, a vas karakterisztikus röntgensugárzásából adódó jelintenzitások, a 14./B ábrán pedig már megjelennek a szilícium vonalai is. A minták elemzését öt párhuzamos mérésben végeztük el. A bevonatlan minta elemösszetétele: vas $35,9 \pm 1$ %, oxigén $47,5 \pm 4$ %, szilícium $0,0 \pm 0$ %, szén $16,3 \pm 3$ %. A bevont részecske pedig vas $25,9 \pm 2$ %, oxigén $42,5 \pm 4$ %, szilícium $22,5 \pm 2$ %, szén $8,3 \pm 3$ % összetételűnek adódott. A SEM és EDAX mérések alapján megállapítható, hogy a részecskéken ténylegesen kialakult egy homogén szilícium-oxid bevonat, a minták elemösszetételének szórása pedig kis intervallumon belül mozog.

4.3. Enzimirögítés funkcionizált mágneses nanorészecskéken

A következőkben a stabilizált, szilícium-dioxid bevonattal ellátott mágneses nanorészecskék felületén olyan funkciós csoportokat alakítottunk ki, melyek képesek lehetnek az enzim molekulák és a hordozó között stabil kötések kialakítására. A kísérletek során funkciós csoportként gyűrűs epoxi vegyületeket vizsgáltuk, melyek nagy előnye hogy viszonylag enyhe körülmények között aminokkal könnyedén reakcióba vihetőek. Az aminosavból felépülő enzim molekulák hozzáférhető primer aminjai és tiol csoportjai (például lizin, cisztein) szintén eléggé nukleofilek ahhoz, hogy stabil kötést létesíthessenek az epoxi-vegyületek oxirán gyűrűjével (15. ábra).



15. ábra Az enzim rögzülésének mechanizmusa a funkcionizált felületű mágneses nanorészecskéhez. A mágneses nanohordozók felületét a 3-glicidoxipropiltrimetoxiszilán (röviden epoxi-szilán) segítségével funkcionizáltuk. A felületmódosítási kísérleteket során az epoxi-szilán mellett feniltrimetoxiszilánnal (röviden fenil-szilán) is elvégeztük. Bár a fenil csoportok nem képesek kovalens kötések kialakítását az enzimekkel, de ún. inert csoportként befolyásolhatják az epoxi-szilán felületi beépülését azaz a kovalens kötőhelyek alakulását. Ezért a nanorészecskéket epoxi-szilán, epoxi-szilán/fenil-szilán keverékeivel, valamint fenil-szilánnal is elvégeztük. Az így kialakított hordozókhoz ezután azonos körülmények mellett *CaL B* enzimet immobilizáltunk, egyszerű pufferelt oldatban történő ráztatás segítségével. Az így kapott rögzített *CaL B* készítmények biokatalizátorként való működését a racém 1-feniletanol acilezésében vizsgáltuk (16. ábra).



16.ábra *CaL B* által katalizált acilezési tesztreakció

A rögzített enzimek készítmények által végrehajtott tesztreakciókat királis állófázisú gázkromatográfia (GC) segítségével vizsgáltuk. A GC kromatogramokon megjelenő csúcsok a retenciós idők alapján egyértelműen a reakcióelegyben szereplő kiindulási alkohol, mint szubsztrát enantiomerjeihez, illetve a termékként kapott észter enantiomerjeihez rendelhetők. Az így jól definiálható elkülönült csúcsok alatti terület arányos az adott molekula

koncentrációjával az adott mintában. A GC mérésekből ezek alapján, kiszámítottuk a legfontosabb biokatalitikus paramétereket, a biokatalizátor aktivitását [U_B (Unit/g)] és a képződő termékre vonatkoztatott enantiomer felesleget [ee_{Ac} (%)] a következő összefüggések alapján:

$$c = \frac{M_P}{M_S + M_P} \quad (1)$$

$$U_B = n_{rac} \times c / t \times m_B \quad (2)$$

ahol, c : konverzió,

M_P a termék, M_S a szubsztrát móltörtje

n_{rac} : a kiindulási racém elegy anyagmennyisége (μmol)

t : reakcióidő (perc)

m_B : a biokatalizátor tömege (g)

Az U_B , azaz fajlagos biokatalitikus aktivitás azt mutatja meg, hogy 1 g tömegű biokatalizátor hány μmol terméket állít elő (vagy szubsztrátot alakít át) 1 perc alatt. Mértékegysége U/g, azaz $\mu\text{mol} \times \text{perc}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ [7].

Az enantiomerfelesleg (enantiomeric excess, ee) azt mutatja meg, hogy az adott enantiomer hány százalékban van jelen az enantiomer keverékben. Ez a mérőszám az aszimmetrikus szintézis, vagy enzimkatalízis sztereoszelektivitására utal.

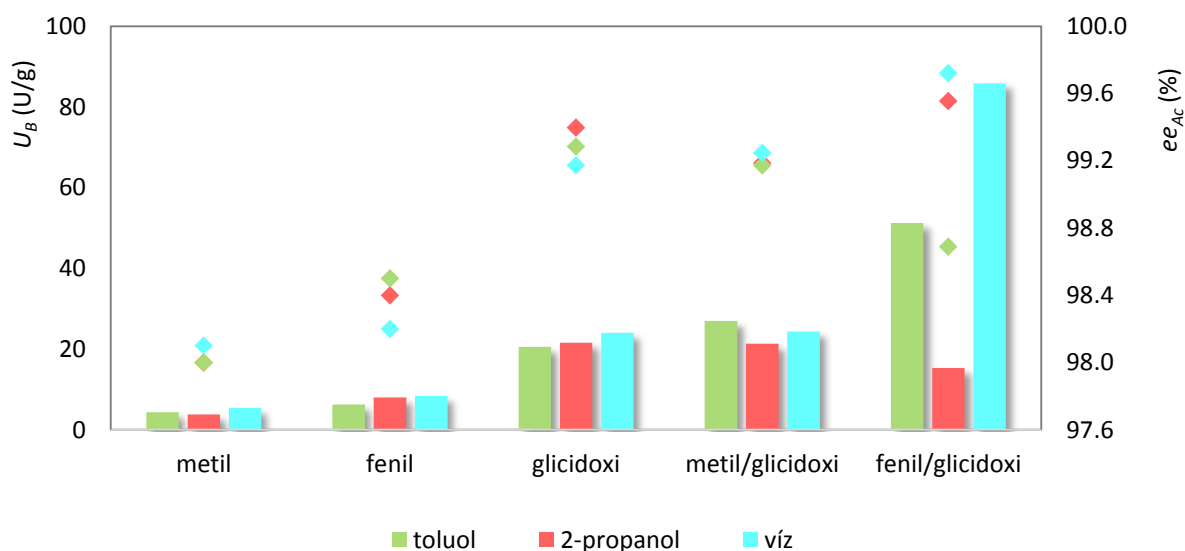
$$ee[\%] = \frac{M - M^*}{M + M^*} \times 100 \quad (3)$$

ahol, M : a fő enantiomer móltörtje

M^* : a szennyező enantiomer móltörtje

Az enzimrögzítési kísérletekben először azt vizsgáltuk, hogy van-e a hatása a funkcionálzás során alkalmazott oldószerközegnek. A felületmódosítást az irodalomban is közölt módon toluolban, alkoholban (2-propanol) illetve az irodalomban eddig nem ismert módon vízben is kipróbáltuk. A felület funkcionálzását metil-, fenil- és glicidoxipropil-trimetoxiszilánnal hajtottuk végre. Az említett szilánokat külön-külön és egymással elegyítve is alkalmaztuk. Az így elkészült hordozókkal elvégeztük a CaL B immobilizálás kísérleteit, majd a készítményeket a 17. ábrán bemutatott acilezési reakcióban teszteltük. Az 17. ábrán láthatók a készítmények fajlagos biokatalitikus aktivitásai (U_B) és az elért enantiomertisztaságok (ee_{Ac}). A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a vízben történő funkcionálzás szinte minden esetben jobb biokatalitikus aktivitásokat eredményezett, mint a toluolban vagy

2-propanolban végrehajtott esetekben. Szintén látható, hogy a csupán metil- illetve fenil-csoportokat tartalmazó felületek aktivitása nem meglepően a legalacsonyabbak, hiszen ezek a csoportok természetesen nem képesek az enzim kovalens kötésére, csupán hidrofób karakterük miatt tudhatják bizonyos mértékben a felületen tartani a hidrofób körülményeket természetéből fakadóan kedvelő lipázt. Az ily módon csupán adszorpcióval rögzült lipáz nagy része azonban lemosódik a rögzítés utáni készítmény mosási eljárás során, feltehetően ez okozza a csekély maradó aktivitást. Erre utalhat az is, hogy a hidrofóbabb karakterű fenil-csoportokkal ellátott felületek aktivitása kismértékben nagyobb, mint a kevésbé hidrofób metil-csoportokkal rendelkező készítmények (előbbieik U_B értékei 6,3 és 8,4 U/g közöttiek, míg utóbbiaké 4,4 és 5,4 U/g közé esnek). A glicidoxi-csoportban, azaz epoxi gyűrűben végződő felületi csoportok már képesek kovalens kötésekkel kapcsolni az enzimet a felülethez, e készítmények aktivitása és szelektivitása is magasabb, mint a tisztán metil-, illetve fenil-szilánnal módosított hordozókkal elért esetekben. Érdekes jelenség, hogy a kevert, tehát egyszerre kétféle szilánnal módosított hordozók (metil/glicidoxi, illetve fenil/glicidoxi) aktivitása és szelektivitása is javul. Különösen kiemelhető, a fenil/glicidoxi keverék vízben történő alkalmazása, amellyel igen magas aktivitás ($U_B = 85,6$ U/g) és enantiomertisztaság ($ee_{Ac} = 99,7$ %) érhető el. Ezt a jelenség egyfelől azzal magyarázható, hogy a fenilcsoportok bár nem vesznek részt kovalens kötésekkel az enzimirögzítésben, képesek lehetnek az enzim viszonylag gyorsan végbemenő hidrofób adszorpciójára, ami által a lipázok a hordozó részecske felületére kerülnek. A felületen csoportosuló lipáz és a felületi epoxi csoportok között ezt követően könnyebben kialakulhatnak a stabil kovalens kötések. Másfelől a viszonylag nagyobb térkitöltésű aromás gyűrű szterikusan gátolhatja az epoxi csoportok „túlzsúfoltságát” a hordozó felületén, így a kötődési pontok kedvezőbben helyezkedhetnek el.



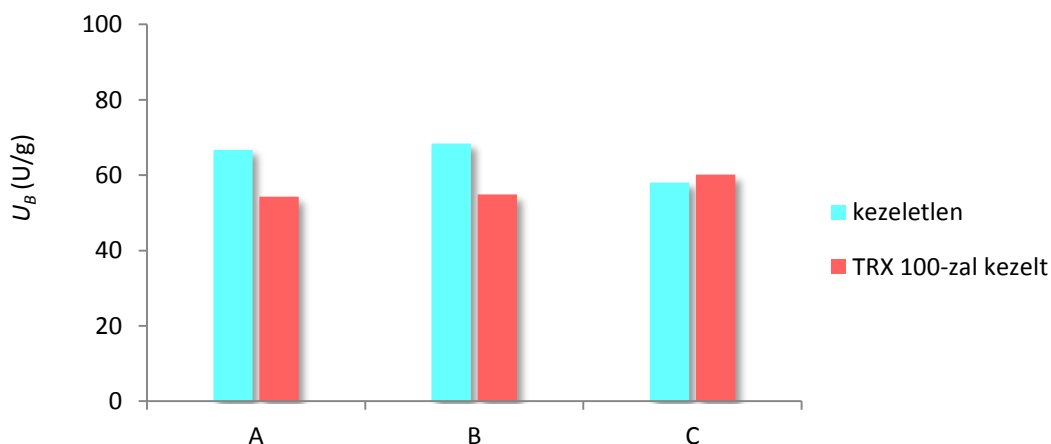
17.ábra A nanorészecskék funkcionálzási körülményeinek hatása az enzim rögzítésére

Ezen eredményeket alapul véve a továbbiakban a mágneses hordozók felületét vizes közegben, fenil/glicidoxi – szilánok keverékével módosítottuk.

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a fenil és epoxi csoportokat egyaránt tartalmazó felületen az immobilizálandó enzim milyen módon rögzül a felületre. Ezen a „kettős” felületen a fenilcsoportok révén adszorpcióval, míg az epoxi gyűrűkön kovalens kötésekkel kötődhet az enzim. Annak tisztázására, hogy e két eltérő rögzülési mód közül melyik dominál, a rögzítés után kapott első mosási ciklus felülúszó fehérjetartalmát Bradford módszerrel vizsgáltuk, majd a rögzített készítményeket pedig erős felület aktív anyaggal (Triton X-100 detergens oldat) kezeltük.

A Bradford-reagens egy vörös festék, amely fehérjékkel reagálva elkékül, és ennek a kék színnek az intenzitása UV/VIS spektrofotométerrel $\lambda = 595$ nm hullámhosszon mérhető. Az immobilizálások utáni első vizes mosás fehérjetartalmának vizsgálatakor nem tapasztaltunk elszíneződést, így arra következtettünk, hogy a rögzítés utáni felülúszó már nem tartalmaz fehérjét.

A minták felületaktív anyaggal történő kezelésével a gyenge, adszorptív módon rögzült enzim teljesen eltávolítható a hordozó felületéről, míg a ténylegesen kovalens kötésekkel rögzült enzim a hordozón marad. A minták biokatalitikus aktivitását a kezelés előtt és után is megmértük (18.ábra).

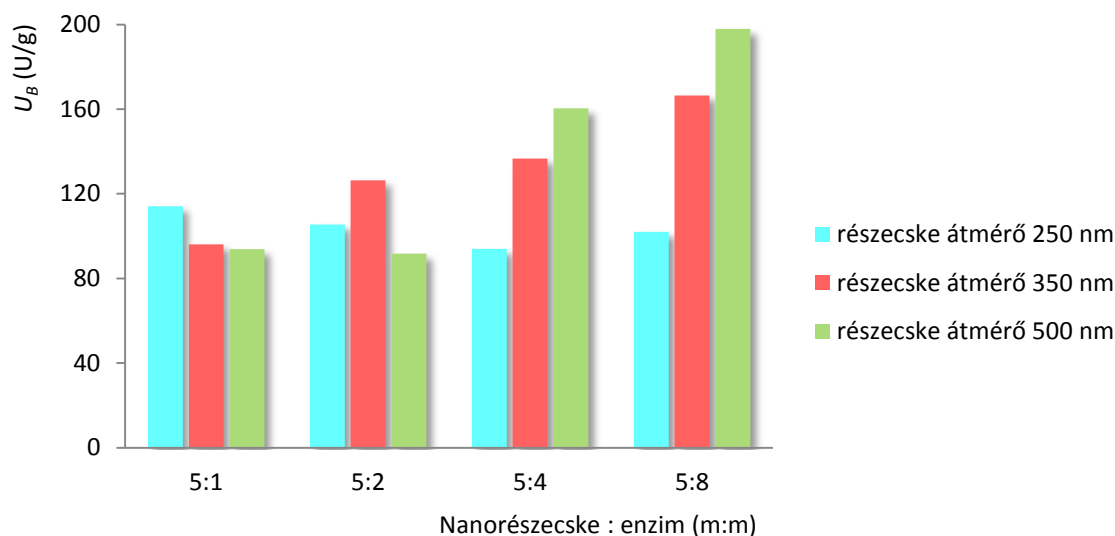


18. ábra A Triton-X 100 felületaktív anyag hatása az immobilizált enzimek aktivitására

A 18. ábra három különböző sarzs (A, B, C) fenil/glicidoxi – szilánnal módosított minta kezdeti és TRX-100 felületaktív anyaggal történő kezelés utáni eredményét mutatja. A diagramon az látható, hogy a felületaktív anyag nem csökkentette számottevő mértékben az enzim aktivitását, azaz a kovalens kötések elég erősek, és számuk elegendő ahhoz, hogy az enzimek a hordozó felületén maradjanak, és továbbra is kifejtsék katalitikus képességeiket.

4.3.1. A mágneses nanorészecske méretének hatása az enzim rögzítésére

Az enzimrögzítés részecskemérettől való függésnek vizsgálatára három különböző méretű hordozót választottunk ki: 250, 350 és 500 nm átlagos átmérőjű részecskéket. A részecskék azonos körülmények mellett a fent említett fenil/glicidoxi keverékkel kerültek funkcionálizálásra. A részecskékhez különböző mennyiségekben (a részecske tömege:enzim tömege 5:1; 5:2; 5:4 illetve 5:8 arányban) adtunk *CaL* B enzimet, majd a rögzítés lezajlása után mértük az enzimek katalitikus aktivitását a fentebb említettekhez hasonlóan, a racém 1-feniletanol acilezésében (19. ábra).

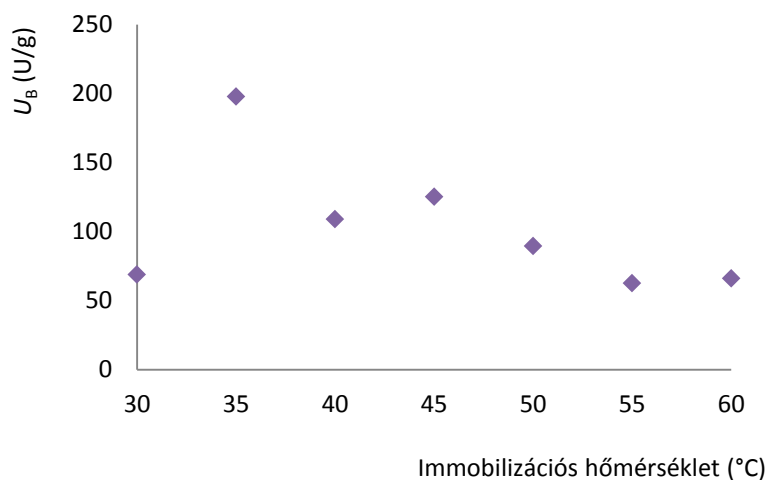


19. ábra A részecskeátmérő és az enzimkoncentráció hatása az aktivitásra

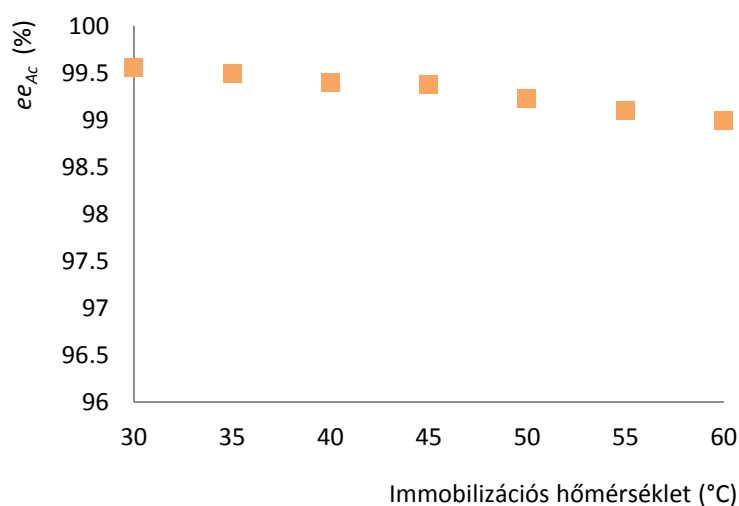
Jól látható, hogy a legnagyobb méretű részecske a legalkalmasabb akár nagy koncentrációjú enzim rögzítésére is. A jelenséget a Bradford módszer eredményei magyarázzák: egyik esetben sem mértük fehérje jelenlétét a felülúszóban, így valószínűleg a kisebb részecskéken is ugyanannyi enzim rögzült, csak „zsúfoltabban”, mint a nagyobbakon. Az aktivitásnak nem kedvez, ha az enzim molekulák nem tudnak szabadon mozogni, a megfelelő konformációba helyezkedni, így ez lehet az oka, hogy a nagyobb részecskéken magasabb katalitikus aktivitást mértünk. A továbbiakban ezért az 500 nm-es részecskékre történő immobilizálás körülményeit próbáltuk optimalni.

4.3.2. A rögzítés hőmérsékletének hatása

Az enzimrögzítési reakciókat több különböző hőmérsékleten elvégeztük (30 – 60 °C között, 5 °C-os lépésközzel). Bár a fehérjéknek sok esetben nem kedvez a magas hőmérséklet, a CaL B hőtűrése igen jó, így érdemesnek tűnt a magasabb hőmérsékleteket is kipróbálni, hiszen az kedvezően hathat a rögzítés során kialakuló kovalens kötésekre. A kapott hőmérséklet–aktivitás- és hőmérséklet-enantioszelektivitás-összefüggéseket a 20. és a 21. ábrák mutatják.



20. ábra Az immobilizációs hőmérséklet hatása a katalitikus aktivitásra



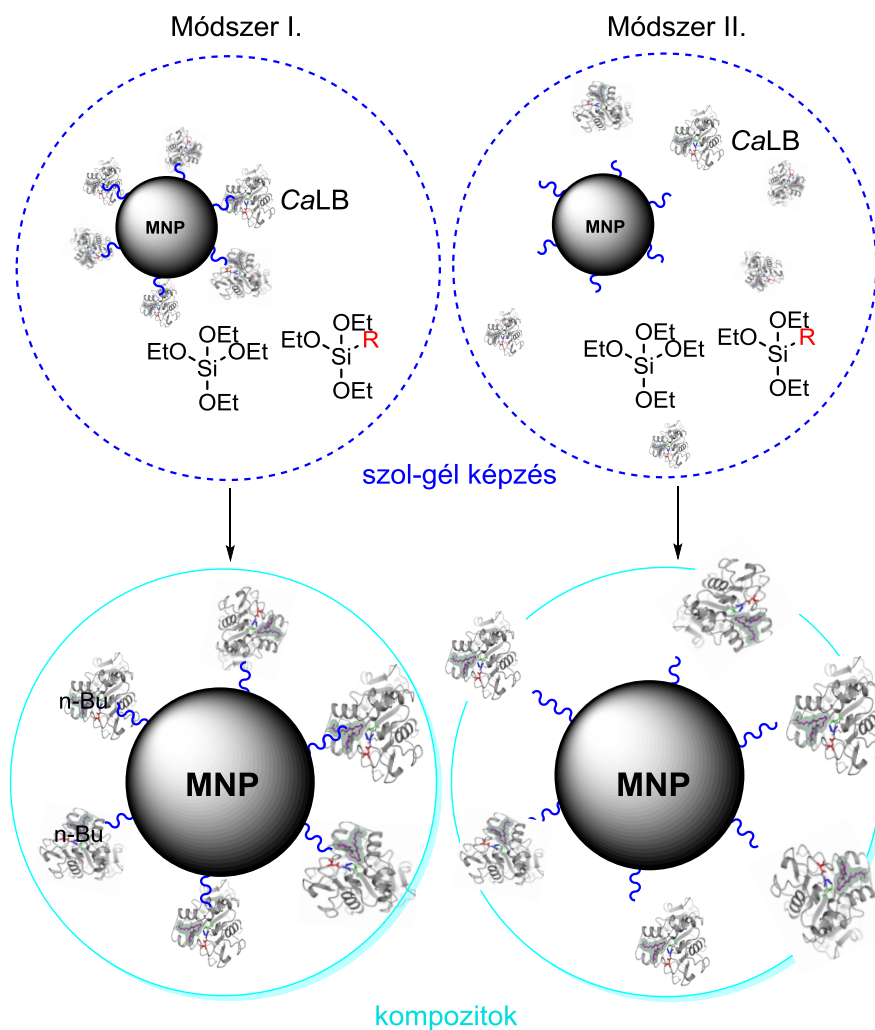
21. ábra Az immobilizációs hőmérséklet hatása az enantiomerszelektivitásra

A diagramokból úgy tűnik, hogy az eddigiekben alkalmazott 30 °C rögzítési hőmérsékletéhez képest a magasabb hőfokokkal jobb eredmények voltak elérhetőek, a 35 °C-on végrehajtott enzim immobilizálás pedig kimagaslóan jó eredményeket mutatott. Feltehetően a 35 °C kedvezően hat a kötődések létrejöttére, több kötőpont alakulhat ki, avagy az enzim aktívabb konformációt vehet fel ezen a hőfokon, de nem túl magas ahhoz, hogy hosszabb távon (a rögzítés időtartama alatt, ami esetünkben 24 óra) sem sérül az enzim szerkezete, nem szenved hődenaturációt a fehérje.

4.4. Enzimrögzítés kompozitban – mágneses nanorészecskéhez kötés és szol-gélbe zárás ötvözése

Az eddigiekben bemutatott nanobiokatalizátorral egy olyan új típusú ún. kompozit hordozó rendszer kialakítását céloztuk meg, amely képes lehet alapvetően két teljesen eltérő

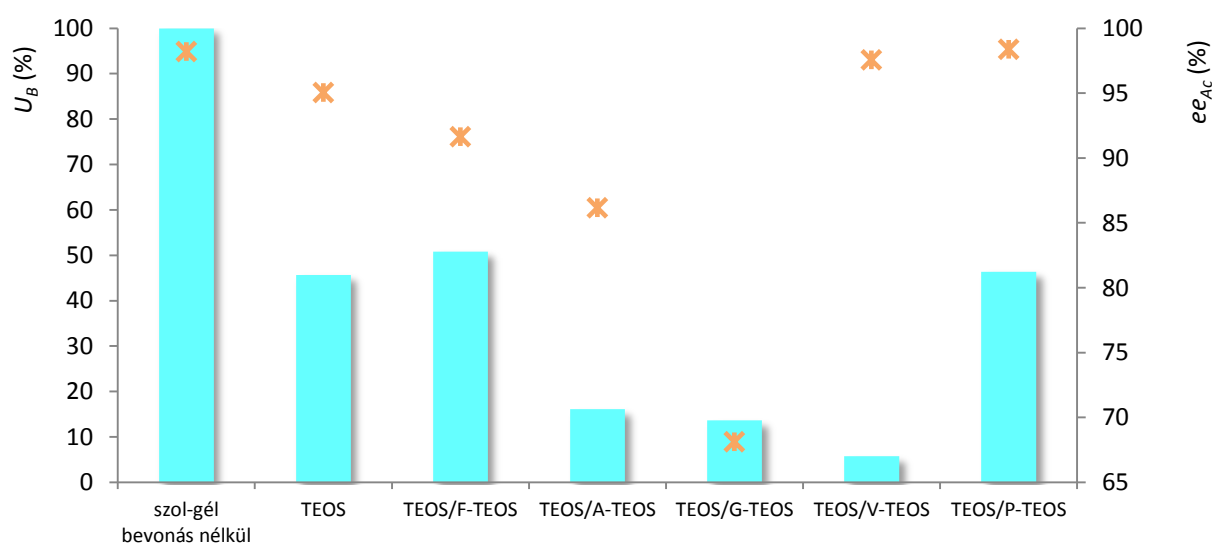
enzimrögzítés előnyeit ötvözni. Az egyik enzimrögzítési mód a fent bemutatott mágneses nanorészecskéhez történő kovalens kötés, a másik pedig és a szol-gélbe ágyazás. A két eljárás kombinálást kétféleképpen próbáltunk ki. Az egyik eljárás szerint először az eddig megszokott módon kovalensen kapcsoljuk az enzimet a nanorészecske felületére majd ezután különböző organoszilán prekursorok alkalmazásával az enzimmel borított hordozót szol-gél mátrixba ágyasztjuk (I. módszer). A másik módszer esetében pedig (II. módszer) az enzim nincs a mágneses hordozóhoz kötve, hanem azzal egyidejűleg, de külön fázisként kerül a gélképzési folyamatba. A mágneses nanohordozóhoz kötés és szol-gélbe zárás révén létrehozott röviden MNP-SG kompozitok előállítását megkísérlő két módszer közötti elvi különbségeket a 22. ábra mutatja be.



22. ábra MNP-SG kompozitok előállítási módszerei

A szol-gél mátrixokat tetraetoxiszilánból (TEOS), és a TEOS egyszerűen szubsztituált származékaiból; feniltriethoxiszilánból (F-TEOS), 3-aminopropiltriethoxiszilánból (A-TEOS), 3-glicidoxipropiltriethoxiszilánból (G-TEOS), viniltriethoxiszilánból (V-TEOS), valamint

propiltriétoxiszilánból (P-TEOS) hoztuk létre. A szol-gél tárhálók képzése során a TEOS jelenléte esszenciális, mivel négy alkoxi csoportja révén térben kiterjedtebb és teljes térhálósodást eredményez, míg a szubsztituált származékok önmagukban nem képesek összefüggő, stabil térhálós szerkezet kialakítására. Az I. módszerrel előállított enzimek készítményeket a fentiekben is ismertetett acilezési reakcióban vizsgáltuk, amely során azt tapasztaltuk, hogy a kompozit rendszerek aktivitása csökkent, mivel a körülötte kialakított „héjréteg” valószínűleg nagyobb diffúziós gátat jelent a szubsztrátmolekulák számára (23. ábra).

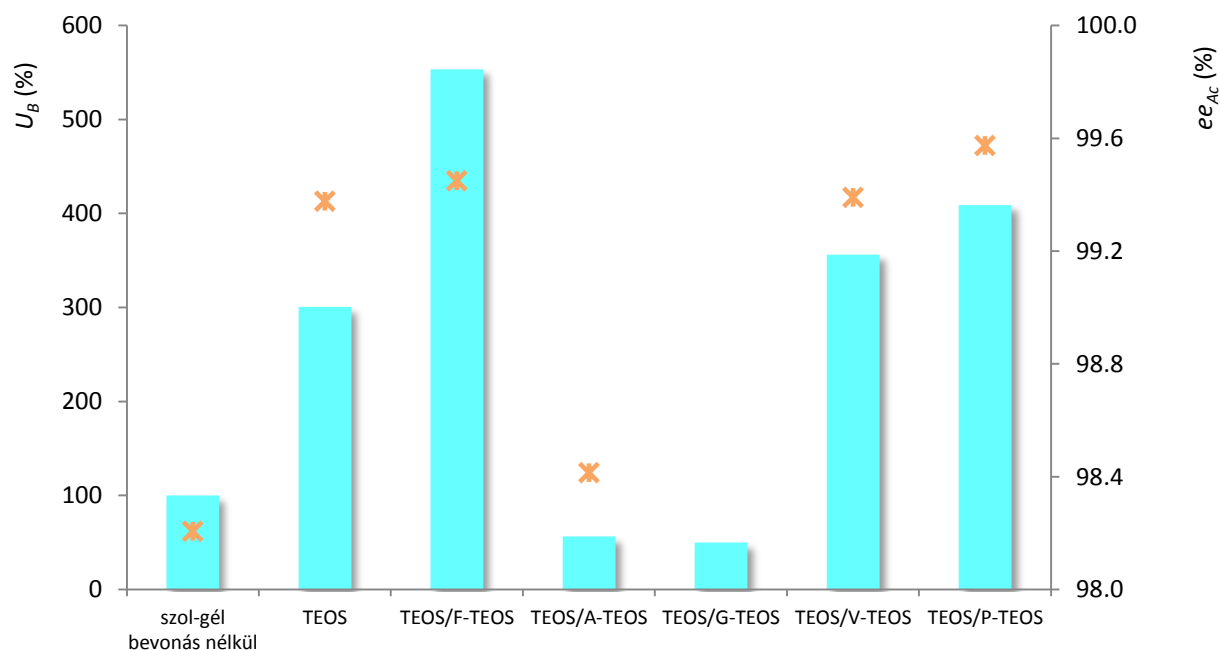


23. ábra Mágneses nanorészecskéken előzetesen rögzített *CaL B* szol-gélbe ágyazott készítményeinek biokatalitikus képességei

A kompozit rendszerek másik létrehozási módja abban különbözik az előzőtől, hogy ez esetben az enzimet nem rögzítettük előzetesen a mágneses nanohordozóhoz, hanem őket különállóan és egyszerre juttattuk be a szol-gél képzési folyamatba. A szol-gél mátrixok kialakítását ugyancsak a fent már felsorolt organoszilánokkal végeztük el. A készítményeket azonos körülmények mellett, szintén a racém 1-feniletanolal végzett észterezésben vizsgáltuk.

Ezzel a kompozitképzési módszerrel jelentős javulást értünk el szinte minden esetben, mind az aktivitás és mind az enantiomertisztaság tekintetében, mint a kezdeti, csupán kovalensen rögzített enzimmel. Kiemelkedően jónak bizonyult a TEOS/F-TEOS, azaz a tetraetoxiszilán mellett feniltriétoxiszilánt is tartalmazó prekursor eleggyel gélesített készítmény, amely oka ugyancsak a már tapasztalt lipáz számára kedvező hidrofobicitás miatt lehet. Emellett, a fenilcsoportok potenciális „hiba helyek” lehetnek a mátrixban, ahol nem alakulhat ki teljesen

zárt hálós szerkezet. Az így kialakuló rések által létrehozott porozitás, kedvezőbb diffúziós viszonyokat eredményezhet a biokatalízis során. A magas enzimaktivások oka az lehet, hogy a II. módszer esetében az enzimek helyzete még nem fix, előfordulhat, hogy bizonyos enzim molekulák a szol-gél térhálóban a héj külső felszínéhez közelebb kerülhetnek. A G-TEOS, azaz a 3-glicidoxipropiltiretoxiszilán és az A-TEOS, vagyis 3-aminopropiltriétoxiszilán tartalmú rendszerek aktivitása kissé csökkent a plusz szol-gél bevonat nélküli, azaz csak kovalensen rögzített mágneses katalizátorhoz képest. Ennek oka az lehet, hogy az enzim szerkezeti amino-csoportjai reagálhatnak a G-TEOS epoxi csoportjával, ami az enzim dezaktiválódásához vezethet. Az amintartalmú szilán esetében pedig előfordulhat, hogy a mágneses nanorészecske felületén lévő el nem reagált epoxi csoportokhoz köt és az így halmozódó kötési kapcsolatok egyre átjárhatatlanabbá tehetik a készítményt, ami komoly anyagátadási problémákat okozhat (24. ábra).

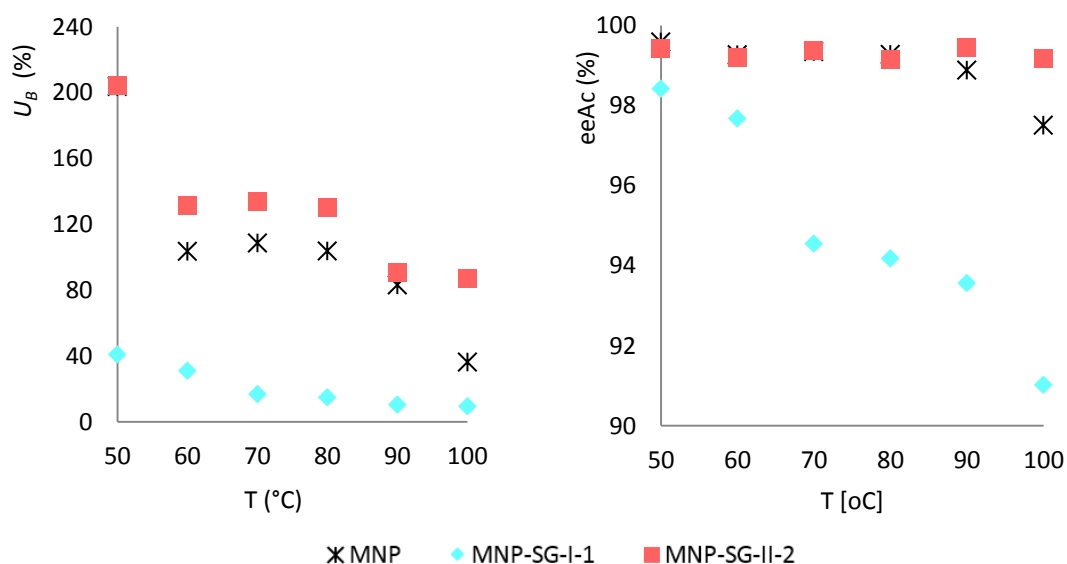


24. ábra Mágneses nanorészecskéken egyidejűleg rögzített és szol-gélbe ágyazott CaL B készítményeinek biokatalitikus képességei

4.4.1. Kompozit rendszerek hőstabilitása

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy az előző fejezetben bemutatott MNP-SG kompozit rendszerek hogyan viselkednek, ha magasabb hőmérsékleteknek tesszük ki őket. Számos alkalmazási területen, például gyógyszeriparban, finom kemikáliák előállítása során igény lehet arra, hogy az enzim katalizátorokat magasabb hőmérsékleten is alkalmazhassák. Ennek okán fontos szempont lehet az enzimmészítmény hőmérséklettoleranciája. A rögzített

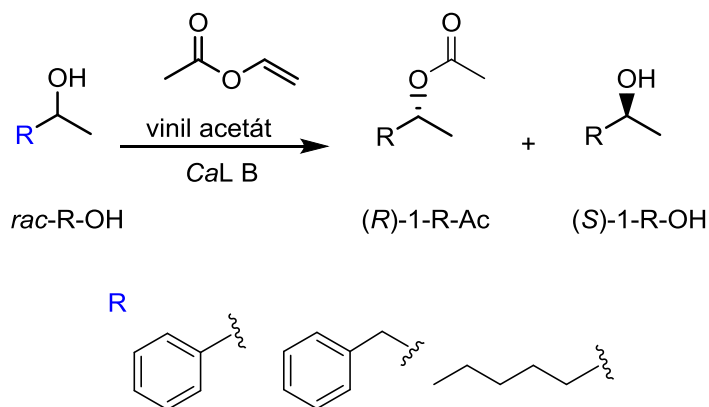
készítményeket minden esetben 20 órán át toluolban tartottuk 50, 60, 70, 80, 90 és 100 °C-on. Ezt követően, a minták visszahűlése után feniletanol acilezésében teszteltük aktivitásukat 30 °C-on. A hőstabilitási tesztek eredményei azt mutatták, hogy a készítmények 80 °C-ig még jó maradó aktivitással és szelektivitással rendelkeznek. A diagram alapján az is elmondható, hogy a II-es típusú kompozitképzés nagyobb stabilitást kölcsönzött a készítményeknek, mint a bevonattal nem rendelkező, csupán kovalensen kötött (MNP jelű) készítmény.



25. ábra Rögzített enzimek hőstabilitása

4.5. Az új mágneses nanobiokatalizátorok alkalmazása alkoholok észterezésében

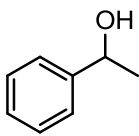
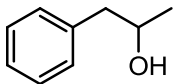
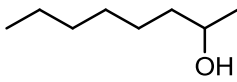
Az eddig legjobb biokatalitikus működést tanúsító készítményeinket a racém-1-feniletanol mellett egy vele rokon szerkezetű alkohol (racém-1-fenil-2-propanol), illetve egy hosszú nyílt láncú vegyület, a racém-2-oktanol szelektív észterezésében is megvizsgáltuk (26. ábra).



26. ábra Racém alkoholok CaL B katalizált acilezése

A saját mágneses nanobiokatalizátoraink mellett összehasonlításként a kereskedelmi forgalomban levő *CaL B* enzimekészítményeket (adszoprciósan kötött Novozyme 435® és kovalensen rögzített ChiralVision T2-150®) és az immobilizálási kísérletekhez is használt rögzítetlen liofilizált *CaL B* készítményt is kipróbáltuk a fent említett három alkohol acilezésében (4. táblázat).

4. táblázat Különböző immobilizált *CaL B* készítmények biokatalitikus működése racém alkoholok észterezésében

Szubsztrát	Rögzített <i>CaL B</i> készítmények	U_B [U/g]	ee_{Ac} [%]
	Novozyme 435®	549.4	99.5
	ChiralVision T2-150®	110.6	99.2
	Liofilizált készítmény	13.4	96.5
	MNP	150.7	99.3
	MNP-SG-II-propil	401.7	99.3
	MNP-SG-II-vinil	244.8	99.2
	MNP-SG-II-fenil	362.6	99.3
	Novozyme 435®	304.2	99.9
	ChiralVision T2-150®	42.7	99.2
	Liofilizált készítmény	15.4	95.5
	MNP	54.7	99.4
	MNP-SG-II-propil	174.1	99.7
	MNP-SG-II-vinil	92.3	99.4
	MNP-SG-II-fenil	246.1	99.6
	Novozyme 435®	705.3	96.4
	ChiralVision T2-150®	255.4	97.7
	Liofilizált készítmény	39.7	89.4
	MNP	337.1	98.1
	MNP-SG-II-propil	874.2	99.0
	MNP-SG-II-vinil	390.5	98.7
	MNP-SG-II-fenil	773.2	99.1

A 4. táblázat eredményei azt mutatják, hogy az immobilizálás minden esetben kedvező hatással van az enzim aktivitására, hiszen minden esetben a liofilizált enzimekészítmény mutatta a legalacsonyabb értékeket. A többi mintánál az enantiomerfeleslegben nem mutatkozott lényeges eltérés, szinte mindenhol 98-99%-os értékek adódtak. A specifikus aktivitások vizsgálata azt mutatta ki, hogy az általunk előállított mágneses nanobiokatalizátorok versenyképesek lehetnek a kereskedelmi forgalomban levő nagy piaci potenciállal rendelkező enzimekkel szemben: aktivitásaik a Chiral Vision termékét meghaladták, a Novozyme 435 ét pedig megközelítették a feniletanol esetében. Érdekes jelenség azonban, hogy az fenil-2-propanollal esetében a különbség az U_B értékekben már kisebb az általunk előállított legjobb MNP-SG-II-fenil készítmény és a Novozyme 435 között.

Az alifás alkohol esetében pedig ez a készítmény meghaladja a Novozyme által elért aktivitást, lényegesen magasabb enantiomer tisztaság mellett. Ennek lehetséges oka talán, hogy az immobilizálás képes oly módon hatni az enzim szerkezetére, konformációjára, hogy annak megváltozik az egyes szubsztrátokhoz való affinitása.

5. Összefoglalás

TDK munkám célja olyan mágneses tulajdonságú nanorészecskék előállítása volt, melyek képesek lehetnek enzimek hatékony és stabil rögzítésére. Elsőként a mágneses nanorészecskék előállításával foglalkoztam, amely során ún. szolvo-termál módszer segítségével sikeresen különböző átmérőjű nanorészecskéket hoztam létre, szűk méreteloszlásban. Ezt követően a nanohordozók köré stabil, szilícium-oxid bevonatot képeztem, melyek alkalmas alapot biztosíthattak a részecskék további funkcionálására. Felületmódosítási eljárások vizsgálata révén sikerült olyan kovalens kötésre alkalmas felszint kialakítani, amely a mágneses nanohordozókat alkalmassá teszi enzimek stabil megkötésére. Az enzimrögzítési kísérletekhez számos területen releváns enzimet, a *Candida antarctica* B lipázt alkalmaztam. A lipáz hordozóhoz kapcsolása során azt találtam, hogy a kovalens kötésre alkalmas epoxi gyűrűk és a hidrofób karakterű fenilcsoportok együttes jelenléte hatékony immobilizálást tesz lehetővé. Két eltérő enzimrögzítési technika, a funkcionizált mágneses nanorészecskékhez történő kapcsolás és a szol-gélbe zárás ötvözésével sikerült egy új, eddig az irodalomban nem ismert kompozit enzimrögzítési módszert létrehozni, amely rendkívül jó aktivitással magas enantiomertisztaságú terméket szolgáltat racém aromás és alifás alkoholok észterezésében.

Irodalomjegyzék

- [1] P Demarche, C Junghanns, RR Nair, SN Agathos, *Biotechnology Advances*, 30 (2012) 933 -953
- [2] U Hanefeld, L Cao, E Magner, *Chem Soc Rev*, 42 (2013) 6211–6212
- [3] JP Rasor, E Voss, *Appl Cat A General*, 221 (2001) 145-158
- [4] S Sanchez, AL Demain, *Org Process Res Dev*, 15 (2011) 224-230
- [5] S Datta, LR Christena, YRS Rajaram, *3 Biotech*, 3 (2013) 1-9
- [6] C Spahn, SD Minter, *Rec Pat Eng*, 2 (2008) 195-200
- [7] B Sevela, *Biomérnöki műveletek és folyamatok*, 2011, Typotex Kiadó
- [8] W Tischer, F Wedekind, *Topics in Current Chemistry*, 200 (1999) 95-126
- [9] DT Mitchell, SB Lee, L Trofin, N Li, TK Nevanen, H Söderlund, CR Martin, *J Am Chem Soc*, 124 (2002) 11864–11865
- [10] SA Ansari, Q Husain, *Biotechnol Adv*, 30 (2012) 512–523
- [11] C Boyer, MR Whittaker, V Bulmus, J Liu, TP Davis, *NPG Asia Mater*, 2 (2010) 23- 30
- [12] A Figuerola, R Di Coratob, L Mannaa, T Pellegrino, *Pharmacological Research*, 62 (2010) 126–143
- [13] H Yang, S Zhang, X Chen, Z Zhuang, J Xu, X Wang, *Anal Chem*, 76 (2004) 1316-1321
- [14] Z Ma, Y Guan, H Liu, *J Magn Magn Mater*, 301 (2006) 469–477
- [15] A Szarka, L Wunderlich, *A biokémia alapjai*, 2013, Typotex Kiadó
- [16] L Sarkadi, *Biokémia mérnöki szemmel*, 2007, Typotex Kiadó
- [17] L Stryer, JM Berg, JL Tymoczko, *Biochemistry 5th revised edition*, 2002, WHFreeman & Co Ltd
- [18] L Baross, M Sajgó, *A biokémia alapjai*, 2003, Mezőgazda Kiadó
- [19] A Houde, A Kademi, D Leblanc, *Appl Biochem Biotechnol*, 118 (2004) 155-170
- [20] M Pécs, *Ipari enzimek, egyetemi előadás*
- [21] A Warshel, GNaray-Szabó, F Sussman, JK Hwang, *Biochem*, 28 (1989) 3629-3637
- [22] CC Gruber, J Pleiss, *Lipases and Phospholipases*, Humana Press, (2012) 313-327
- [23] A Idris, A Bukhari, *Biotechnology Advances*, 30 (2012) 550– 563
- [24] N Miletic, R Rohandi, Z Vukovic, A Nastasovic, K Loos, *Reactive & Functional Polymers*, 69 (2009) 68–75

- [25] D Weiser, Z Boros, G Hornyánszky, A Tóth, L Poppe, *Process Biochemistry*, 47 (2012) 428-434
- [26] D Brady, J Jordaan, *Biotechnol Lett*, 31 (2009) 1639-50
- [27] RA Sheldon, *Appl Microbiol Biotechnol*, 92 (2011) 467-477
- [28] U Hanefeld, L Gardossi, E Magner, *Chem Soc Rev*, 38 (2009) 453-68
- [29] RA Sheldon, S van Pelt, *Chem Soc Rev*, 42 (2013) 6223-6235
- [30] J Kim, JW Grate, *Nano Letters*, 3 (2003) 1219-1222
- [31] T Jesionowski, J Zdarta, B Krajewska, *Adsorption*, 20 (2014) 801-821
- [32] J Chomouckaa, J Drbohlavovaa, D Huskab, V Adamb, R Kizekb, J Hubaleka, *Pharmacological Research*, 62 (2010) 144–149
- [33] O Veiseh, JW Gunn, M Zhang, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (2010) 284–304
- [34] V Vicky, M Arthur Cox, S Shah, A Singh, W Bevins, H Parihar, *Appl Nanosci*, 4 (2014) 385–392
- [35] A Macario, F Verri, U Diaz, A Corma, G Giordanoa, *Catalysis Today* 204 (2013) 148–155
- [36] J Govan, YK Gunko, *Nanomaterials*, 4 (2014) 222-241
- [37] NA Kalkan, EA Aksoy, S Aksoy, N Hasirci, *J of Applied Polymer Sci*, 123 (2012) 707–716
- [38] MJ Chaichi, M Ehsani, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015
- [39] GK Kouassi, J Irudayaraj, G McCarty, *J Nanobiotechnol*, 3 (2005) 1–9
- [40] R Konwarh, N Karak, SK Rai, AK Mukherjee, *Nanotechnology*, 20 (2009) 225107, 10
- [41] M Namdeo, SK Bajpai, *J Mol Catal B: Enzymatic*, 59 (2009) 1-3, 134-139
- [42] AK Johnson, AM Zawadzka, LA Deobald, RL Crawford, AJ Paszczyński, *J Nanopart Res*, 10 (2008) 1009–1025
- [43] VG Fernandez, R Brieva, V Gotor, *J Mol Catal B: Enzym*, 40 (2006) 111–20
- [44] JR Heath, *Acc of Chem Res*, 32 (1999) 388-42
- [45] M Shimomura, T Sawadaishi, *Curr O pin Coll and Inter Sci*, 6 (2001) 11-16
- [46] BK Teo, XH Sun, *J of Clust Sci*, 17 (2006) 529-32
- [47] AH Lu, EL Salabas, Ferdi Schüth, *Angewandte Chemie*, 46 (2007) 1222–1244
- [48] DK Kim, Y Zhang, W Voit, KV Rao, M Muhammed, *J Magn Mater*, 225 (2001) 1–2
- [49] E Kálmán, *Magyar Tudomány*, 9 (2003) 1154
- [50] J Kim, JW Grate, P Wang, *Chem Eng Sci*, 61 (2006) 1017 – 1026

[51] G Hellner, Z Boros, A Tomin, L Poppe, *Adv Synth Catal* 2011, 353, 2481–2491