

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.



Kémiai módszerek

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



Hordozó:

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



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-aminosztírol gyantára kovalens kötéssel.

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



Kémiai módszerek

Kovalens kötés kialakítása:

szabad α - vagy ω -COOH, α - vagy ω -NH₂ csoportok
 fenil, -OH, -SH vagy imidazol csoportok

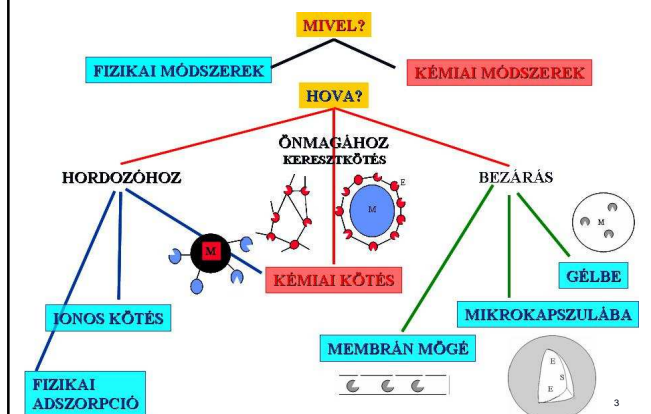
Lépések:

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

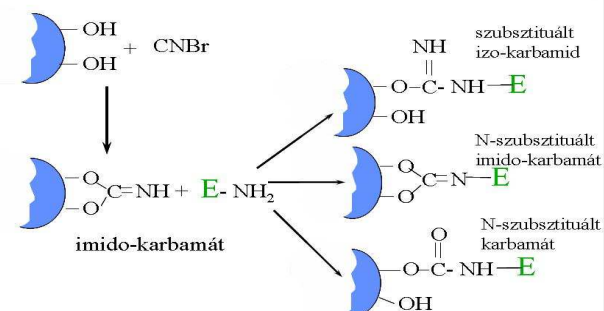


Az enzim rögzítés módszerei



Kémiai módszerek: brómcian

MÁTRIX: **vicinális -OH** : **cellulóz, sephadex, sepharose**



Kémiai módszerek: rögzítés üvegfelületre

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 7

Kémiai módszerek: keresztkötések létrehozása

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 10

Kémiai módszerek: bifunkciós kötés

POLIFUNKCIÓS KÖTÉS
MÁTRIX: -NH₂ csoport : AE-CELLULÓZ, DEAE-CELLULÓZ, KOLLAGÉN, KITIN, NYLON, stb

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 8

CLEC: cross-linked enzyme crystals

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

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Kémiai módszerek: keresztkötések létrehozása

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

CLEA: cross-linked enzyme aggregation

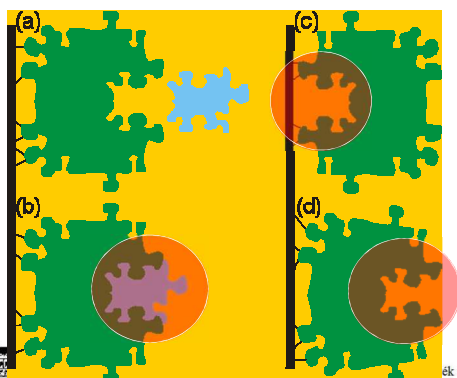
CLEA: precipitáció ((NH₄)₂SO₄ vagy BuOH) + keresztkötés
Kombinálja a tisztítást és a rögzítést
Glutaraldehyd, de... lehet pl. dextrán-poliáldehyd

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

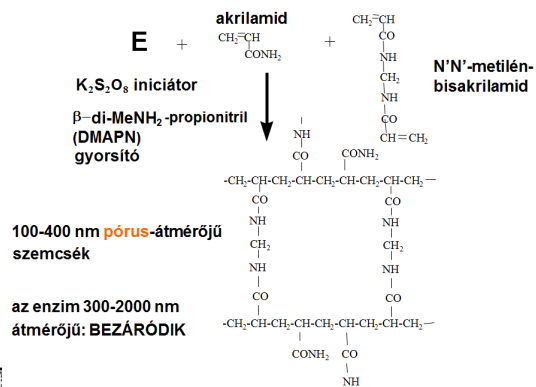
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 12

A kémiai kötés esetleges hatásai



13

Fizikai módszerek: poli-akrilamid gélbe zárás



16

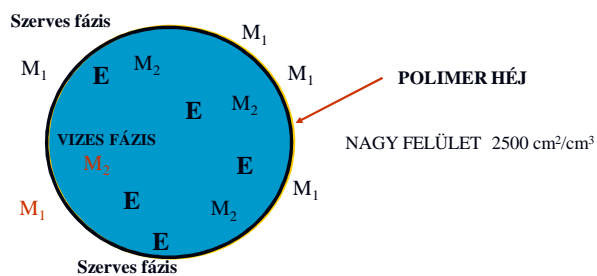
FIZIKAI MÓDSZEREK

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

Fizikai módszerek: mikrokapszulázás

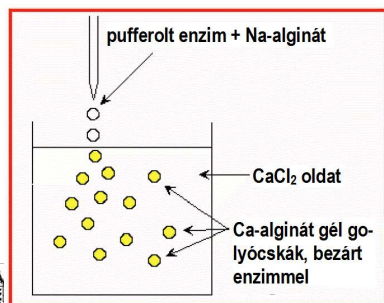


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

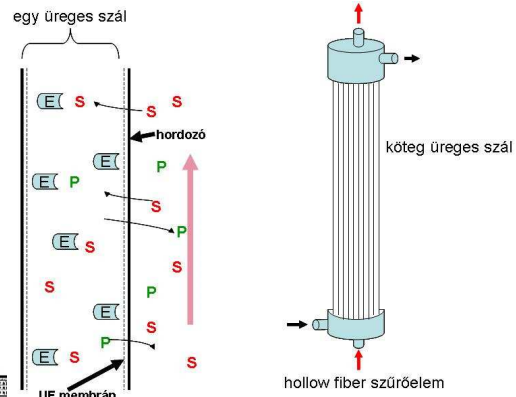
Fizikai módszerek: gélbe zárás

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

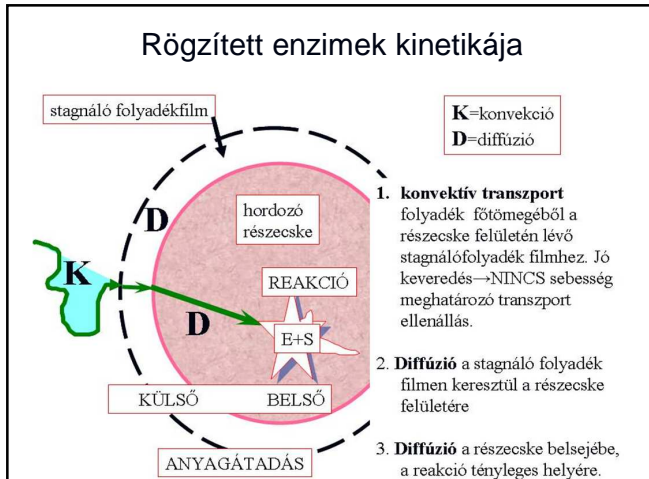


15

Fizikai módszerek: ultraszűrő membránok



18



Rögzített enzimek

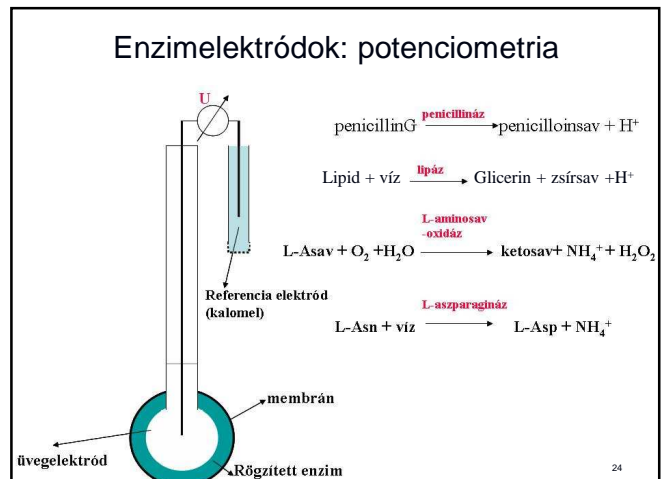
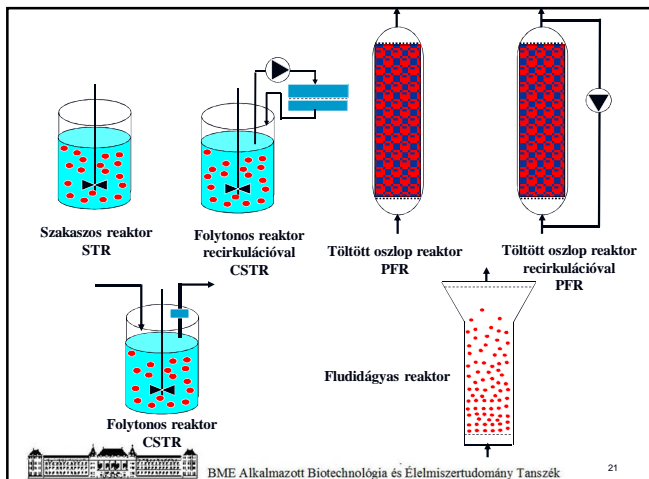
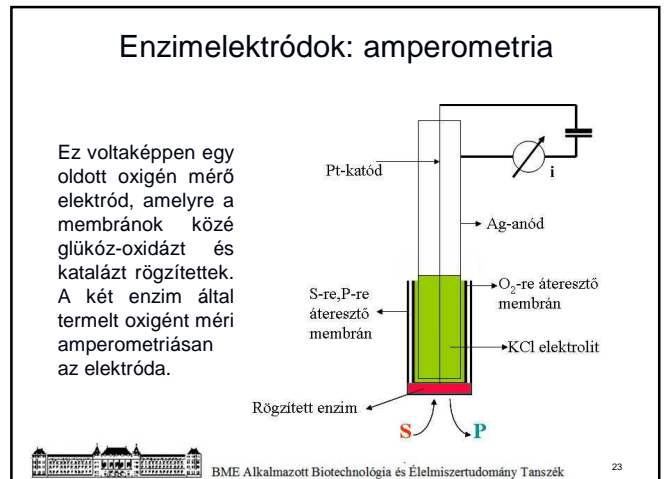
Aminoaciláz	D,L-aminosavak reszolválása
Glükóz izomeráz	Glükóz → fruktóz konverzió
Penicillin amidáz	Penicillin oldallánc csere
β-galaktózidáz	Tejcuror hidrolízise (savó)
Lipáz	Zsírok elszappanosítása
Nitril-hidratáz	Akrilnitril → akrilamid
Aszpartáz	L-aszparaginsav előállítás

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 22

Rögzített enzimek

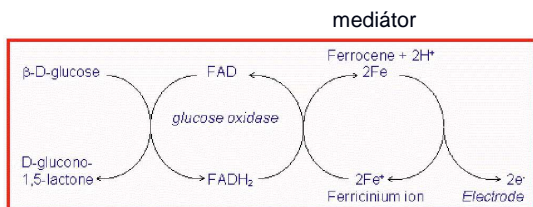
Oldott enzimek	
Előnyök	<ul style="list-style-type: none"> * Homogén rendszer * Előkészítés nincs * Csak reakció-rezsim van * Drágák 1-10-50 \$/mg * Elvesznek * A terméket szennyezik * Csak szakaszos technológia
Hátrányok	
Rögzített enzimek	
Előnyök	<ul style="list-style-type: none"> * nem szennyezik 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)
Hátrányok	

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 20



Enzimelektrodok: elektronátadás

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



BIOSZENZOR

