

HETEROGÉN FÁZISÚ ENZIMES REAKCIÓK

HOMOGÉN ENZIMES REAKCIÓK:

- Előnyök:
- a rendszer homogenitása,
 - az enzim - izolálásán kívül –
 - előkészítést nem igényel.

Gazdasági hátrányok:

- Az enzimek drágák, 1-10 \$/mg
- Csak egyszer használhatók fel, a reakció után elvesznek, illetve kinyerésük a reakcióelegyből bonyolult és drága.

Technológiai hátrány:

- szennyezik a terméket, tisztítását nehezítik.



Az enzim immobilizáció története

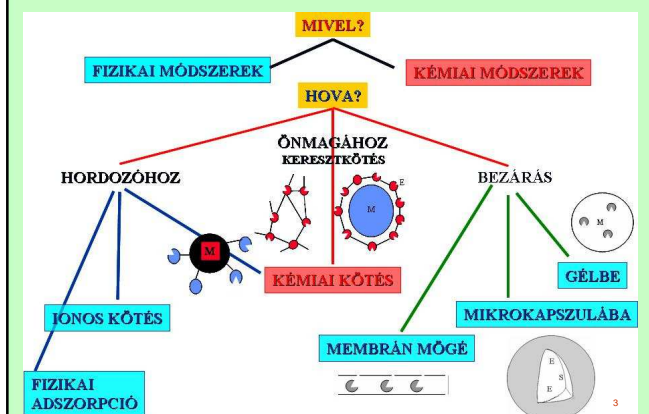
Nelson és Griffin 1916-ban véletlenül fedezte fel, hogy az élesztő invertáza aktív szénen adszorbeálódott, de megőrizte az aktivitását a szaharóz hidrolízisében.

Ipari gyakorlattá, illetve kereskedelmivé akkor vált, amikor Grubhofer és Schleith egy sor enzimet rögzítettek: karboxipeptidázt, diasztázt, pepszint és ribonukleázt. Ezeket diazotálással kötötték poli-aminoszirol gyantára kovalens kötéssel.

Az első ipari alkalmazás Chibata nevéhez fűződik, 1969-ben aminoacilázt rögzített DEAE Sephadex-re ionosan és ezt **N-acyl-D,L-aminosav** rezolválására használták.



Az enzim rögzítés módszerei




Kémiai módszerek

Kovalens kötés a reakció szempontjából nem-esszenciális aminosav-oldallánc és egy vízben nem oldódó, funkciós csoporttal ellátott hordozó mátrix között:

$$\text{—X} + \text{E} \longrightarrow \text{—E} + \text{X}$$

Hordozó:
 természetes polimer: *agar, agaróz, kitin, cellulóz, kollagén,...*,
 szintetikus polimer: *poliuretán, polisztirol, nylon, ...*,
 szervetlen hordozók: *üveg, alumínium, szilikagél, magnetit,...*



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 4

Kémiai módszerek

Kovalens kötés kialakítása:
 szabad α - vagy ω -COOH, α - vagy ω -NH₂ csoportok
 fenil, -OH, -SH vagy imidazol csoportok

Lépések:

1. a hordozó aktiválása: KAR és -X (reaktív csoport) felvitele,
2. a kovalens kötés létrehozása az enzim és az aktivált hordozó között.

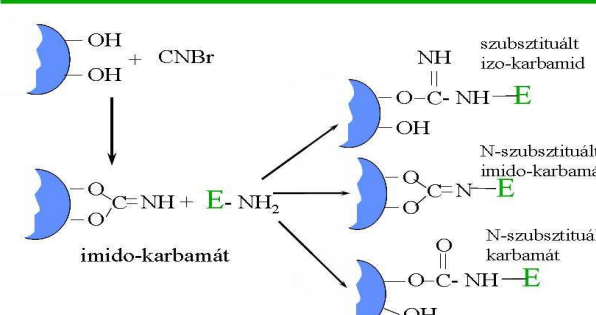
Az aktív centrum védelme: szubsztrát vagy analóg jelenléte



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 5

Kémiai módszerek: brómcian

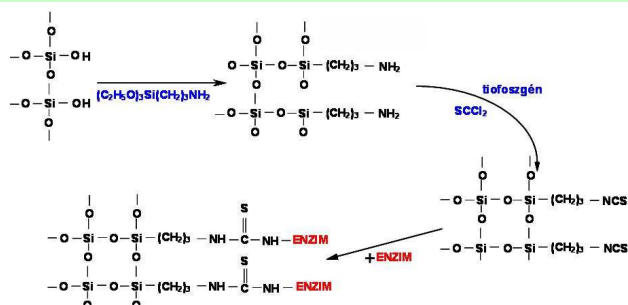
MÁTRIX: vicinális -OH : cellulóz, sephadex sepharose



The diagram illustrates the reaction of a vicinal dihydroxyl group on a matrix (represented by a blue shape) with cyanogen bromide (CNBr). The reaction proceeds through an intermediate imido-carbamate (where the oxygen of one hydroxyl group is bonded to the carbon of the carbonyl group, and the nitrogen is bonded to the other oxygen). This intermediate can then react with an enzyme (E-NH₂) to form three different products:

- szubsztituált izo-karbamid:** The enzyme is attached to the nitrogen of the imido group, and the carbonyl oxygen remains bonded to the matrix oxygen.
- N-szubsztituált imido-karbamát:** The enzyme is attached to the nitrogen, and the carbonyl oxygen is also bonded to the matrix oxygen.
- N-szubsztituált karbamát:** The enzyme is attached to the nitrogen, and the carbonyl oxygen is double-bonded to the carbon, while the matrix oxygen remains bonded to the carbon.

Kémiai módszerek: rögzítés üvegfelületre



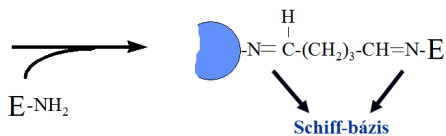
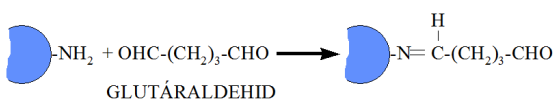
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

Kémiai módszerek: bifunkciós kötés

POLIFUNKCIÓS KÖTÉS

MÁTRIX: -NH_2 csoport : AE-CELLULÓZ, DEAE-CELLULÓZ, KÖLLAGÉN, KITIN, NYLON, stb

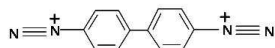


8

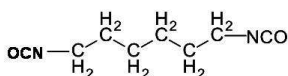
Kémiai módszerek: keresztkötések létrehozása



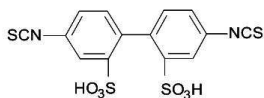
GLUTÁRALDEHID



DIAZOBENZIDIN



HEXAMETILÉN-DIIZOCIANÁT



4,4'-DIIZOCIANÁTO-BIFENIL-2,2'-DISZULFONSÁV

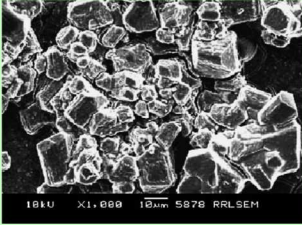
Kémiai módszerek: keresztkötések létrehozása

$$\begin{array}{c}
 \text{OHC} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CHO} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{CH=O} \\ | \\ \text{---CH---C---CH}_2 \text{---CH}_2 \text{---} \end{array} \begin{array}{c} \text{CH=O} \\ | \\ \text{---CH---C---CH}_2 \text{---CH}_2 \text{---} \end{array} \begin{array}{c} \text{CH=O} \\ | \\ \text{---CH---C---CH}_2 \text{---CH}_2 \text{---} \end{array} \\
 \text{GLUTÁRALDEHID} \qquad \qquad \qquad \text{OLIGO-GLUTÁRALDEHID} \\
 \downarrow \text{NH}_2\text{-ENZIM} \\
 \begin{array}{c} \text{CH=O} \\ | \\ \text{CH---C---CH}_2 \text{---CH}_2 \text{---} \end{array} \begin{array}{c} \text{CH=N-ENZIM} \\ | \\ \text{---CH---C---CH}_2 \text{---CH}_2 \text{---} \end{array} \begin{array}{c} \text{CH=O} \\ | \\ \text{---CH---C---CH}_2 \text{---CH}_2 \text{---} \\ | \\ \text{N-ENZIM} \end{array}
 \end{array}$$

Rendszerint inert fehérjével együtt immobilizálják (hordozó) (zselatin, albumin, kollagén, tojásfehérje).


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
10

CLEC: cross-linked enzyme crystals



Scanning electron microscopic view of CLEC laccase
 Surface area 2.456 (m²/g)

Purine nucleoside phosphorylase (PNP)
 Cross-linked Enzyme crystal of PNP



SEM image of PNP crystal surface

BME Alkalmazott Biotechnológia

CLEA: cross-linked enzyme aggregation

CLEA: precipitáció ((NH₄)₂SO₄ vagy BuOH) + keresztkötés
 Kombinálja a tisztítást és a rögzítést
 Glutáraldehid, de.... lehet pl. dextrán-poliallehid

Előnyei:

- Egyszerű és sokféle enzimhez megfelelő módszer
- Tiszta és nem tisztított enzim preparátumokkal is végrehajtható
- Stabilitás hővel, szerves oldószerekkel és proteolízissel szemben
- Nem oldódik vizes környezetben (nem vész el kioldással az aktivitása)
- Combi CLEA: két vagy több enzim együtt immobilizálása

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
12

A kémiai kötés esetleges hatásai



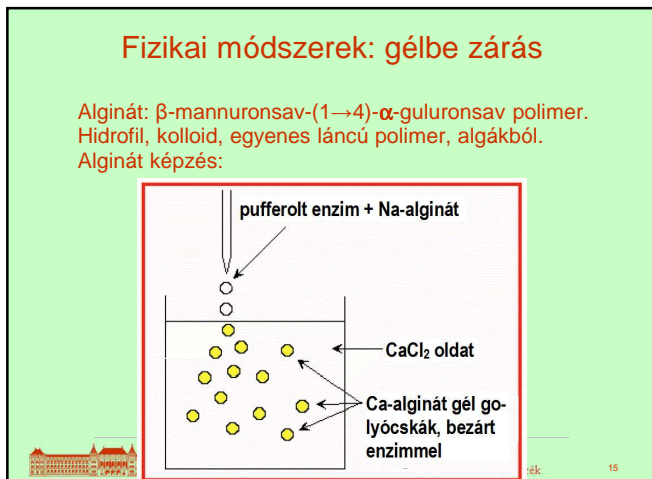
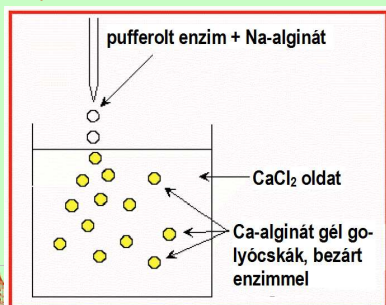
FIZIKAI MÓDSZEREK

1. ADSZORPCIÓ (ioncserélőn – nem specifikus, könnyen leválik (pH))
2. GÉLBE ZÁRÁS
3. MIKROKAPSZULÁZÁS
4. MEMBRÁN „MÖGÉ” ZÁRÁS

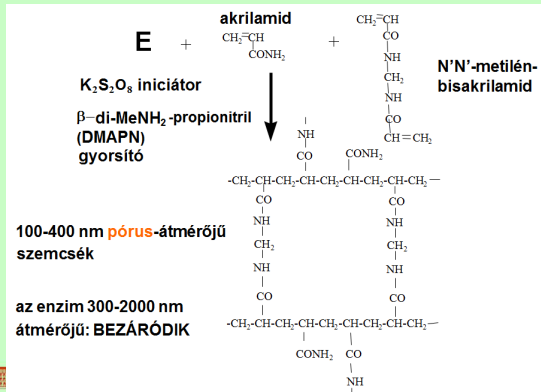


Fizikai módszerek: gélbe zárás

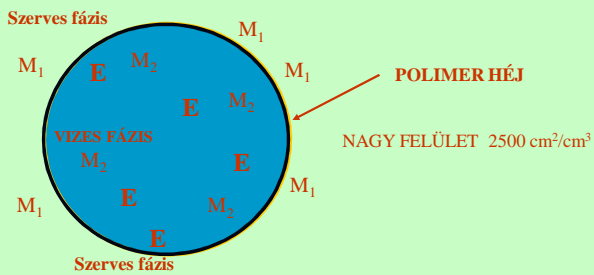
Alginát: β -mannuronsav-(1 \rightarrow 4)- α -guluronsav polimer.
 Hidrofil, kolloid, egyenes láncú polimer, algákból.
 Alginát képzés:



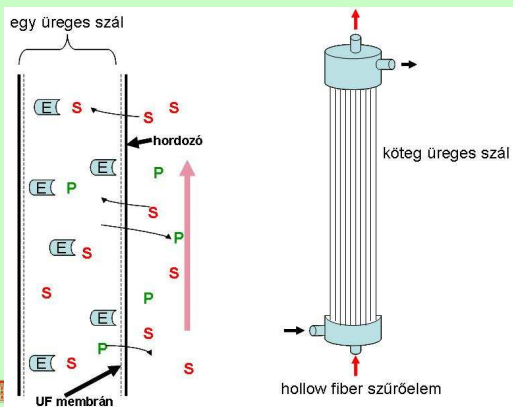
Fizikai módszerek: poli-akrilamid gélbe zárás

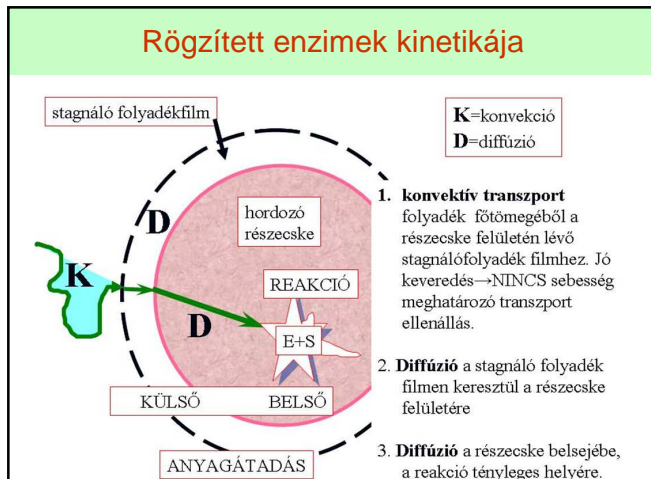


Fizikai módszerek: mikrokapszulázás



Fizikai módszerek: ultraszűrő membránok

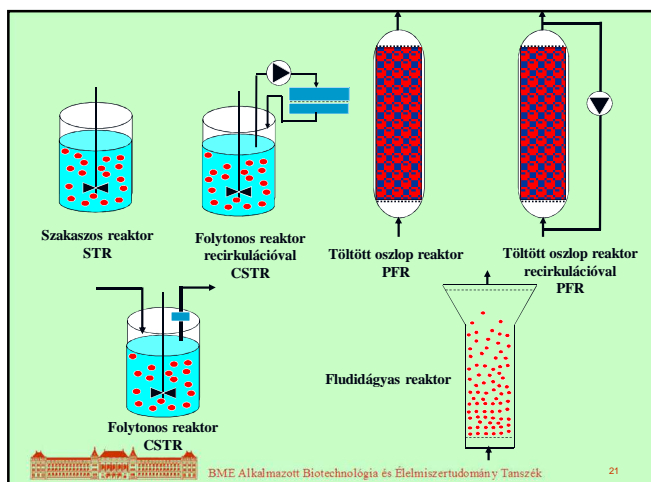




Rögzített enzimek

<p>Oldott enzimek</p> <p>Előnyök</p> <p>Hátrányok</p>	<ul style="list-style-type: none"> * Homogén rendszer * Előkészítés nincs * Csak reakció-rezsim van * Drágák 1-10-50 \$/mg * Elvesznek * A terméket szennyezik * Csak szakaszos technológia
<p>Rögzített enzimek</p> <p>Előnyök</p> <p>Hátrányok</p>	<ul style="list-style-type: none"> * nem szennyezik a terméket * Könnyen elválaszthatók * Újrafelhasználási lehetőség * Folytonos technológia isáltalános előnyei * Könnyű terminálás * Stabilabb lehet * a rögzítés költséges (előkészítés) * Csökken az enzim aktivitása * Diffúziós gát (transzport-rezsim is)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 20



Rögzített enzimek

Aminoaciláz	D,L-aminosavak reszolválása
Glükóz izomeráz	Glükóz → fruktóz konverzió
Penicillin amidáz	Penicillin oldallánc csere
β-galaktózidáz	Tejcurkor hidrolízise (savó)
Lipáz	Zsírok elszappanosítása
Nitril-hidratáz	Akrilnitril → akrilamid
Aszpartáz	L-aszparaginsav előállítás

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 22

Enzimelektrodok: amperometria

Ez voltaképpen egy oldott oxigén mérő elektród, amelyre a membránok közé glükóz-oxidázt és katalázt rögzítettek. A két enzim által termelt oxigént méri amperetriásan az elektróda.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 23

Enzimelektrodok: potenciometria

penicillinG $\xrightarrow{\text{penicillináz}}$ penicilloinsav + H⁺

Lipid + víz $\xrightarrow{\text{lipáz}}$ Glicerín + zsírsav + H⁺

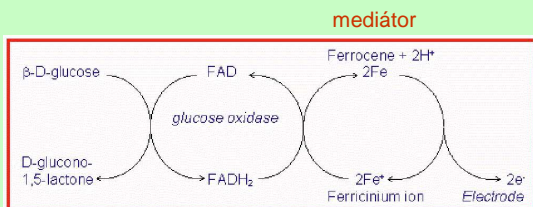
L-Asav + O₂ + H₂O $\xrightarrow{\text{L-aminosav-oxidáz}}$ ketosav + NH₄⁺ + H₂O₂

L-Asn + víz $\xrightarrow{\text{L-aszparagináz}}$ L-Asp + NH₄⁺

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 24

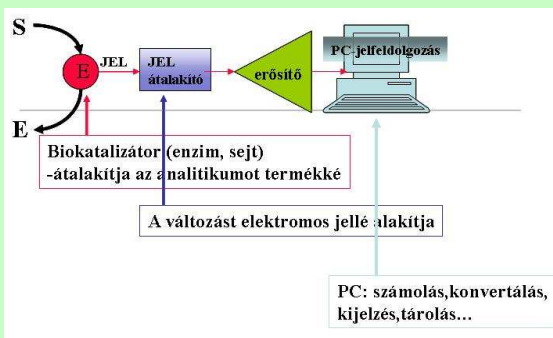
Enzimelektrodok: elektronátadás

Ha az enzim reakció során elektronátmenet történik (NAD-, FAD-mediált reakciók), az elektronátadás közvetlenül mérhető jellé alakítható:



25

BIOSZENZOR



26
