



Szelektív szol-gél enzimrögzítési eljárások fejlesztése mágneses nanorészecskékre

Zrinyi Anna

Vegyésszmérnöki MSc – Analitikai és szerkezetvizsgálati szakirány

TDK dolgozat

Témavezető: Dr. Bell Evelin, egyetemi adjunktus

Konzulens: Alács Bálint, PhD hallgató

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Szerves Kémia és Technológia Tanszék

2024



Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném megköszönni a témavezetőmnek, Dr. Bell Evelinnek és a konzulensemnek, Alács Bálintnak a rengeteg segítséget és támogatást, valamint, hogy a közös munka mindig jókedvűen telt.

Nagy köszönettel tartozom a barátaimnak, akik nélkül sokkal nehezebbek lettek volna az itt eltöltött fél éveim. Különösen köszönöm Kohán Zsófia Emmának, a szobatársamnak, akinél jobb barátnőt nem is kívánhatnék. Szeretném még megköszönni a barátomnak, Galacz Dánielnek a folyamatos biztatást, valamint családomnak, hogy támogatnak a tanulmányaimban.

Hálával tartozom a teljes Bioorganikus Kémiai Kutatócsoport minden tagjának a laborban eltöltött vidám napokért.

Jelen kutatás megkezdéséhez az **EKÖP-24-2** pályázata nyújt anyagi támogatás, melyet ezúton is szeretnénk megköszönni, és a dolgozat beadásával kötelező pályázati vállalásunknak is eleget tenni.

Tartalom

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezető.....	7
2. Célkitűzés.....	8
3. Irodalmi áttekintés	10
3.1. Enzimekről általánosan.....	10
3.2. Enzimek rögzítése.....	12
3.2.1. Enzimirögzítésről általánosan (nem feltétlen kell külön fejezet cím)	12
3.2.2. Szelektív enzimirögzítés fémionaffinitás-komplexben.....	15
3.2.3. Enzimek mártixba zárása	16
3.3. Transzaminázok.....	16
3.3.1. Felhasználás	18
3.3.2. Vf-S transzamináz	20
3.4. Mágneses nanorészecskék	20
3.4.1. Előállítás	21
3.4.2. Felületmódosítás	22
4. Módszerek.....	24
4.1. Felhasznált anyagok	24
4.2. Alkalmazott eszközök.....	24
4.3. Alkalmazott vizsgálati módszerek.....	24
4.4. Alkalmazott számítási módszerek	26
4.4.1. Aktivitásmérés spektrofotometriás úton	26
4.5. Alkalmazott oldatok, pufferek összetétele.....	27
4.6. Felületmódosítási és rögzítési eljárások	29
4.6.1. Mágneses nanorészecske előállítása	29
4.6.2. Mágneses nanorészecske bevonása	29
4.6.3. Mágneses nanorészecske felületmódosítása aminoszilánokkal.....	30
4.6.4. Aminocsoportok mennyiségi meghatározása ninhidrin kolorimetriás módszerrel.....	31
4.6.5. Mágneses nanorészecske felületmódosítása EDTA-dianhidriddel és Co ²⁺ -ionokkal	31
4.6.6. Hisztidinjelölt enzim komplexképzése és a biokatalizátor stabilizálása TEOS-sal.....	32
4.6.7. Hisztidinjelölt enzim komplexképzése és a biokatalizátor stabilizálása TMOS-sal	33

4.6.8.	Hisztidinjelölt enzim komplexképzése és a biokatalizátor stabilizálása TEOS-sal koszolvens nélkül és különböző szerves koszolvensek alkalmazása mellett	34
4.6.9.	Stabilizált biokatalizátorok vizsgálata α -metilbenzilamin átalakításában	35
5.	Eredmények és értékelésük	36
5.1.	Mágneses nanorészecskék előállítása és felületmódosítása	36
5.2.	Szilikaréteg vastagságának optimalizálása	37
5.3.	Szerves oldószerek hatásának vizsgálata	39
5.4.	TMOS alkalmazása TEOS helyett	41
5.5.	TEOS mennyiség optimalizálása pufferben	42
5.6.	Enzimszivárgás vizsgálata	45
6.	Összefoglalás	47
	Irodalmi hivatkozások	49

Rövidítések jegyzéke

A TDK dolgozatomban előforduló rövidítések

ACN	acetonitril
AeAPrTMOS	[3-(2-aminoetil-amino)]propil-trimetoxiszilán
AeAPrMeDMOS	[3-(2-aminoetil-amino)]propil-dimetoxi-metilszilán
ANTA	<i>Nα,Nα</i> -bisz(karboximetil)-L-lizin
APrTMOS	(3-aminopropil)trimetoxiszilán
APS	ammónium-perszulfát (ammónium-peroxo-diszulfát)
c_t	adott időpontban mért termék koncentráció $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}}\right]$
c_s^0	kiindulási szubsztrát koncentráció $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}}\right]$
CLEAs	keresztkötött enzimaggregátumok (Cross-Linked Enzyme Aggregates)
Δt	eltelt idő [perc]
DLS	dinamikus fényszórás (Dynamic Light Scattering)
DMF	dimetil-formamid
DMSO	dimetil-szulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	enzim bizottság (Enzyme Commission)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
HEPES	2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etánszulfonsav
HS	nagy koncentrációjú sóoldat (High Salt)
IDA	iminodiecetsav
IMAC	rögzítettfémoonaffinitás-kromatográfia (Immobilized Metal ion Affinity Chromatography)
IPA	2-propanol
LS	alacsony koncentrációjú sóoldat (Low Salt)
m_B	biokatalizátor tömege [g]
MRI	mágneses rezonancia képalkotás
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

TA	transzamináz
TEOS	tetraetoxi-szilán
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilén-diamin
TMOS	tetrametoxi-szilán
TRISZ	tris(hidroximetil)aminometán
U	aktivitás $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}}\right]$
U_B	biokatalitikus aktivitás $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}\times\text{g}}\right]$
UV	ultraibolya tartomány (Ultra Violet)
V	reakciótérfogát [ml]
V_f	<i>Vibrio fluvialis</i>

1. Bevezető

Napjainkban a biotechnológia egyre fontosabbá válik az egészségünk védelmére szolgáló termékek gyártásában, a vegyipari alapanyag- és közttermékgyártásban, valamint a zöld technológiákban. Ez részben annak köszönhető, hogy a vegyipari vállalatoknak szigorú környezetvédelmi előírásoknak kell megfelelniük, amik magas költségeket vonhatnak maguk után. Másfelől fenntarthatóbb gazdaságpolitikai lépéselőnyt nyújthatnak ezek a termékek versenytársaikkal szemben.

Biokatalizátorok alkalmazásával a kedvezőtlen reakciókörülmények (pl. szélsőséges pH, magas nyomás, hőmérséklet), nemkívánatos melléktermékek képződése, valamint a mérgező katalizátorok használata elkerülhető. A biztonságtechnikai szempontok mellett a gazdasági előny sem elhanyagolható. Sok esetben ugyanis számos drága elválasztási és tisztítási művelet elhagyható alkalmazásuknak köszönhetően.

A kiválasztott organizmusban (pl. baktérium, élesztő) a katalízisért felelős rész (pl. enzimek) képes regio-, sztereo-, és enantiomerszelekív katalízisre. A sejten belüli enzimreakciók jelentős hátránya azonban, hogy gyakran mellékreakciókhoz vezethet, valamint a szubsztrát és a termék diffúziója is gátolt lehet. A fehérjeizoláció során számos tisztítási műveletet kell elvégezni, illetve ismételt felhasználásukhoz ki kell nyerni őket a reakcióelegyből. Ezek mind jelentős költségnövekedést okozhatnak.

Ezen problémák kiküszöbölhetők a célenzim szilárd hordozóra történő rögzítésével. Így növelhető a biokatalizátor stabilitása, a reakcióelegytől való szeparálása könnyen megvalósítható (pl. szűréssel), élettartama megnő, többször is felhasználhatóvá válik. Ezt egy szelektív enzimtisztítási lépéssel ötvözve, költséghatékonyabb biokatalizátor gyártást érhető el.

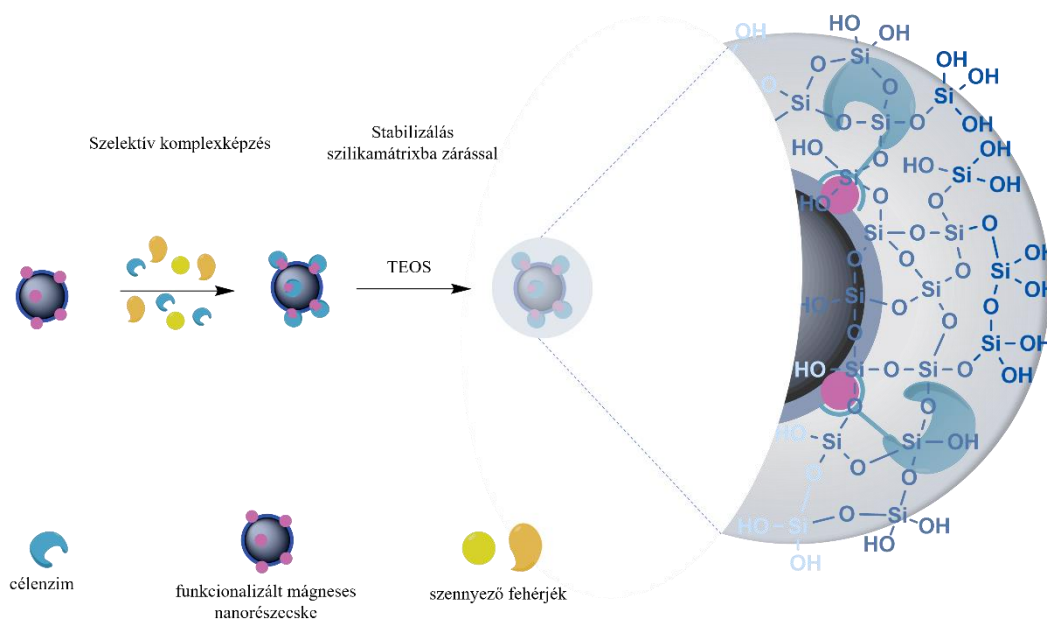
TDK dolgozatomban, egy biokatalizátor fejlesztést és optimalizálást mutatok be *Vibrio fluvialis* (S)-szerektív ω -transzamináz enzim felhasználásával.

2. Célkitűzés

A TDK munkám célja egy olyan eljárás kifejlesztése, mellyel transzamináz enzimek gyors és szelektív rögzítése valósítható meg. Hordozóként, a felületen szelektivitásért felelős fémionokat tartalmazó, mágneses nanorészecskéket (MNP-t) alkalmaztam.

A felületi tulajdonságok befolyásolására három, különböző oldalláncú aminoszilán hatását terveztem vizsgálni. Ennek minősége (lánc hosszúság, elágazások) ugyanis jelentős szerepet játszhat a végső biokatalizátor aktivitásában. A későbbiekben az aminoszilánt más, a szilánokkal keverve (pl: fenil-, vagy metilcsoportokat tartalmazó) tovább optimalizálható a felület és magasabb biokatalitikus aktivitás érhető el. A szelektivitást az IMAC módszer elvén az átmenetifémiont komplexáló etilén-diamin-tetraecetsav-dianhidridből kialakított csoportok biztosították. A rögzítési folyamat első lépéseként a hisztidinjelölt transzamináz komplexet képez ezzel a csoporttal. A folyamathoz nem szükséges az enzim előzetes tisztítása, elvégezhető a fermentáció végén kapott fehérjekeverékből.

Az így kialakított enzimmészítmény stabilitása azonban még nem túl magas, hiszen az enzim könnyedén kiszorulhat a komplexből, akár olyan szubsztrátok hatására is melyek képesek fémionokat komplexálni, mint például a két hidroxicsoportot *orto*- vagy *meta*-helyzetben tartalmazó aromás gyűrűvel rendelkező vegyületek.^[1] Ennek hatására a katalizátor elvesztheti aktivitását, valamint a reakcióelegy szennyeződik a fehérjével.



2.1. ábra: A tervezett enzimmegkötési módszer összefoglaló ábrája.

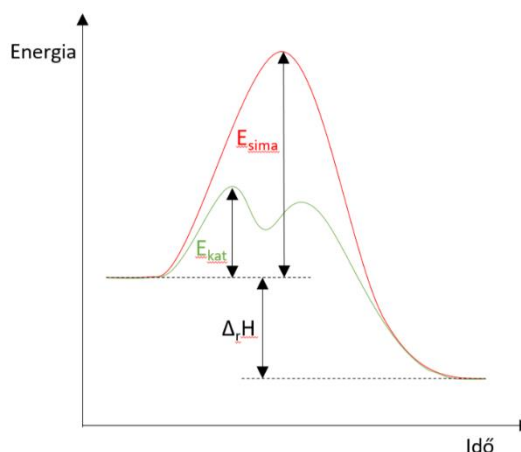
Munkám fő célja az volt, hogy utólagos stabilizálásként az MNP és a rögzített enzim köré szol-gél mátrixot alakítsak ki, és optimalizáljam a kialakításához szükséges prekursor komponensek mennyiségét és arányát, hogy a térháló szerkezete megfelelő legyen. Ezáltal az enzim nem szivárog, de a szubsztrát és a termék diffúziója könnyen megvalósul. A Kutatócsoportban korábban fenilalanin ammónia-liáz enzimmel végeztek hasonló rögzítési kísérleteket, viszont abban az esetben nem történt meg a különböző aminoszilánok vizsgálata, valamint a mágneses nanorészecske felületi optimalizálása. Munkám elején ezen korábbi tapasztalatok alapján indultam el a transzamináz enzim rögzítésével.

Az elkészült biokatalizátorokat α -metilbenzilamin átalakításában vizsgáltam, amelyből keletkező acetofenon UV-ban jól detektálható. Vizsgáltam a katalizátorok többszöri felhasználását, megfigyelve az aktivitás és a katalizátor mennyiségének csökkenését. Ezt mind a szol-gél mátrixba zárt, mind pedig az utólagosan nem stabilizált katalizátorokkal is elvégeztem, a rámutatva ezzel a stabilizálás előnyeire.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Enzimekről általánosan

Az enzimek az élő szervezetek katalizátorai, melyek építőelemei elsősorban aminosavak. Katalízis során csökkentik az adott kémiai reakció(k) aktiválási energiáját (3.1. ábra). Emiatt a katalizált folyamatok könnyebben eléri az egyensúlyi állapotot. Azonban az enzimek az egyensúlyt nem befolyásolják, jelenlétükben nem képződik több termék a katalizátor nélküli reakcióhoz képest.



3.1. ábra: Reakció energiadiagramja biokatalizátorral (zöld) és anélkül (piros).

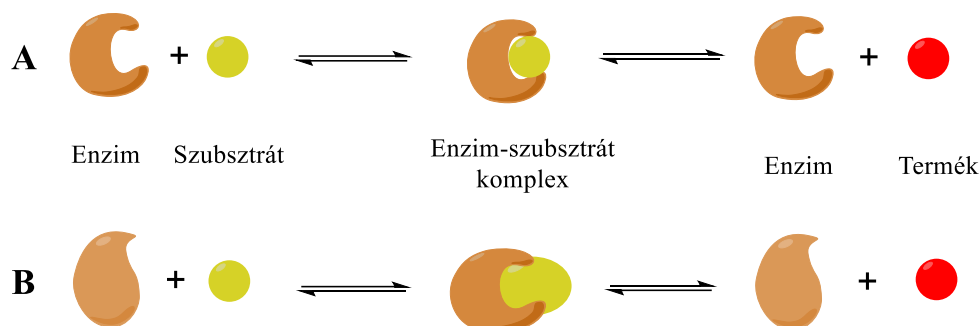
A nemzetközi Enzim Bizottság (Enzyme Comission) osztályozásukat az általuk katalizált reakció alapján végezte el, mely szerint hét fő csoportba sorolhatók (3.1. táblázat). Az általam alkalmazott enzimek a transzferázok osztályába (EC2) tartoznak, amelyekről a későbbiekben részletesen beszámolok.

3.1. táblázat: Enzimek osztályozása

EC szám	Enzimesalád	Katalizált reakció	Példa
EC1	Oxidoreduktázok	redoxreakció	dehidrogenázok
EC2	Transzferázok	funkciós csoportok átvitele	transzaminázok
EC3	Hidrolázok	nagy molekula két kisebbé alakítása (általában vízzel)	lipázok, foszfatázok
EC4	Liázok	nem hidrolízises addíció vagy elimináció	ammónia-liázok
EC5	Izomerázok	konstitúció vagy konfiguráció változtatás	aminomutázok
EC6	Ligázok	új kötések kialakítása	piruvát-karboxiláz
EC7	Transzlokázok	membránon átvittetés	transzporter fehérjék

Az enzimek működési mechanizmusának leírásáról szóló első elméletét *E. Fischer* dolgozta ki 1894-ben. Ez alapján az enzim és a szubsztrát komplementerei egymásnak, tehát a reakció kiindulási anyaga tökéletesen illeszkedik az enzim aktív centrumába. Emiatt szokták kulcs/zár elméletnek is nevezni (3.2. ábra A). Bár ez az elmélet bizonyos részeit jól leírja a

mechanizmusnak (pl. szubsztrátspecifitás), azonban több szempontból sem ad kielégítő választ. Ezzel szemben a *Daniel Koshland* által kidolgozott indukált illeszkedés elmélete több aspektusát is lefedi a működési mechanizmusnak. Eszerint az enzim képes a szubsztrát alakjához igazodni, ha az megfelelő pozícióban közelíti meg (3.2. ábra B).^[2]



3.2. ábra: Kulcs/zár elmélet (A) és indukált illeszkedés (B).

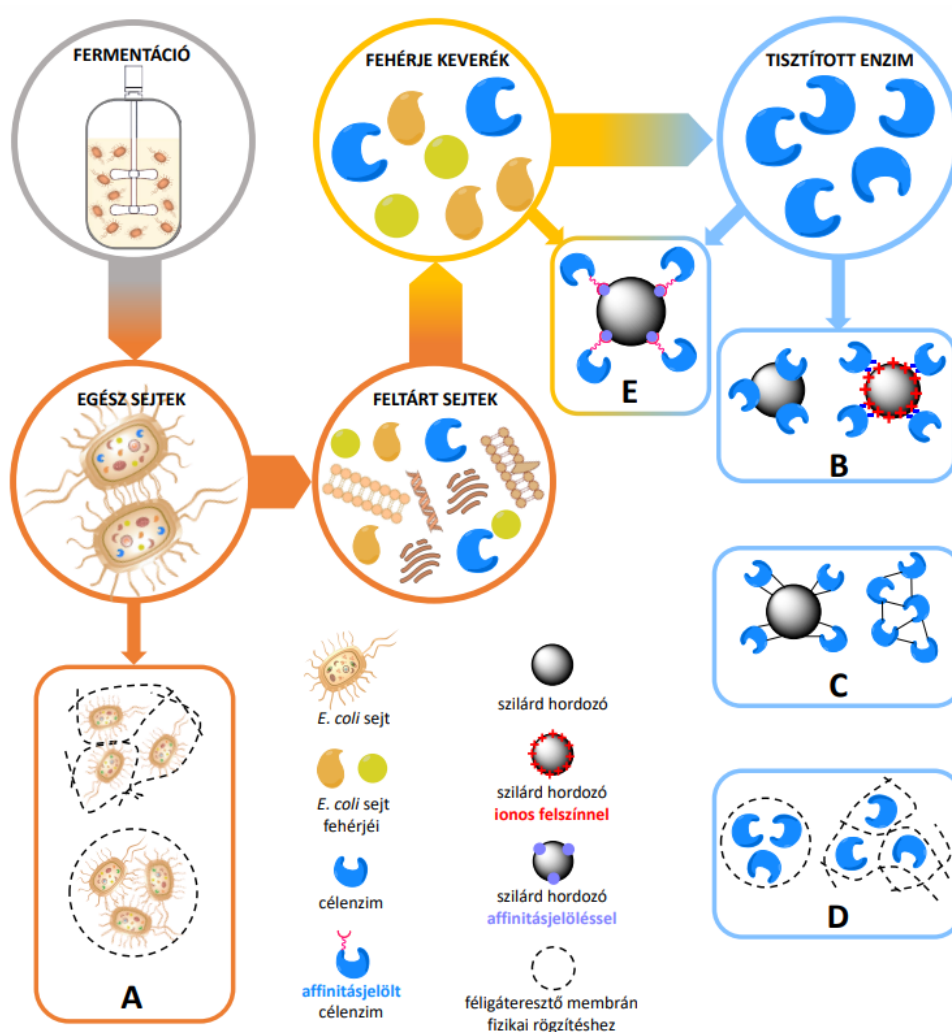
Az élelmiszeriparban évszázadok óta alkalmazzák az enzimeket az azokat tartalmazó élesztők és baktériumok formájában.^[3] Alkalmazásuk egyre szélesebb körű számos előnyüknek köszönhetően. Többek között a gyógyszer- és papíriparban is gyakran felhasználják őket. Egyik jelentős előnyük, hogy regio-, sztereo- és enantiomerszelektivitásuk miatt magas tisztaságú termék állítható elő velük. Az általuk katalizált reakciók enyhe körülmények (pl. vizes közeg, szobahőmérséklet) között mennek végbe, valamint biológiailag lebomlók. Azonban előállításuk, tisztításuk, tárolásuk és kinyerésük az ismételt felhasználáshoz magas költségeket jelenthet.^[4] Az iparban alkalmazott reakciókörülmények között (pl. szerves oldószer) jelentősen csökkenhet az aktivitásuk. E két problémára megoldást nyújthat a felhasználni kívánt enzim rögzítése. Különösen, ha a módszer kellően szelektív ahhoz, hogy egy lépésben lehessen tisztítani és rögzíteni is a célenzimet. Így a teljes katalizátor előállítási költsége alacsonyabb, az enzim stabilitása növekszik, valamint az ismételt felhasználáshoz egyszerűbb kinyerni a hordozóval együtt a reakcióelegyből.^[5]

Enzimek előállítása fermentációval valósítható meg, mely két fő szakaszból áll: „*up- és downstream processing*”. Előbbi foglalja magába az előkészítést és a szaporítást, ami a termékképzés végéig tart. Ezt követi az utóbbi szakasz, mely során izoláljuk a felhasználni kívánt enzimet.^[6]

3.2. Enzimek rögzítése

3.2.1. Enzimirögzítésről általánosan (nem feltétlen kell külön fejezet cím)

A rögzített enzimek jelentős előnye, hogy sokkal stabilabbak a környezeti hatásokkal szemben. Szélesebb pH- és hőmérséklet-tartományban alkalmazhatók, szerves oldószer jelenléte sem zavarja működésüket. Olykor még az aktivitásuk is nő a rögzítés hatására. Emellett kellően szelektív eljárást kialakítva a célenzim egy lépésben tisztítható és rögzíthető, ami csökkentheti az előállítás időigényét és költségeit. További előnye még, hogy a reakcióelegyből egyszerűen eltávolítható például szűrés vagy mágnes alkalmazásával. Ezzel párhuzamosan a reakció leáll, tehát annak szabályozása is könnyebbé válik.^[5,7]



3.3. ábra: Rögzített biokatalizátor előállításának lehetőségei az enzimtermelés különböző fázisaiban.

A: termelő sejtek rögzítése mátrixba zárással; B: fizikai adszorpciós módszerek;

C: kovalens enzimirögzítés; D: enzim mátrixba zárása;

E: affinitás kölcsönhatásokon alapuló szelektív enzimirögzítési módszerek.^[8]

A termelés során több alkalommal is van lehetőség rögzített enzimkészítmény előállítására (3.3. ábra). Közvetlenül a fermentáció végén rögzíthetjük a termelő sejteket, ami általában valamilyen polimermátrix kialakításával történik (3.3. ábra A). Ebben az esetben a mátrix tulajdonságait úgy befolyásolják, hogy a szubsztrát és a termék számára átjárható legyen, de a sejtek számára ne.^[9] A módszerrel elkerülhetők a további feldolgozási lépések, azonban számos problémát rejt magában. Ha a célenzim nem a sejtmembránban helyezkedik el, hanem a sejten belül, akkor a szubsztrát nehezebben, további diffúziós gátak legyőzésével tudja csak megközelíteni. Ilyen esetekben érdemes izolálni a felhasználni kívánt enzimet.^[10]

A rögzítési technikák egyik csoportja tartalmazza a fizikai kölcsönhatásokon alapuló módszereket. Ezek közé tartozik például az adszorpciós rögzítés, mely során a célenzim másodlagos kölcsönhatásokkal kapcsolódik a hordozóhoz (3.3. ábra B). Ehhez általában a kiválasztott hordozó felületét módosítani kell, hogy a kívánt kölcsönhatás létrejöhessen.^[11] Szintén ebbe a csoportba sorolható, ha az enzimet polimer mátrixba zárjuk ahogyan a termelő sejtek esetén is (3.3. ábra D). Szol-gél rendszerekkel ez könnyedén elvégezhető. Ezek összetételét ugyanis egyszerűen igazíthatjuk a célenzimhez, hogy aktivása optimális legyen, valamint a szubsztrát és a termék diffúziója is könnyen megvalósulhasson.^[12] További lehetőség még, ha ionos kötések kialakításával (3.3. ábra B) vagy affinitásalapú kölcsönhatásokkal (3.3. ábra E) rögzítjük az enzimet a hordozóhoz. Fizikai módszerek alkalmazása során az enzim szerkezete nem változik, így az aktivitása is jobban megőrizhető. Jelentős hátrányuk azonban, hogy az enzim könnyen leválhat a hordozó felületéről a gyenge kapcsolódás miatt.^[11] Ezt okozhatja például az alkalmazott pH, ionkoncentráció, detergens vagy olyan vegyület jelenléte, mely az affinitásalapú kölcsönhatásból kiszorítja az enzimet.

A másik csoportba a kémiai rögzítési módszerek tartoznak, melyek alkalmazásával az enzimszivárgás kiküszöbölhető. Ennek egyik formája, ha a felhasználni kívánt enzimet kovalens kötással rögzítjük a hordozóhoz (3.3. ábra C). Így az enzim sokkal ellenállóbb lesz a környezeti hatásokkal szemben, melyek a szerkezetében változásokat idéznének elő (pl. magas hőmérséklet). Ezáltal az aktivitása megmarad, ha megfelelő pozícióban rögzült. Ezt az enzim felületén található csoportok, illetve a hordozón elvégzett felületmódosítások befolyásolják. A módszerhez gyakran alkalmaznak epoxicsoportokat, mely több, nukleofil csoporttal is képes kovalens kötést kialakítani az enzim felszínén (pl. lizin oldallánca). Ezen kötések lassan alakulnak ki, ami a módszer egyik jelentős hátránya, de a hordozó felületének további módosításával lehet rajta javítani.^[13]

Kovalens kötés kialakítható két enzimmolekula között is a megfelelő bifunkciós vegyülettel, például glutáraldehiddel. Ezeket keresztkötött enzimaggregátumoknak (CLEAs) nevezzük (3.3. ábra C). Az ilyen típusú enzimkészítmények létrehozása nagytisztaságú enzim nélkül megvalósítható.^[14] Azonban magas enzimigényű, ami rendkívül költséges eljárásá teszi. A biokatalizátorokat gyakran nehezen lehet kinyerni a reakcióelegyből centrifugálással a végső tömegük miatt. Ezen a keresztkötő vegyület arányának változtatásával lehet javítani bizonyos mértékben.^[15]

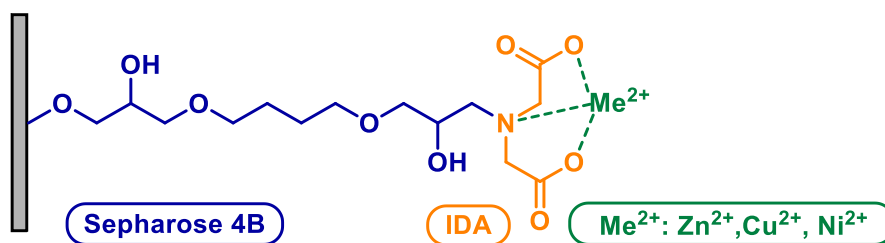
A rögzítési módszer és a hordozó kiválasztásánál számos szempontot figyelembe kell venni: célenzim tulajdonságai; körülmények a felhasználás során; az adott rögzítési eljárás előnyei, hátrányai (3.2. táblázat). Az egyes módszereket gyakran szokták kombinálni egymással, hogy mindkét technológia előnyeit kihasználják. Ilyenek például a komplexált fémionokat és epoxicsoportokat tartalmazó kevert felületű hordozók.^[16,17] Ebben az esetben a komplexképzéssel magasfokú szelektivitás érhető el a rögzítési folyamatban, míg a kovalens kötéssel a biokatalizátor stabilitása növelhető.

3.2. táblázat: Enzimirögzítési eljárások előnyei és hátrányai.

	Előny	Hátrány
	Mátrixba zárás	
Fizikai	Nincs enzimszivárgás, szabad konformációváltozás	Jelentős diffúziós gát, szerves oldószer a mátrixképzés során
	Adszorpció	
	Egyszerű kivitelezés, regenerálható hordozó, szabad konformációváltozás	Gyengébb kötődés, enzimleemosódás
	Ionos kölcsönhatás	
	Regenerálható hordozó, szabad konformációváltozás	Meghatározott pH és ionkoncentráció a rögzítéshez, ionos szubsztrátok megkötődése
Kémiai	Affinitás kölcsönhatás	
	Szelektív és orientált kötődés, regenerálható hordozó	Összetettebb felület szükséges, kompetitív elúció veszélye
	Keresztkötött enzimaggregátumok	
	Nem igényel hordozót, könnyen megvalósítható	Gyenge mechanikai tulajdonságok, nagy enzimigény, lehetséges inaktiválódás kicsapáskor
	Kovalens rögzítés szilárd hordozóhoz	
	Stabil rögzítés, nincs enzimszivárgás, egyszerű felület, jobb diffúzió	Enzim konformációváltozásai nehezebben mennek végbe, inaktiválódás veszélye

3.2.2. Szelektív enzímrögzítés fémionaffinitás-komplexben

Az eredetileg fehérjék tisztítására kifejlesztett fémionaffinitás-kromatográfiát (IMAC) ma már gyakran alkalmazzák rögzített enzimkészítmények előállítására is. *Porath* és munkatársai által elvégzett kísérletek arra mutatnak rá, hogy a legerősebb kölcsönhatást a felületen található átmeneti fémionokkal hisztidin vagy cisztein csoportot tartalmazó fehérjék hozták létre.^[18] A kísérleteket agaróz alapú gyantán valósították meg, melyhez a fémion iminodiacetsavval komplexet alkotva kapcsolódott (3.4. ábra). A legerősebb kölcsönhatást a Cu^{2+} ionnal érték el, de más fémionokkal is sikerült megkötni a fehérjéket. A módszerrel lehetővé vált a különféle fehérjék szelektív és effektív tisztítása.^[18] Ezt később kiegészítették további fémionok vizsgálatával is (pl. Ni^{2+}), melyekhez a hisztidinjelölt fehérjék kötődtek a legjobban.^[19]

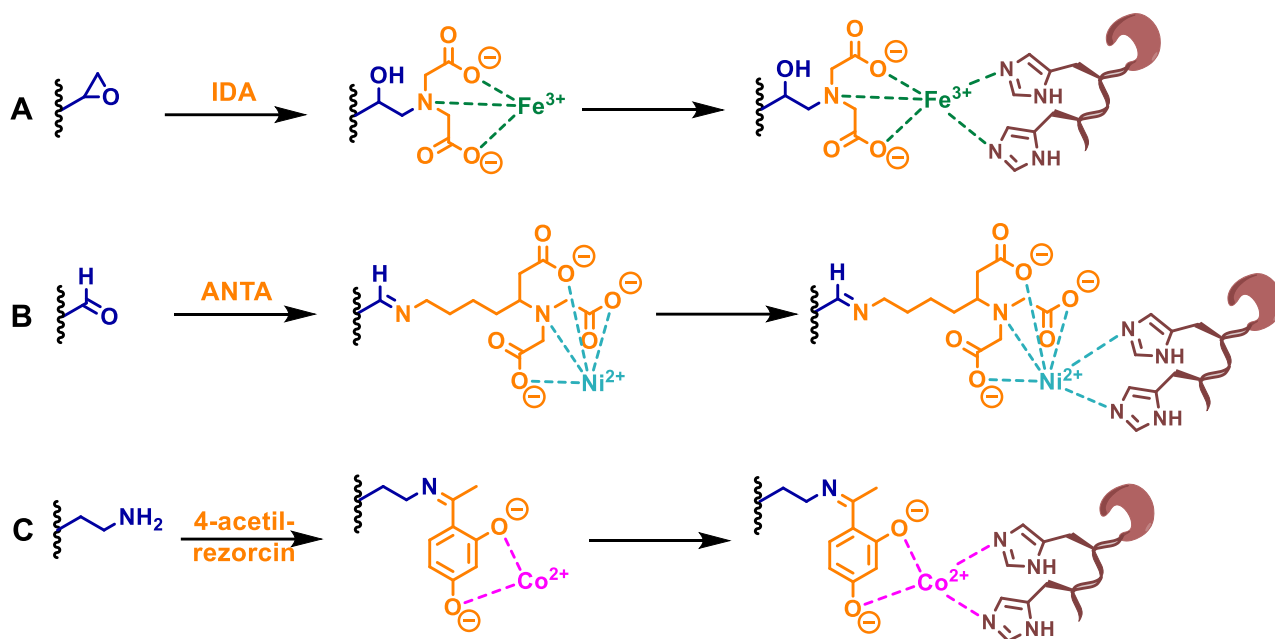


3.4. ábra: *Porath* és munkatársai által elvégzett felületmódosítás.

Az eljárás nagy szelektivitásának köszönhetően könnyen előállíthatók egy lépésben rögzített biokatalizátorok. Ehhez a célenzim elúcióját el kell hagyni a tisztítási protokoll végén, valamint a felhasználás során kerülni kell az olyan komponenseket, melyek kiszorítanák az enzimet a komplexből.

Nem csak az alkalmazott fémion lehet többfajta, hanem a komplexképző vegyület is (3.5. ábra). Érdekes mindkettő kiválasztására nagy figyelmet fordítani, hiszen jelentősen befolyásolhatják a hordozó kapacitását, a szelektivitást és az elkészült biokatalizátor aktivitását is. Leggyakrabban Ni^{2+} iont alkalmaznak számos jó tulajdonsága miatt.^[19,20] Komplexképzőként az iminodiacetsavat (IDA) a legelterjedtebb.^[21] Fontos azonban, hogy nem minden enzim esetén ugyanaz a megfelelő.^[22]

Az IMAC módszerrel rendkívül gyorsan és szelektíven elvégezhető a rögzítés. A költséges tisztítási eljárások így elhagyhatók. Emellett az eljárás reverzibilis, tehát az aktivitás jelentős csökkenése után az enzimek eltávolításával a hordozó újra felhasználható.



3.5. ábra: Példák komplexképző felületek létrehozására.

A: iminodiacetsav kapcsolása epoxicsoportokhoz;

B: $\text{N}\alpha,\text{N}\alpha$ -bisz(karboximetil)-L-lizin (ANTA) kapcsolása glutáraldehidhez;

C: polidopamin-típusú felület kialakítása 4-acetil-rezorcinnal

3.2.3. Enzimek mártixba zárása

A módszer abban tér el elsősorban a fentebb említett IMAC-től, hogy az enzim nem kötődik a mártixhoz. A cél csupán az, hogy bezárjuk a mártixba a felhasználni kívánt enzimet úgy, hogy a szubsztrát és a termék szabadon átjárhasson rajta, de az enzim ne szivárogon.

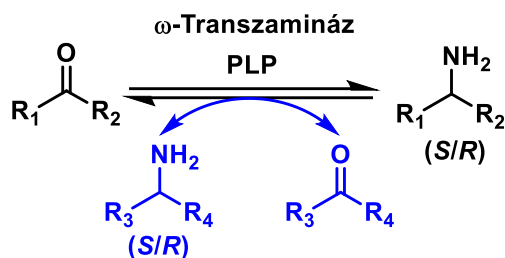
Ez megvalósítható polimer mártix segítségével, mely lehet szerves vagy szervetlen. A szerves mártix előállítható természetes (pl. cellulóz, kollagén) vagy szintetikus (pl. poliakrilát, polimetakrilát) polimerekkel. Szervetlen mártixot pedig szilikával és bentonittal lehet létrehozni.^[23]

A másik gyakran alkalmazott módszer a szol-gél eljárás. Szilán prekursor segítségével könnyedén létrehozható a mártix, és típusának módosításával változtatható a keletkező szilika térháló szerkezete, átjárhatósága. Ezeket a jellemzőket a reakció körülményekkel is befolyásolhatjuk. A létrejövő mártix hidrofób-hidrofil tulajdonságai szabályozhatók különböző oldallánccal rendelkező szilánok alkalmazásával.^[24]

3.3. Transzaminázok

A transzaminázok (TA) a transzferázok csoportjába (EC2) tartozó enzimek. Az általuk katalizált reakciókban aminoszerek sztereoszerektív reverzibilis szállítása valósul meg.^[25]

Az általuk katalizált reakciót sematikusán a 3.6. ábra mutatja be. Kulcsszereppel rendelkeznek a különböző sejtszintű jelátviteli és anyagcsere folyamatokban. Emiatt számos, eltérő formájuk megtalálható a természetben.^[26]

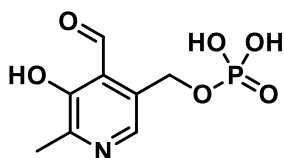


3.6. ábra: ω -transzamináz általános reakciója.

A szubsztrátjaik alapján két csoportba sorolhatók ezen enzimek. Az α -transzaminázok olyan vegyületek átalakítását katalizálják, melyek amino- vagy oxocsoportjától α -helyzetben karboxilcsoport helyezkedik el. Ezzel szemben az ω -transzaminázok a karboxilcsoporttól legalább egy szénatomnyira lévő, primer szénhez kötött aminocsoportot adnak át. Emellett a karboxilcsoportot nem tartalmazó vegyületek, például különböző aminok és ketonok is lehetnek az ω -transzaminázok szubsztrátjai. Emiatt ezek az enzimek kiemelkedő katalizátorok lehetnek biokatalitikus átalakításokban.^[27,28]

Az ω -transzamináz enzimekkel létrehozhatók olyan bioaktív anyagok, melyek királis aminocsoportot tartalmaznak. Ez megvalósítható prokirális ketonok és alacsony költségű racém aminok elegyével. Példaként említeném a dilevalol vérnyomáscsökkentő prekursorát, az (*R*)-4-fenil-bután-2-amint.^[29]

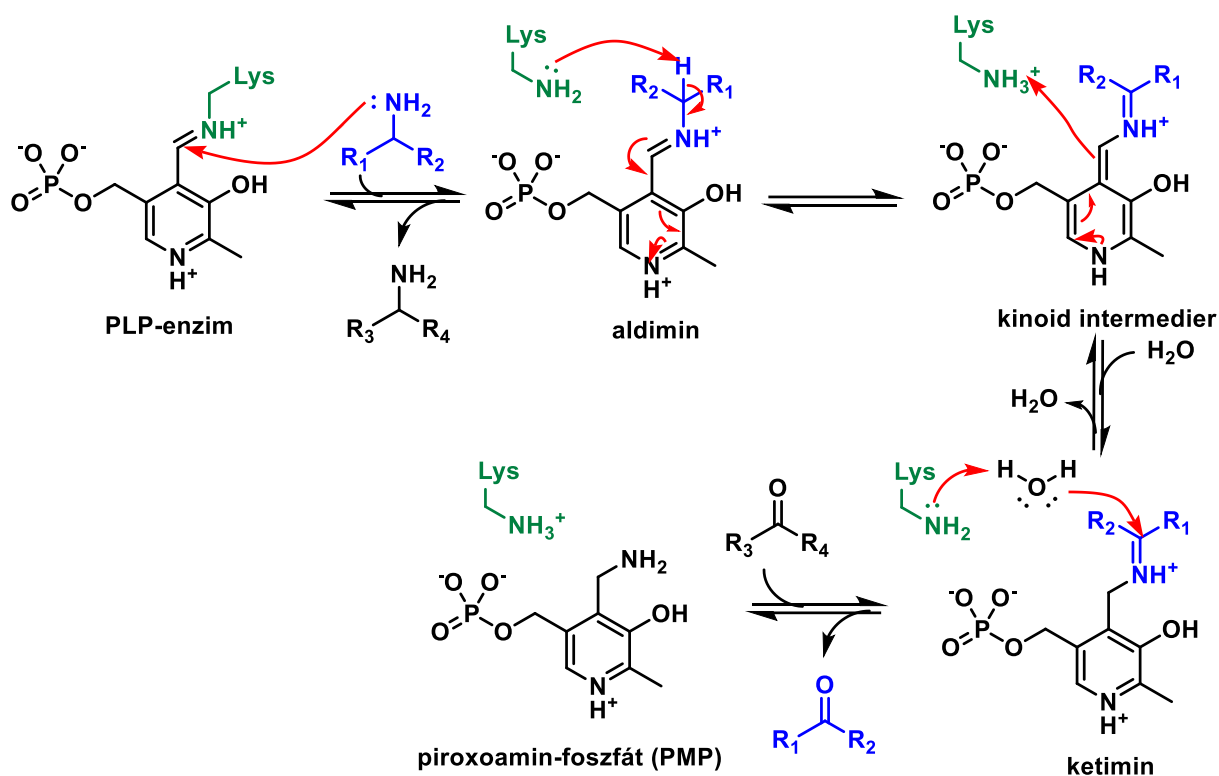
A piroxál-5-foszfát (3.7. ábra) fontos kofaktora az ω -transzaminázoknak. Az enzim aktív centrumában található lizinre kapcsolódva átmenetileg képes tárolni az aminocsoportot, ezzel segítve a katalizált reakció végbemenetelét.^[30]



piroxál-5-foszfát (PLP)

3.7. ábra: ω -transzaminázok kofaktora.

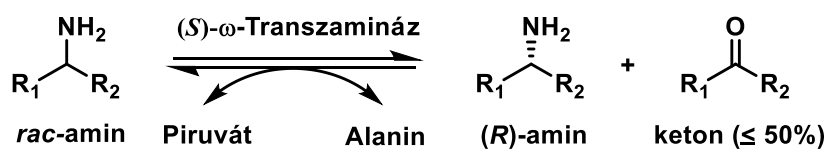
A katalízis mechanizmusát a 3.8. ábra mutatja.^[31] Az eddig leírt ω -transzaminázok nagyrésze (*S*)-szelektivitással rendelkezik, azonban az irodalomban egyre több (*R*)-szelektív enzim is megjelenik.^[26]



3.8. ábra: Az ω -transzaminázok által katalizált reakció mechanizmusa.

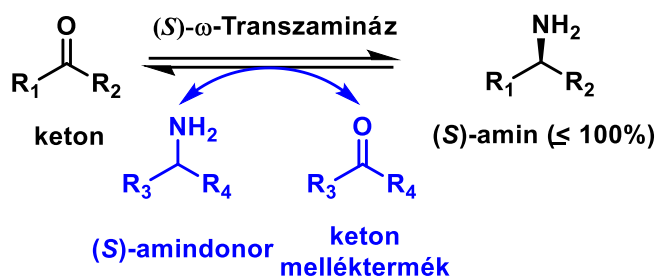
3.3.1. Felhasználás

Az iparban három fő csoportba sorolják a transzaminázok felhasználását.^[27] Az egyik az aminosavak racém elegyének kinetikus rezolválása, mely során az egyik enantiomert ketonná alakítják (3.9. ábra). Így az elválasztás könnyen megvalósítható, és sztereoselektív termék kapható. Felhasználásukra számos példa van már az iparban.^[32,33]



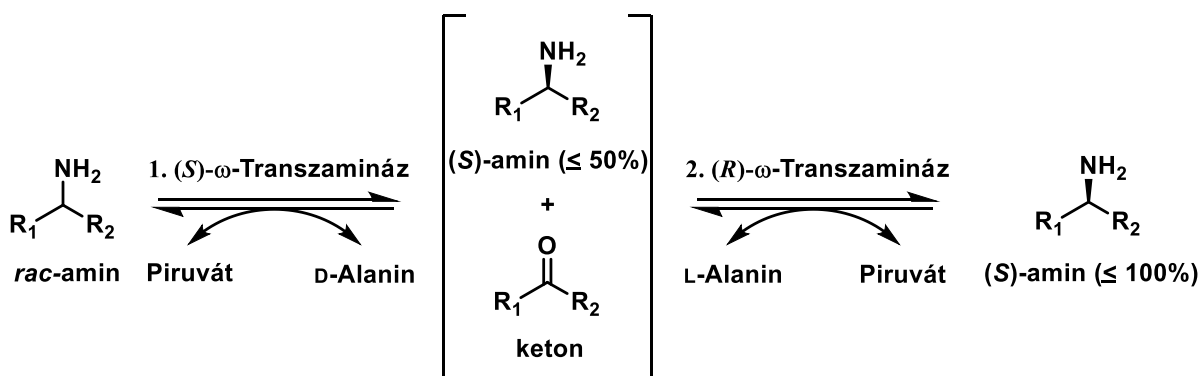
3.9. ábra: Kinetikus rezolválás transzaminázokkal.

Aszimmetrikus szintézis során prokirális ketonokból állíthatók elő királis aminok (3.10. ábra). A Sitagliptin^[34] hatóanyag a legismertebb ezen a módon előállított vegyület. Emellett aminptetralinok^[35] szintézise is megvalósítható, melyek a Parkinson-kór kezelésére lehetnek alkalmasak.



3.10. ábra: Aszimmetrikus szintézis transzaminázokkal.

A két fentebbi módszer kombinálásával a deracemizálás művelete is megvalósítható (3.11. ábra). Ekkor a racém amin elegyet először kinetikusan rezolválják 50 %-os konverzióig, majd a keletkező ketont egy ellenkező szelektivitással rendelkező transzamináz enzimmel aszimmetrikus szintézissel átalakítják. Így enantiomertiszta amin kapható. Ezt általában akkor alkalmazzák, ha a ketont nehéz eltávolítani a kinetikus rezolválás után vagy költséges a beszerzése az aszimmetrikus szintézishez. A módszer például a Mexiletin^[36] gyógyszerhez előállításához alkalmazzák, mely egy szívritmuszavar elleni készítmény.

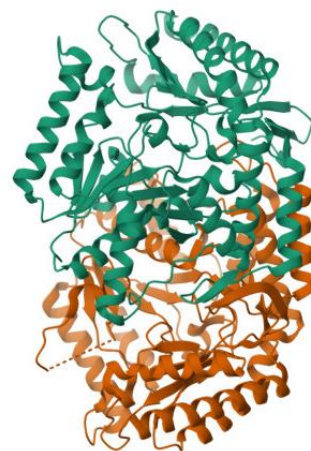


3.11. ábra: Deracemizálás transzaminázokkal.

3.3.2. *Vf-S* transzamináz

A *Vibrio fluvialis* baktériumból származó, (S)-szelektív ω -transzamináz, dimer szerkezetű enzim, melynek monomere 50 kDa tömegű (3.12. ábra).^[37]

Széleskörűen alkalmazzák kinetikus rezolválásban és aszimmetrikus szintézisekben. Többek között felhasználták az (S)-rivasztigmin előállításában, mely egy az Alzheimer-kór és a Parkinson-kórral összefüggésbe hozható demencia kezelésére szolgál.^[38] Az antiepileptikum levetiracetam előállítása során a melléktermékként keletkező benzaldehid eltávolítására is sikeresen alkalmazták.^[39]



3.12. ábra: *Vf-S* transzamináz.

Az enzim kovalens rögzítését megvalósították már kitozán gyöngyökön, mellyel öt egymás utáni reakcióban kb. 77 %-os konverziót értek el.^[40] Termelő sejtés rögzítésre is van példa az irodalomban: az *E. coli* sejteket szilika mikrorészecskéken (ezen adszorbeálódtak a sejtek) keverve szol-gél mátrixba zárták. Ezzel egy olyan biokatalizátort megalkotva, mely szakaszos reakciókon túl folyamatos áramlású reaktorban aminok kinetikus rezolválására is alkalmas.^[1]

3.4. Mágneses nanorészecskék

A mágneses nanorészecskék (MNP-k) számos nano-, biotechnológiai és orvosbiológiai fejlesztésben fontos szerepet játszanak.^[41] Felhasználják őket például hangszórókban, motorokban hőelvezetésre, illetve mágneses tintaként is alkalmazhatók ferrofluidok formájában.^[42] Nanotechnológiában nanoszivattyúként, -generátorként vagy más, ebbe a mérettartományba tartozó eszközként alkalmazzák.^[43] Biotechnológia szempontjából a gyógyszeradagolásban és a biomolekulák elválasztásában van jelentős szerepük. Szövetjavításnál, mágneses rezonancia képalkotásnál (MRI) és tumorsejtek hipertermikus kezelésénél alkalmazzák őket az orvosbiológiában.

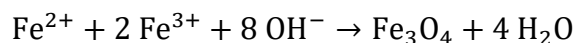
Szeeparálása a reakcióelegytől könnyedén megvalósítható, emiatt gyakran alkalmazzák őket katalizátorhordozóként. Ez lehet akár kémiai vagy enzimatis is. A szeeparáció másodpercek alatt megvalósítható az általánosságban alkalmazott műveletek (pl. centrifugálás, szűrés) elkerülésével. Ez egy jelentős előny a szilika és polimer hordozókhoz képest.

Mágneses vas-oxid előállítása során jellemzően három típusú részecske képződhet: maghemit [γ -Fe(III) $_2$ O $_3$], hematit [α -Fe(III) $_2$ O $_3$] vagy magnetit [Fe(II)Fe(III) $_2$ O $_4$]. A legkedvezőbb mágneses tulajdonságokkal a magnetit rendelkezik. Szobahőmérsékleten ferromágneses, valamint a 6 nm-nél kisebb részecskék szuper paramágneses tulajdonságokkal rendelkeznek.^[44]

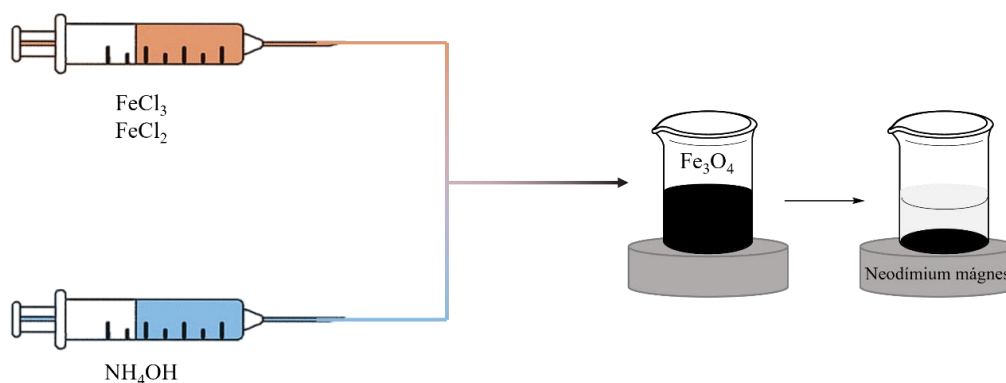
3.4.1. Előállítás

Ma már a nanorészecskék előállítására számos technológia létezik, melyekkel nagy stabilitású és kis méreteloszlású nanorészecskéket lehet létrehozni.

A ko-precipitációs megoldás a leggyakrabban alkalmazott.^[45] Ezzel az eljárással könnyedén szabályozható a nanorészecskék mérete. A reakció inert, lúgos körülmények között zajlik, vas(II)- és vas(III)-só kiindulási anyagokkal (3.13. ábra). A reakcióegyenlet a következő:

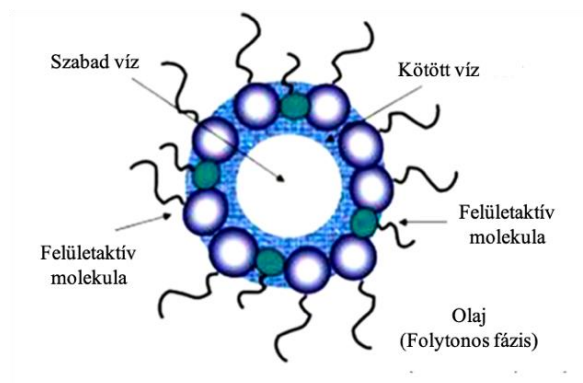


A reakció körülményekkel szabályozható a magnetit részecskék mérete, mely általában 2 és 15 nm között szokott lenni. Oxigén jelenlétére érzékeny a rendszer, emiatt szükséges az inert atmoszféra.^[46]



3.13. ábra: Ko-precipitációs módszer mágneses nanorészecskék előállítására.

A mikroemulziós eljárás során a reagensek olajban diszpergált, felületaktív anyagokkal stabilizált vízcseppekben találhatók (3.14. ábra). Ezek véletlenszerű ütközésével jön létre a csapadék a micellákban.^[46] A módszerrel Pileni és munkatársai sikeresen előállítottak 4-12 nm átmérőjű mágneses nanorészecskéket.^[47]



3.14. ábra: Mikroemulziós csepp.^[45]

A hidrotermál technológia alkalmazása esetén a reakció magas hőmérsékleten és nyomáson megy végbe vas prekursor jelenlétében. Ezzel a megoldással a képződő nanorészecskék mérete 50 nm vagy e feletti. A méretet elsősorban a reakcióidővel lehet szabályozni, de a többi reakciókörülmény is hatással van rá.^[45]

Szolvo-termál módszernek rengeteg előnye van. Annak köszönhetően, hogy a reakció vizes közeg helyett szerves oldószerben zajlik, számos olyan reakció megvalósítható, ami a hidrotermális eljárással nem. A részecskék mérete, alakja és morfológiája könnyen szabályozható a paraméterek megfelelő beállításával. Ilyen például a kiválasztott oldószer, a prekursor, a reakcióhőmérséklet- és idő, valamint az öregedési idő. Ezen tényezők variálásával létrehoztak már vas(II,III)-oxid kockákat és oktaédereket is.^[48] A módszerrel elkerülhető az anionok és kationok adszorpciója a nanorészecske felületén, ami a ko-precipitációs és hidrotermális technikáknál okoz gondot. További előnye, hogy közvetlenül hidrofób tulajdonságú részecskék képződnek. Az eljárás megvalósítható csak vas(III)-klorid alkalmazásával is. Nem csupán vas-oxid nanorészecskék előállítását teszi lehetővé a módszer, hanem más típusú ferrit nanorészecskéket (pl. MFe_2O_4 , ahol $M=Fe, Co, Mn$) is létre lehet hozni vele.^[45,49]

3.3. táblázat: Mágneses nanorészecskék előállítására alkalmas eljárások előnyei és hátrányai.

Eljárás	Előny	Hátrány
<i>Ko-precipitáció</i>	Egyszerű és kiforrott technológia	Inert reakciókörülmény
<i>Mikroemulzió</i>	Egyszerű berendezés Szűk méreteloszlás	Maradék felületaktív anyag szennyező Léptéknövelési problémák
<i>Hidrotermál</i>	Elég egy prekursor	Lassú reakciókinetika
<i>Szolvo-termál</i>	Könnyen szabályozható méret és morfológia	Lassú reakciókinetika

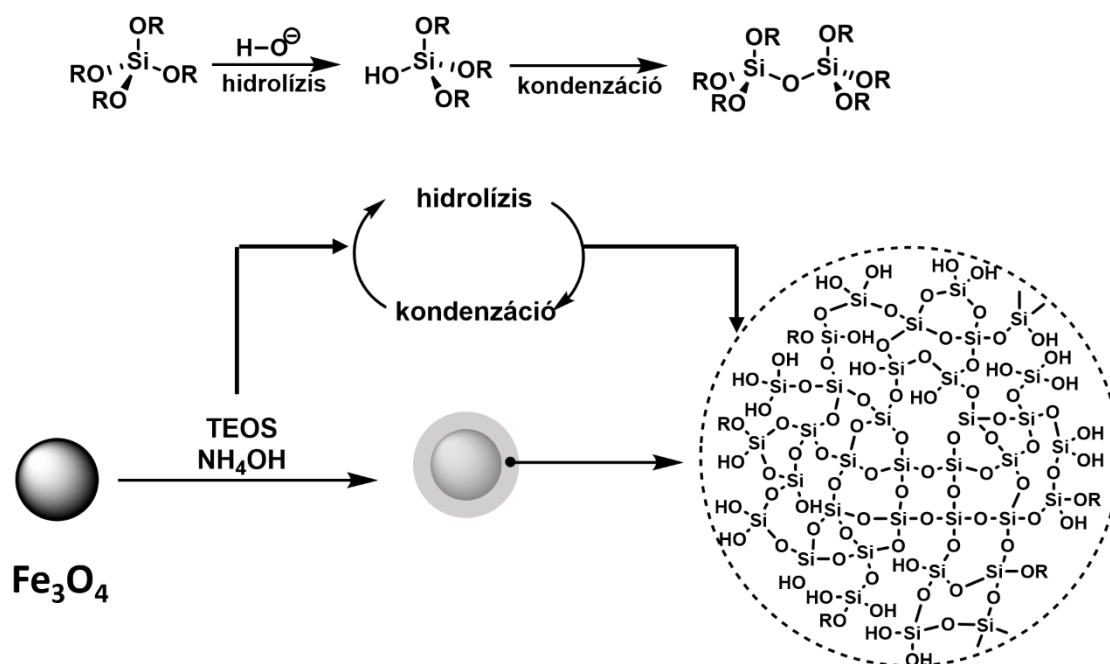
3.4.2. Felületmódosítás

A mágneses nanorészecskék felületét gyakran módosítják, hogy a stabilitásuk megmaradjon és a kívánt felhasználáshoz illeszkedjen.

A részecskék aggregációjának elkerülése céljából a felületre adszorbeált polimer réteget hoznak létre vagy felületaktív anyagokat alkalmaznak. A polimer bevonat alacsony stabilitással rendelkezik, így ezt ritkábban használják. Szerepük igazán a mágneses mezővel irányított hatóanyagleadásnál és a rezonanciás képalkotásnál jelentős. Előbbi esetben biokompatibilis

polimerekkel módosítják a nanorészecske felületét, míg utóbbinál kontraszt anyagként van jelentőségük.^[50]

Elsődlegesen szilika-bevonatot (SiO_2 burkot) alkalmaznak. Ennek további felületmódosítása könnyedén megvalósítható, a részecskék közötti kölcsönhatást is lehet befolyásolni, valamint vizes közegben is stabil. A bevonatot általában *Ströber*-módszerrel szokták létrehozni, mely könnyen szabályozható a tetraetoxi-szilán (TEOS) / víz aránnyal, illetve az ammónium-hidroxid koncentrációjával. Az eljárás során a szilán hidrolízisét követő kondenzációban alakul ki a térhálós SiO_2 bevonat (3.15. ábra).^[51]



3.15. ábra: Szilika térháló létrehozása mágneses nanorészecskék felületmódosításához.

4. Módszerek

4.1. Felhasznált anyagok

A felhasznált vegyszerek és oldószerek a Sigma-Aldrich, a Merck, az Alfa Aesar, és a Molar Chemicals termékei. A fehérjeanalízis során alkalmazott egyéb vegyszerek a Biorad és a Thermo Scientific termékei. A fehérjetermelést a kutatócsoport korábbi tapasztalatai alapján kialakított protokoll szerint Alács Bálinttal közösen végeztem.

4.2. Alkalmazott eszközök

A rázások során Heidolph Vibramax 100 típusú készüléket, termosztált rázás esetén pedig a rázógéppel együtt Heidolph Thermo 1000 termosztátáló készüléket használtam. Az UV spektrofotometriás mérésekhez Thermo Scientific Multiscan SkyHigh típusú microplate spektrofotométert és 300 µl térfogatú Greiner UV-Star® 96-lyukú well-plate-et alkalmaztam. A gélelektroforézis során Enduro Power Supplies transzformátort és Biorad futtató szettet alkalmaztam.

4.3. Alkalmazott vizsgálati módszerek

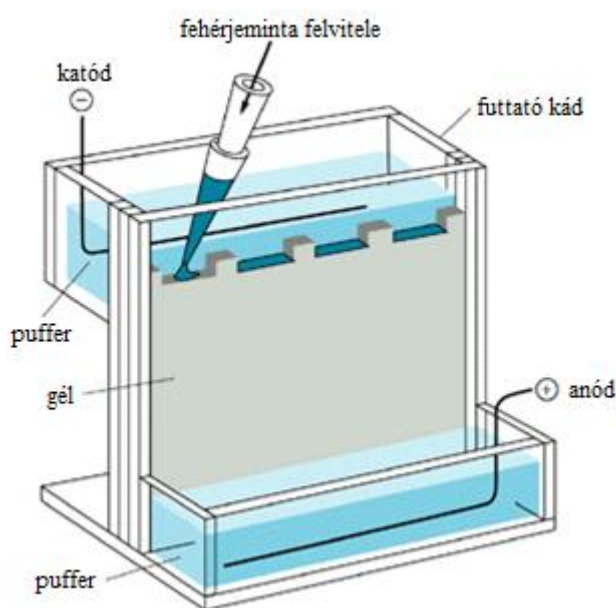
Gélelektroforézis

A gélelektroforézis alapja, hogy az elektromos töltéssel rendelkező fehérje elektromos térben azon elektród irányába mozdul el, melynek töltése ellentétes a saját töltésével. Míg az elektromos térerősség gyorsítja, addig a mozgással szemben fellépő közegellenállás lassítja a molekulát. Mikor a két erő kiegyenlítődik, a molekula állandó sebességgel halad tovább. Az előbbiekből következik, hogy alapesetben a fehérjék méret és töltés szerint válnának szét a gélelektroforézis során. Annak érdekében, hogy ezt a zavaró kettősséget kiküszöböljük, és csak méret szerinti szétválást érjünk el, a töltés hatását el kell nyomni. Ehhez megfelelő mintaelőkészítés és maszkírozás szükséges. A fehérjét denaturálni kell a diszulfidhidak kémiai felbontásával, valamint általában nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS) maszkírozni, amely a fehérje pozitív töltésű csoportjaival ionpárt képezve leárnyékolja azokat, alkiláncával pedig másodlagos kötéseket alakít ki a fehérje felületén. A szabadon maradó negatív töltéseknek köszönhetően minden fehérje anionos jellegűvé válik. Annak érdekében, hogy a futtatás során a fehérjék haladása követhető legyen valamilyen színes, kis molekulájú vegyületet adnak a fehérjemintához, mely a futtatás során végig a fehérjék előtt halad. Az enzimes mintákat a

mintaelőkészítés során 5 percen keresztül 95°C-on melegítettem a mintaelőkészítéshez szükséges anyagokkal. Ez alatt az idő alatt megtörtént a denaturáció és a pozitív töltések leárnýékolása is.

A fehérje oldatokból a géllapok mintatartó zsebeibe kell felvinni a mintát. A zsebeknél, valamint a gél felső szakaszán alkalmazhatunk kisebb sűrűségű gél, melyben a nagy mintatérfogatban lévő fehérjék összetömörödnék és vékony sávokban haladva lépnek át az elválasztó szakaszba, így az előhívás után jól elváló csíkokat kapunk.

Az előhívás során az SDS oldatot alaposan ki kell mosni a gél lapokból. Ezt követően a géllapokat a megfelelő előhívó festék oldatában áztatva jelennek meg a megfestődött fehérjék.



4.1. ábra: Gélelektroforézishez szükséges készülék részei, működése.

Az előállított IMAC készítmény szelektivitását, valamint a szol-gél mátrix rendszer enzimviSSzatartási képességét SDS-PAGE gélelektroforézis segítségével vizsgáltam. A gélelektroforézishez térhálósított poliakrilamid gélét használtam. A tömörítő gélben 4%, az elválasztó gélben 10% biszakrilamidot, katalizátorként tetrametil-etilén-diamint, iniciátorként ammónium-perszulfátot alkalmaztam. A mintaelőkészítés során 10%-os SDS oldatot, brómtimolkéket, a denaturációhoz pedig ditiotreitolt használtam.

Referenciaként Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder fehérjekészítményt alkalmaztam, melyben a fehérjék móltömege: 10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130, 250 kDa volt. A futtatást SDS oldatban végeztem először 180 V, majd az elválasztó gélszakasz elérése után 200 V-os feszültséget alkalmazva. Az előhíváshoz ProSieve Blue

Protein Staining Solution kék festéket használtam. A háttér alapos kimosását követően a gél lapokat digitalizáltam.

Dinamikus fényszórás (DLS – Dynamic Light Scattering)

A részecskeméret analíziséhez ZetaSizer Pro Blue berendezést alkalmaztunk. A mintákat (1 mg/ml) ultrahangozás segítségével etanolban diszpergáltuk, majd a stabil szuszpenziót 25°C-on, 633 nm hullámhosszú lézerfényvel 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.

4.4. Alkalmazott számítási módszerek

4.4.1. Aktivitásmérés spektrofotometriás úton

A reakció során képződő acetofenon UV-tartományban észlelhető abszorbanciát mutat 245 nm-en, melynek mérésével és kalibrációs egyenes segítségével határoztam meg a konverziót.

$$\text{Aktivitás } (U) = \frac{c_t * V}{\Delta t} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}} \right]$$

$$\text{Biokatalitikus aktivitás } (U_B) = \frac{U}{m_B} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{perc} \times \text{g}} \right]$$

$$\text{Konverzió} = \frac{c_t}{c_s^0} \times 100 [\%]$$

$$c_t = \text{adott időpontban mért termék koncentráció} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right]$$

$$c_s^0 = \text{kiindulási szubsztrát koncentráció} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right]$$

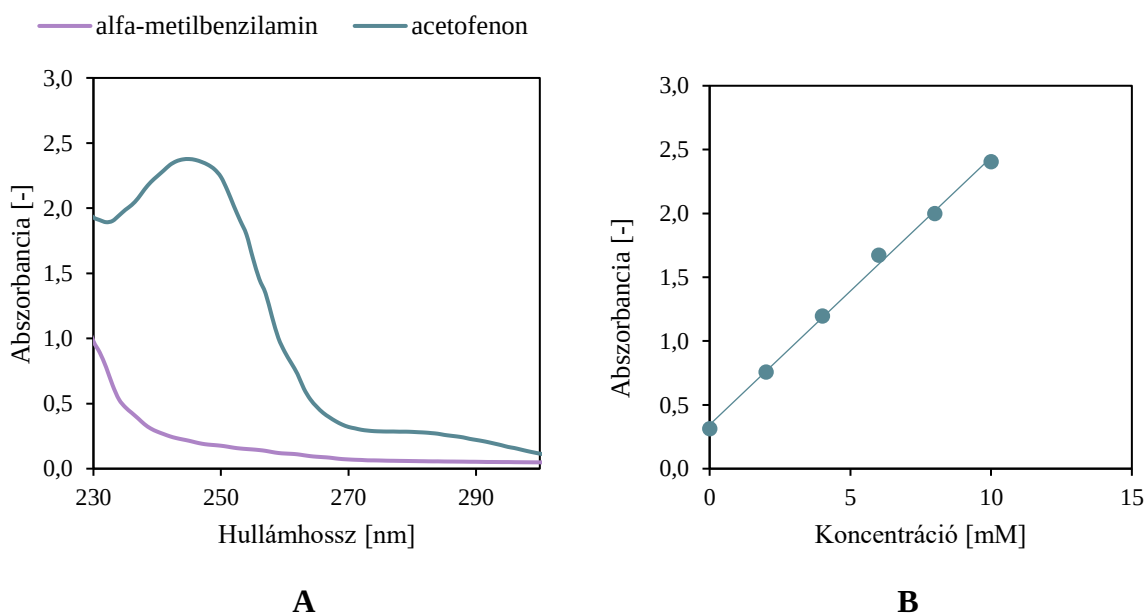
$$\Delta t = \text{eltelt idő} [\text{perc}]$$

$$V = \text{reakciótérfogat} [\text{ml}]$$

$$m_B = \text{biokatalizátor tömege} [\text{g}]$$

A mérések során is használni kívánt plateolvasó készüléken kalibrációs egyenest vettem fel. A reakcióközegnek megfelelő elegyben mértem a különböző koncentrációjú acetofenon

oldatok elnyelését. A mérés során kalkuláltam a kiindulási vegyület (α -metilbenzilamint) elnyelésével is, bár azonos koncentráció esetén ez elenyésző az acetofenonhoz képest, így magasabb konverzióknál már nem zavarja nagy mértékben a mérést (4.2. ábra A). A reakcióelegy koncentrációjára (amelyből a levett mintákat ötvenszeres hígításban mértem) és a minták abszorbanciája közti összefüggésre a következő egyenletet kaptam 245 nm-en: $y = 0,2094x + 0,3441$ ($R^2 = 0,9975$) (4.2. ábra B).



4.2. ábra: A: az acetofenon (0,2 mM) és α -metilbenzilamin (0,2 mM) abszorbancia spektruma a mérési tartományban. B: acetofenon kalibrációs egyenese 245 nm-en.

4.5. Alkalmazott oldatok, pufferek összetétele

LS (Low Salt) lemosó oldat (50 mM HEPES, 30 mM KCl)

Desztillált vízbe (500 ml) feloldottam kálium-kloridot (1,118 g) és HEPES-t (5,960 g), majd az oldat pH-ját szilárd nátrium-hidroxid segítségével 7,5-re állítottam.

HS (High Salt) lemosó oldat (50 mM HEPES, 300 mM KCl)

Desztillált vízbe (100 ml) feloldottam kálium-kloridot (2,237 g) és HEPES-t (1,192 g), majd az oldat pH-ját szilárd nátrium-hidroxid segítségével 7,5-re állítottam.

Imidazol lemosó oldat (1000 mM)

Az előre elkészített LS oldatban (100 ml) bemértem az imidazolt (6,80 g), majd miután feloldódott koncentrált sósav adagolásával 7,5-re állítottam az oldat pH-ját.

HEPES-puffer (50mM, pH=7,5)

Desztillált vízben (400 ml) feloldottam 2-[4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinil]-etánszulfonsavat (4,77 g), majd az oldat pH-ját nátrium-hidroxiddal 7,5-re állítottam be.

Fémsó oldat (50 mM)

Desztillált vízben (50 ml) feloldottam 0,6227 g kobalt-acetátot.

Nátrium-piruvát oldat (240 mM)

Kimértem a nátrium-piruvátot (118,9 mg), majd feloldottam HEPES pufferben (3 ml.)

PLP oldat (20 mM)

Kimértem a PLP-t (53,0 mg), majd feloldottam HEPES pufferben (10 ml).

α -Metilbenzilamin reakcióelegy (20mM)

HEPES puffert (18,75 ml) összekevertem nátrium-piruvát (1000 μ l, 240 mM oldat HEPES pufferben) és PLP oldattal (200 μ l, 20 mM oldat HEPES pufferben), majd hozzáadtam a racém α -metilbenzilamint (51,5 μ l).

0,5 M trisz-puffer – tömörítő puffer

Trisz bázist (6,0 g) feloldottam desztillált vízben (60 ml), cc. sósavval 6,8-as pH-ra állítottam majd desztillált vízzel 100 ml-re egészítettem ki.

1,5 M trisz-puffer – elválasztó puffer

Trisz bázist (27,23 g) feloldottam desztillált vízben (100 ml), cc. sósavval 8,8-as pH-ra állítottam majd desztillált vízzel 150 ml-re egészítettem ki.

4% gél – 4 lapra

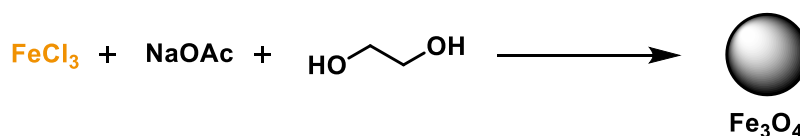
Centrifugacsőbe bemértem a desztillált vizet (6,425 ml), tömörítő puffert (2,5 ml), akrilamid:bisakrilamid keveréket (40% vízben, 37,5:1 arány, 975 μ l) és az SDS oldatot (10%, vízben, 100 μ l). Közvetlenül a gélöntés előtt hozzáadtam az APS oldatot (10%, vízben, 100 μ l) és a TMEDA-t (20 μ l). Az oldatot vortex segítségével homogenizáltam, és fecskendővel a már megkötött 10%-os gélre fecskendeztem a gél.

10% gél – 8 lapra

Centrifugacsőbe bemértem a desztillált vizet (19,6 ml), elválasztó puffert (10 ml), akrilamid:bisakrilamid keveréket (40% vízben, 37,5:1 arány, 10 ml) és az SDS oldatot (10%, vízben, 400 µl). Közvetlenül a gélöntés előtt hozzáadtam az APS oldatot (400 µl) és a TMEDA-t (40 µl). Az oldatot vortex segítségével homogenizáltam, és fecskendővel az öntőformákban fecskendeztem a gél.

4.6. Felületmódosítási és rögzítési eljárások

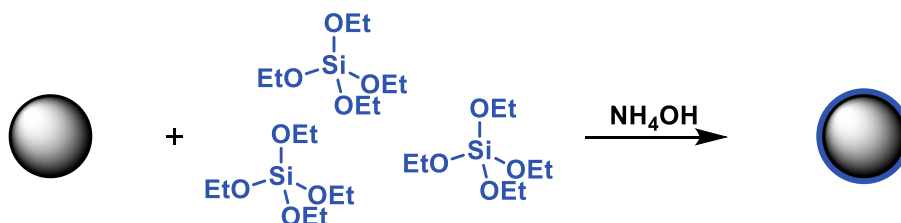
4.6.1. Mágneses nanorészecske előállítása



4.3. ábra: Mágneses nanorészecske előállítása.

A vas(III)-kloridot hexahidrátot (20,2 g) szonikálás segítségével feloldottam etilén-glikolban (600 ml). Miután teljes mértékben feloldódott hozzáadtam az oldathoz a 4000 g/mol molekulatömegű polietilén-glikolt (20,2 g) és a nátrium-acetát trihidrátot (54,0 g). Ezt követően az elegyet addig szonikáltattam, amíg a komponensek teljesen fel nem oldódtak. Az elegyet rozsdamentes acél autoklávba töltöttem, majd gondosan lezártam és 24 órán keresztül 200 °C-on reagáltattam intenzív kevertetés mellett. A 24 óra elteltével a képződő fekete szuszpenziót neodimium mágnes segítségével szeparáltam és a keletkezett részecskéket háromszor vízzel és háromszor 2-propanollal alaposan átmostam, majd elszívófülkében tömegállandóságig szárítottam.

4.6.2. Mágneses nanorészecske bevonása

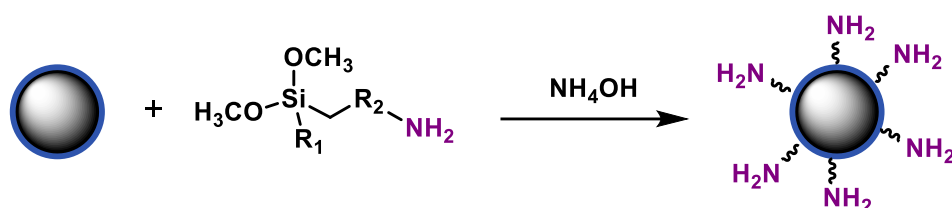


4.4. ábra: Mágneses nanorészecske bevonása szol-gél módszerrel.

A mágneses nanorészecskét (5 g) a 400 g/mol molekulatömegű polietilén-glikol (2,5 g) jelenlétében ultrahang segítségével diszpergáltam az etanol (175 ml) és desztillált víz (25 ml) elegyében (20 percen át, melegítés nélkül). Ezt követően hozzáadtam az ammónium-hidroxid

oldatot (35 %-os vizes oldat, 12,5 ml) és a tetraetil-ortoszilikát (TEOS) prekuzort (7,5 ml). A mintát 24 órán át rázattam síkrázógépen, szobahőmérsékleten. Ezután a részecskéket neodímium mágnes segítségével szeparáltam és desztillált vízzel mostam, amíg a felülúszó semleges pH-jú nem lett. Végül háromszor 2-propanollal is átmostam, majd elszívófülkében tömegállandósíáig szárítottam.

4.6.3. Mágneses nanorészecske felületmódosítása aminoszilánokkal



4.5. ábra: Mágneses nanorészecske funkcionálizálása aminocsoportokkal.

Egy 20 ml-es csavaros kisüvegben a mágneses nanorészecskét (1500 mg) a 400 g/mol molekulatömegű polietilén-glikol (750 mg) jelenlétében etanolban (15 ml) ultrahang segítségével diszpergáltam (10 percen át, melegítés nélkül). Ezt követően a szuszpenzióhoz hozzáadtam az ammónium-hidroxid oldatot (35 %-os vizes oldat, 135 μ l) és 10 percig jól lezárt üvegben síkrázógépen rázattam. Majd az elegyhez hozzáadtam a megfelelő aminoszilánt (1,5 mmol) és szobahőmérsékleten 24 órán keresztül tovább rázattam. Ezután a mintát neodímium mágnes segítségével szeparáltam háromszor 2-propanollal mostam, majd elszívófülkében tömegállandósíáig szárítottam, majd argon alatt hűtőben tároltam.

4.1. táblázat: Az alkalmazott aminoszilánok és mennyiségek.

Név	Rövidítés	M [g/mol]	d [g/cm ³]	V [μ l]
(3-Aminopropil)trimetoxiszilán	APrTMOS részecske: NH ₂ A	179,36	1,027	260
[3-(2-Aminoetil-amino)]propil-trimetoxiszilán	AeAPrTMOS részecske: NH ₂ B	222,36	1,028	325
[3-(2-Aminoetil-amino)]propil-dimetoxi-metilszilán	AeAPrMeDMOS részecske: NH ₂ C	206,36	0,968	320

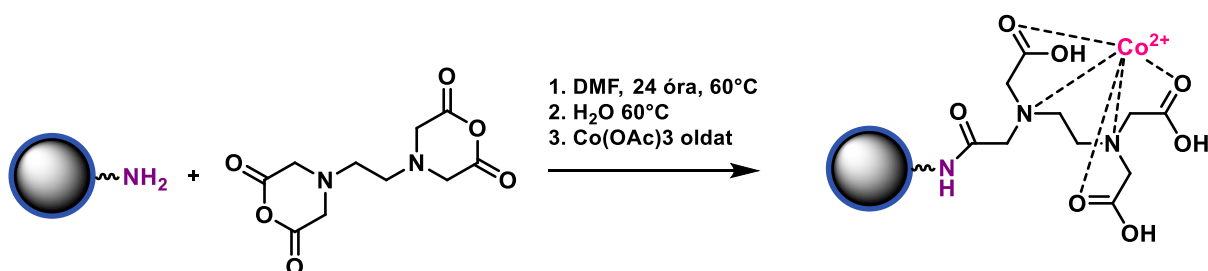
4.6.4. Aminocsoportok mennyiségi meghatározása ninhidrin kolorimetriás módszerrel

Az előállított aminoszilán bevonatú részecskék felszíni aminocsoport mennyiségének meghatározását ninhidrinnel végeztem. 10 ml-es csiszolatos gömblombikba bemértem ~2,5 mg nanorészecskét, melynek a pontos tömegét feljegyeztem és hozzáadtam 1 ml acetát puffert (100 mM, pH=5,5) és 2 ml ninhidrin oldatot (70 mM, *n*-propanolban). Mágneses kevertetés mellett refluxáltattam 20 percen át 170 °C-os olajfürdőn. A reakció során a ninhidrin reagens átalakul, a felületi aminocsoportok hatására keletkezik belőle az 570 nm hullámhosszon mérhető elnyeléssel rendelkező *Rhuemann*-lila vegyület. Az idő leteltével a reakcióelegyet egy 5 ml mérőlombikba pipettáztam és acetát-puffer/*n*-propanol keverékével 5 ml-re hígítottam, majd 1 ml mintát vettem, melynek spektrofotométerrel 570 nm-en mértem az abszorbanciáját. Mindhárom aminoszilánnal módosított részecske esetén háromszoros ismételtsben végeztem el a mérést. Az így kapott adatokból és a csoportban korábban meghatározott kalibrációs egyenes ($y = 4,372 x - 0,438$; $R^2 = 0,989$) segítségével számítottam a részecskék felületén levő aminocsoport mennyiséget, mely az egyes részecskék esetén az alábbiak szerint változott.

4.2. táblázat: Aminocsoportok mennyisége.

MNPs-Aminoszilán típusa	CNH ₂ [mmol/g MNPs]
MNPs- NH ₂ A	492 ± 22
MNPs- NH ₂ B	433 ± 10
MNPs- NH ₂ C	327 ± 21

4.6.5. Mágneses nanorészecske felületmódosítása EDTA-dianhidriddel és Co²⁺-ionokkal



4.6. ábra: Komplexképző csoportok kialakítása.

Kihevített és argonnal inertizált 30 ml-es mintatartóüvegbe bemértem a megfelelő mágneses nanorészecskéket (MNPs-NH₂A/ MNPs-NH₂B/ MNPs-NH₂C; 500 mg), a 400 g/mol molekulatömegű polietilén-glikolt (250 mg) és az *N,N*-dimetilformamidot (17,5 ml) és ultrahang segítségével diszpergáltam a részecskéket (10 perc). Ezt követően hozzáadtam a

megfelelő mennyiségű EDTA-dianhidridet (2 ekvivalens a felületi aminoszoportokra nézve) és az *N*-etil-*N,N*-diizopropilamint (1 ekvivalens az EDTA-dianhidridre nézve).

4.3. táblázat: EDTA-dianhidriddel történő felületmódosításhoz szükséges mennyiségek.

MNPs-Aminoszilán típusa	EDTA-dianhidrid [mg]	<i>N</i> -etil- <i>N,N</i> -diizopropilamint [μl]
MNPs- NH ₂ A	126,0	85
MNPs- NH ₂ B	120,2	82
MNPs- NH ₂ C	83,6	57

A reakcióelegyet 24 órán keresztül 60 °C-on rázattam 600 rpm fordulatszámon. Ezt követően 500 μl desztillált vizet adtam hozzá, és újabb 1 órás 60 °C-on történő rázatás után acetonitrillel (2×5 ml), 2-propanollal (1×5 ml), végül desztillált vízzel (1×5 ml) mostam. Ezt követően kobalt-klorid oldatot (5 ml, 50mM) adtam a részecskékhez és fél órán át rázattam a szuszpenziót szobahőmérsékleten, majd desztillált vízzel (3×5 ml) és 2-propanollal (1×5 ml) mostam. A mágneses nanorészecske szeparálását minden esetben neodímium mágnes segítségével végeztem. A terméket elszívófülkében tömegállandóságig szárítottam, majd hűtőben tároltam.

4.6.6. Hisztidinjelölt enzim komplexképzése és a biokatalizátor stabilizálása TEOS-sal

A komplexképzéshez kimértem 160 mg fémionokat tartalmazó, csak komplexképzésre alkalmas APrTMOS-nal, komplexképzővel és Co²⁺-ionokkal felületmódosított MNPs-t (NH₂A). A nanorészecskét ultrahangozás segítségével felszuszpendáltam 5 ml HEPES pufferben. Ezt követően hozzáadtam 5 ml lizátumot, mely tartalmazta a hisztidinjelöléssel ellátott transzamináz enzimet. A szuszpenziót 30 percen keresztül rázattam szobahőmérsékleten, majd ellenőriztem a felülúszó aktivitását. Amennyiben a felülúszóból vett mintában mérhető enzimaktivitást tapasztaltam, feltételeztem, hogy a fémionos felület telítődött a célenzimmel. Szeparáltam a nanorészecskéket, lepipettáztam a folyadék fázist, majd 3 lépésben mostam a részecskéket, mindig újra beszuszpendálva és 5 percig rázatva, majd ismét szeparálva a folyadékot: 3 ml LS pufferrel, 3 ml HS pufferrel végül 3 ml HEPES pufferrel.

Ezt követően a már célenzimet is tartalmazó részecskéket felszuszpendáltam 8 ml HEPES pufferben (így a biokatalizátor koncentráció 20 mg/ml lett). A szol-gél stabilizáláshoz 15 ml-es csavaros kisüvegbe bemértem 1000 μl-t a nanorészecskére rögzített enzimkészítmény

szuszpenziójából (20 mg részecskének felel meg), 2200 μ l HEPES puffert, 800 μ l 1000 g/mol molekulatömegű polietilén-glikol oldatot (5 m/m %, HEPES pufferben oldva) és pár percig rázattam. Ezt követően hozzáadtam az 500 μ l 2-propanolt, és a megfelelő mennyiségű TEOS-t.

4.4. táblázat: Mátrixba záráshoz szükséges TEOS mennyiségek.

Minta kód	TEOS arány [mmol/g MNPs]	TEOS mennyiség a reakcióban [μ l]
SG0	2,2	10
SG1	4,5	20
SG2	13,5	60
SG3	27,0	120
SG4	40,0	180
SG5	54,0	240
SG6	80,0	360

Az elegyeket pár percig intenzíven rázattam, majd mindegyikhez 20 μ l NaF oldatot adtunk (1 M, HEPES pufferben). A mintákat 20 órán át szobahőmérsékleten rázattam, majd neodímium mágnes segítségével szeparáltam és kétszer 3 ml 25%-os 2-propanol oldattal (HEPES pufferben) majd 3 ml HEPES pufferrel és mostam. A pufferes mosás után 2 ml össztérfogatú szuszpenziót készítettem a katalizátorokból, és ebből térfogatra kimérve a katalizátort vizsgáltam a biokatalitikus aktivitást az α -metilbenzilamin kinetikus rezolválásában.

4.6.7. Hisztidinjelölt enzim komplexképzése és a biokatalizátor stabilizálása TMOS-sal

A komplexképzést és a stabilizálást a *Hisztidinjelölt enzim komplexképzése és a biokatalizátor stabilizálása TEOS-sal* receptben leírtaknak megfelelően végeztem, az ott használt arányoknak megfelelően, az alábbi eltérések mellett:

Tetraetil-ortoszilikát (TEOS) helyett tetrametil-ortoszilikátot (TMOS) alkalmaztam. A mólarányok megegyeztek a TEOS-tal történő bevonással.

4.5. táblázat: Mátrixba záráshoz szükséges TMOS mennyiségek.

Minta kód	TMOS arány [mmol/g MNPs]	TMOS mennyiség a reakcióban [μl]
MSG0	2,2	6,5
MSG1	4,5	13,5
MSG2	13,5	40
MSG3	27,0	80
MSG4	40,0	120
MSG5	54,0	160
MSG6	80,0	240

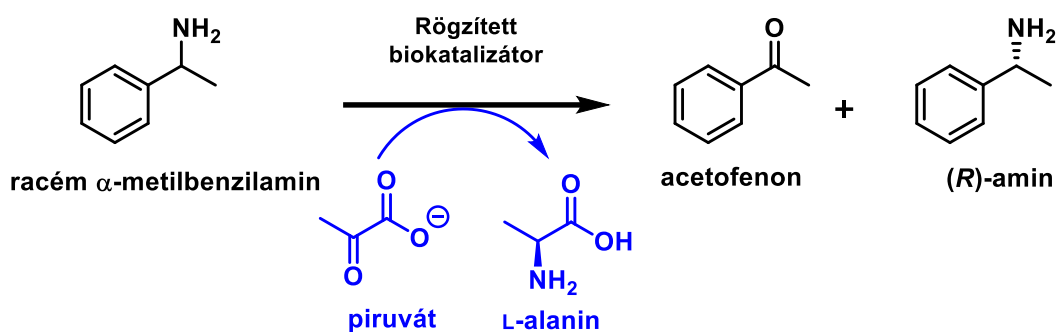
**4.6.8. *Hisztidinjelölt enzim komplexképzése és a biokatalizátor stabilizálása TEOS-sal
koszolvans nélkül és különböző szerves koszolvensek alkalmazása mellett***

A komplexképzést és a stabilizálást a *Hisztidinjelölt enzim komplexképzése és a biokatalizátor stabilizálása TEOS-sal* receptben leírtaknak megfelelően végeztem, az ott használt arányoknak megfelelően, azzal a különbséggel, hogy változtattam a TEOS hozzáadása előtt beadagolt koszolvans (500 μl) típusán. A különböző szerves oldószerek esetén a lemosásnál is az adott oldószert alkalmaztam 25%-ban keverve HEPES pufferrel. A koszolvans nélküli esetben az eredeti receptnek megfelelően 25%-ban 2-propanolt tartalmazó puffert használtam, hogy a szol-gél képzés után visszamaradó TEOS-t biztosan elmossam a biokatalizátor mellől.

4.6. táblázat: Szerves oldószer hatásának vizsgálatára felhasznált koszolvensek.

IPA	2-propanol (eredeti receptben is ez volt)
ACN	acetonitril
DMSO	dimetil-szulfoxid
Puffer	HEPES puffer

4.6.9. Stabilizált biokatalizátorok vizsgálata α -metilbenzilamin átalakításában



4.7. ábra: Transzamináz biokatalizátorok tesztreakciója.

A stabilizált biokatalizátorokból, az eredetileg bemért komplexált enzimet tartalmazó mágneses nanorészecskére nézve 10 mg/ml koncentrációjú szuszpenziót készítettem. Ebből a szuszpenzióból 250 μ l-t mértem egy 4 ml-es kisüvegbe. Mágnessel szeparáltam a katalizátort, és eltávolítottam mellőle a puffert. Ezt követően adtam hozzá 1 ml-t a reakcióelegyből, melynek összetétele a következő volt: 20 mM racém α -metilbenzilamin, 0,2 mM PLP, 12 mM nátrium piruvát HEPES pufferben (50 mM, pH=7,5). Ezt követően a mintákat termosztálható síkrázógép segítségével rázattam (30 °C, ~500 rpm) és 0,5, 4 és szükség esetén 24 óra elteltével vettem 20 μ l mintát, amelyet 980 μ l HEPES pufferrel hígítottam. A levett minták abszorbanciáját 245 nm-en mértem plate-olvasóval.

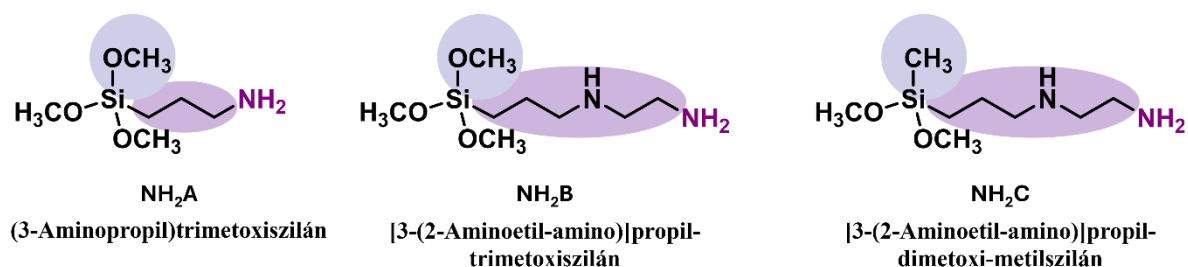
A visszaforgatási kísérletek során a körök között a biokatalizátorokat 3x2 ml HEPES pufferrel mostam. Minden mosás esetén 5 percig rázattam a katalizátorokat a pufferben.

5. Eredmények és értékelésük

5.1. Mágneses nanorészecskék előállítása és felületmódosítása

A mágneses nanorészecskéket a kutatócsoportban régóta alkalmazott szolvotermál módszerrel állítottam elő vas-kloridból, majd tetraetoxi-szilánból egy szilika bevonatot alakítottam ki a részecskéken. A szilika héj egyrészt megkönnyíti a további funkcionálizálást, másrészt a bevonattal rendelkező részecske jóval könnyebben kezelhető mind a bemérések, mind a szuszpendálás során.

A felületmódosítást három különböző aminoszilánnal végeztem el. A három aminoszilán egyrészt a szilícium és az aminocsoport közti linker hosszában, másrészt a metoxicsoportok számában, amin keresztül a felülethez tud kapcsolódni, tért el (5.1. ábra).



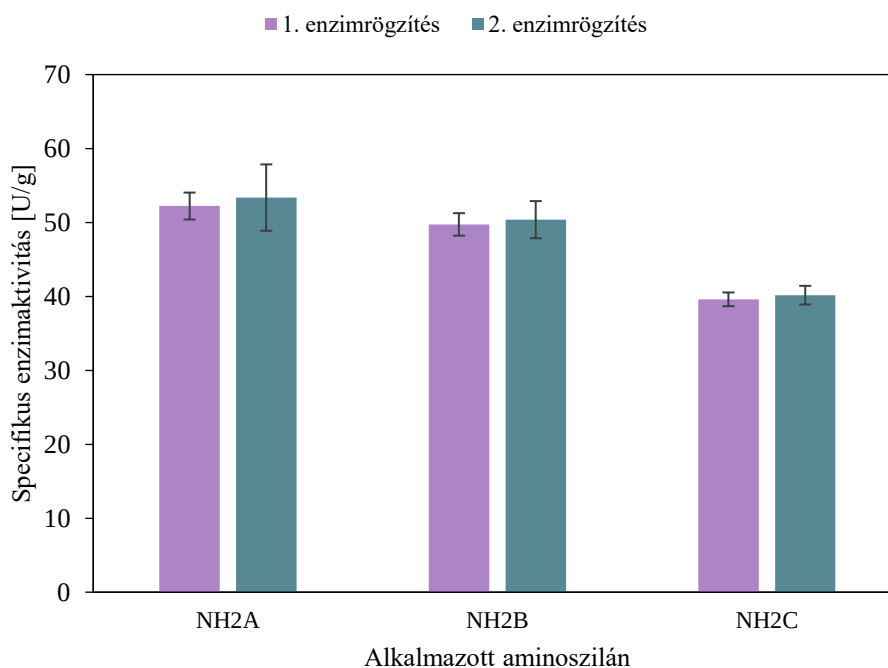
5.1. ábra: A felületmódosítás során alkalmazott különböző aminoszilánok.

A módosítást követően ninhidrin kolorimetriás méréssel meghatároztam a hordozók felületén lévő aminocsoportok számát, melyből következtettem a szükséges EDTA-dianhidrid mennyiségére. Az eredmények alapján (4.6.4 fejezet) megállapítható, hogy a NH₂A részecskéken volt a legtöbb lehetősége kötődni az EDTA-nak a hordozóhoz. Ezzel nagyobb mennyiségű kobalt ion került felületikomplexbe, amitől azt vártam, hogy több enzim megkötésére lesz képes. Ezt igazolta a rögzült enzimmennyiség meghatározására tett kísérlet. A fermentáció után kapott fehérjekeverékből elvégeztem a célenzim komplexálását a funkcionizált mágneses nanorészecskéekkel. A rögzítést követően összevetve a visszamaradó fehérjekeverék specifikus enzimaktivitását aktivitását a kiindulási, célenzimet tartalmazó, fehérjekeverékével, azt tapasztaltam, hogy az NH₂A szilánnal módosított részecske szinte a teljes célenzim mennyiséget megkötötte (5.1 táblázat). Az NH₂B típusú hordozóval kicsivel kisebb kapacitást értem el, míg a legkevesebb célenzimet az NH₂C szilánnal módosított mágneses nanohordozó kötötte meg. Ezek az eredmények megfeleltek az aminocsoportok mennyisége alapján vártaknak.

5.1. táblázat: Rögzült enzim aránya az egyes módosított MNP-k esetén.

NH ₂ A részecske	NH ₂ B részecske	NH ₂ C részecske
99%	94%	86%

Az enzimrögzítési folyamatot követően vizsgáltam az egyes aminoszilánok hatását a biokatalizátor aktivitására. Két rögzítési sarzs esetén is vizsgáltam a kapott biokatalizátor aktivitását az α -metilbenzilamin átalakításában, egy sarzson belül pedig háromszoros ismételten végeztem el a tesztreakciót. Így mind a rögzítésből, mind pedig a tesztreakció hibájából adódó szórásról képet kaphattam. Látható, hogy a rögzítési sarzsok között csak igen kis eltérés van, és egy rögzítésen belül is alacsony volt a szórás (5.2. ábra). Az NH₂C részecskével az elért aktivitások is elmaradtak a másik kettőtől, mely a kisebb enzimmegkötő kapacitással magyarázható. Az NH₂A és NH₂B között nincs szembevetendő különbség. A további kísérletekhez a nagyobb kapacitású és jó aktivitású NH₂A részecskéket választottam.



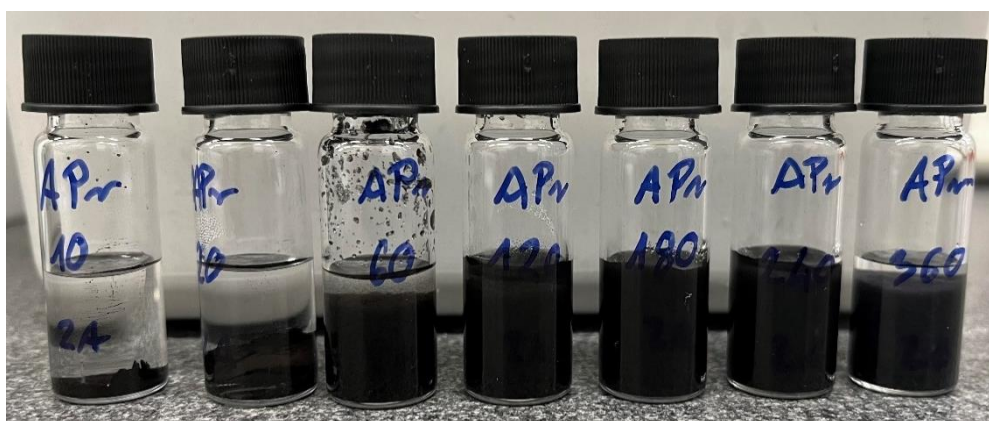
5.2. ábra: Különböző aminoszilánokkal elért aktivitás értékek.

5.2. Szilikaréteg vastagságának optimalizálása

A rögzítési folyamat után az MNP és a rajta lévő enzim köré egy újabb szilikaréteget hoztam létre utólagos stabilizálás céljából. Erre azért van szükség, mert az alkalmazás során előfordulhat olyan körülmény amikor az enzim kiszorulhat a kobalt ionnal képzett komplexből (például a fémionnal komplexet képző szubsztrát átalakítása). Így a reakcióelegybe jut, vagy a mosási lépések közben válik le, ami miatt egyrészt jelentős aktivitás csökkenés következik be

a visszaforgatások során, másrészt szennyezi az előállított terméket. A szilikaréteg megfelelő vastagságának megválasztásával megelőzhető az enzimszivárgás, a szubsztrát és a termék megfelelő diffúziójának megőrzése mellett. A szilikaréteget ebben az esetben is tetraetoxiszilánból (TEOS) alakítottam ki. A rögzítéshez a már korábban kiválasztott NH_2A szilánnal módosított mágneses nanorészecskéket használtam.

A kísérleteket úgy végeztem, hogy azonos komplexképzéssel rögzített biokatalizátor mennyiségekhez egyre növekvő mennyiségű TEOS prekuzort alkalmaztam, illetve ezekkel párhuzamosan szilikaréteg nélküli biokatalizátor aktivitását is mértem referenciaként. Az 5.3. ábrán 1 napos ülepedést követően láthatóak a bevonattal ellátott biokatalizátorok melyek térfogata szemmel láthatóan is igen eltérő. Az első öt minta esetében folyamatos növekedés figyelhető meg, majd pedig kissé csökken a térfogat. A kezdeti növekedés azzal magyarázható, hogy az egyre vastagabb szilikarétegnek köszönhetően több folyadékot tart magában a mátrix. Ez a rögzítést követő lemosások során is érzékelhető volt. Jóval kevésbé lehetett szeparálni a mosófolyadékot azoknál a részecskéknél, ahol több szilánt alkalmaztam. Az utolsó minták esetén az enyhe térfogat csökkenés magyarázata lehet, hogy bizonyos TEOS mennyiség felett megindul egy szilika nanorészecske képződés is, a bevonatképződéssel párhuzamosan. Ez az elegyben szabad szemmel nem feltétlenül észrevehető, viszont a bemért TEOS-t jelentősen fogyasztja, így a szilikaréteg vastagsága nem növekszik olyan mértékben, mint a bemért TEOS mennyisége alapján várható volna.

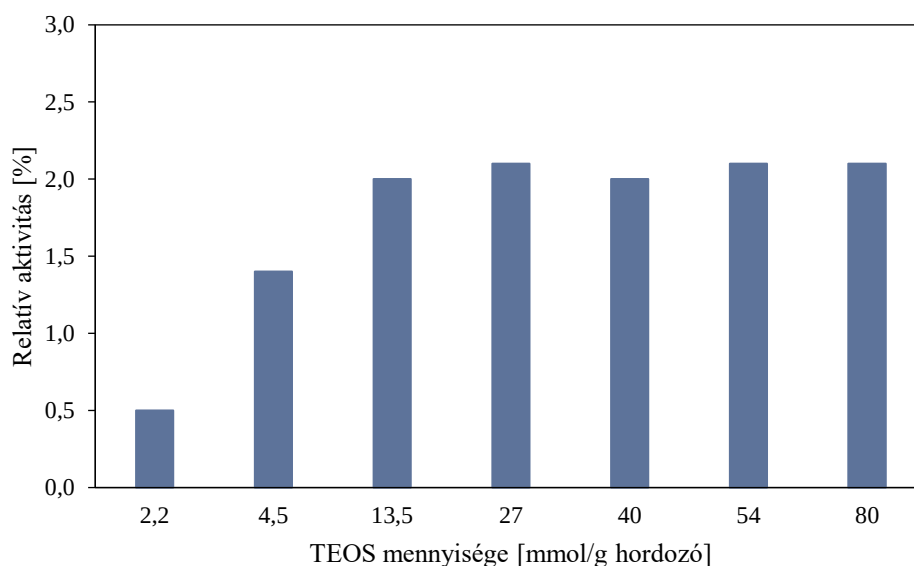


5.3. ábra: Különböző TEOS mennyiségekkel létrehozott biokatalizátorok.

Balról jobbra: 2,2; 4,5; 13,5; 27; 40; 54 és 80 mmol/g hordozó.

Az 5.4. ábra az α -metilbenzilamin átalakítása során mért relatív aktivitás értékeket mutatja, ahol a stabilizáló szilikabevonatot nem tartalmazó biokatalizátor volt a referencia, melyhez viszonyítottam az egyes eredményeket. Az aktivitásokat igyekeztem közel azonos konverziók elérése esetén összevetni. Jelen esetben ez 10% körüli értékeket jelentett, melyet a

referencia katalizátorral fél óra alatt, míg a bevontakkal 1 napos reakcióidő után értem el. Látható, hogy bizonyos TEOS mennyiség után lényegében nem változik a kész biokatalizátor aktivitása, valamint egyik esetben sem érte el a relatív aktivitás a 3 %-ot, ami igen jelentős aktivitás csökkenést jelent. Ezt több tényező is okozhatja, melyek közül elsősorban a térháló kiépítésénél alkalmazott szerves oldószer (2-propanol) jelenlétét gondoltam a legkritikusabbnak. Ezt a TEOS jobb oldódásához alkalmaztam és körülbelül 11 %-át adta a reakcióelegynek, a HEPES puffer mellett. Ennek hatását a későbbiekben vizsgáltam is.



5.4. ábra: Relatív aktivitás értékek a TEOS mennyiségének függvényében.

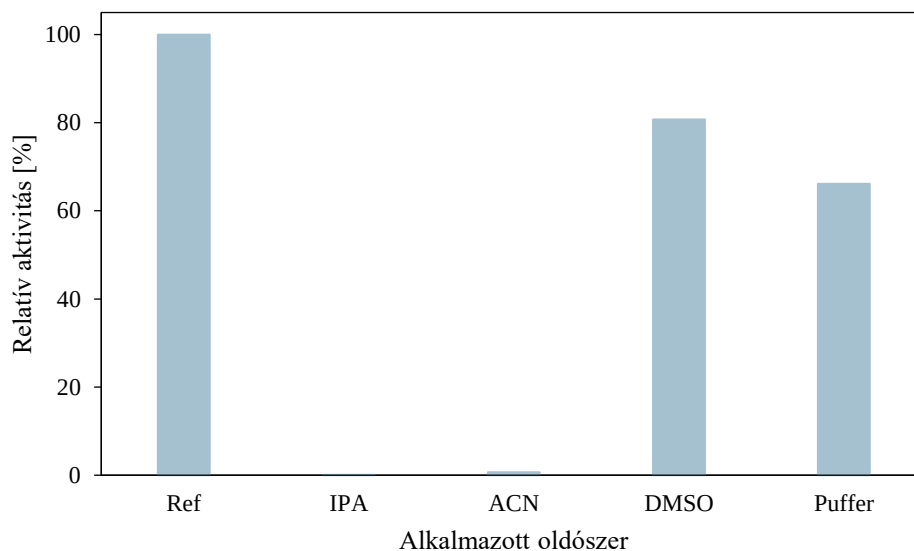
A telítésbe hajlást magyarázta az lehet az, hogy nagyobb TEOS mennyiség mellett, hamarabb kialakult egy szilikaréteg, ami bizonyos mértékben megvédte az enzimet a szerves oldószertől. Emiatt az egyre nagyobb diffúziós gátból következő egyre jelentősebb aktivitáscsökkenés nem látható. Amennyiben az enzim dezaktiválódásának oka a 2-propanol, akkor a szerves oldószer cseréje mellett megoldást jelenthet még a kontaktidő csökkentése, ehhez viszont egy gyorsabban hidrolizáló és ezáltal gyorsabban térhálósodó szilán prekursorra volt szükség, így a továbbiakban tetrametoxi-szilánnal (TMOS) is elvégeztem a mátrixképzést.

5.3. Szerves oldószerek hatásának vizsgálata

Az aktivitás csökkenésének vizsgálatára különböző vízzel elegyedő szerves oldószerek (2-propanol, acetonitril, dimetil-szulfoxid) jelenlétében végeztem el a szilikaréteg kialakítását, valamint, vizsgáltam azt az esetet is, ahol csak HEPES pufferben történik a mátrixba zárás. Utóbbit azért szerettem volna kipróbálni, mert az irodalomban van rá példa, hogy szerves oldószer jelenléte nélkül, vizes közegben hoztak létre szilika nanorészecskéket.^[52] A TEOS

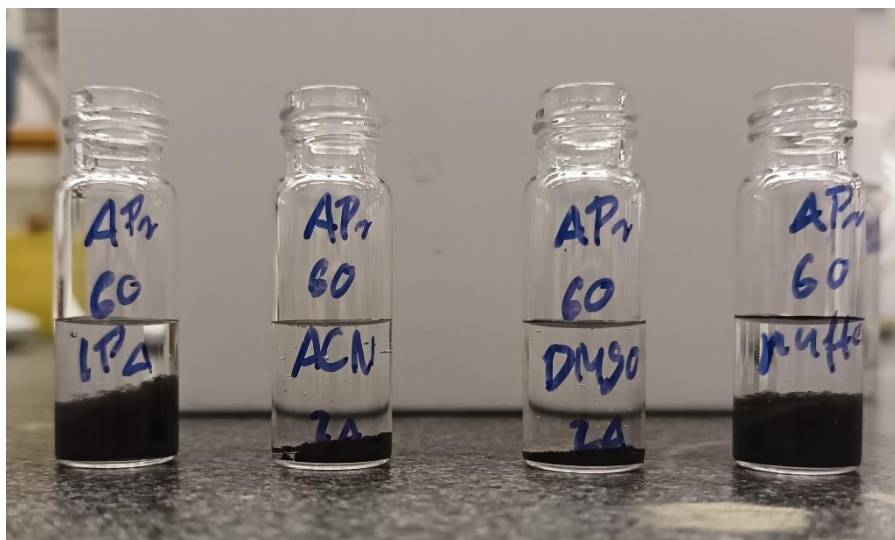
mennyisége mindegyiknél 13,5 mmol/g hordozó volt. Ezt azért választottam, mert ennél már telítésbe hajlott az előző kísérletben a relatív aktivitás, illetve a magasabb mennyiségekhez képest könnyebben lehetett bánni az elkészült biokatalizátorral. Ezalatt azt kell érteni, hogy sokkal egyszerűbben elválík a rajta lévő folyadéktól mágnes segítségével, kevésbé duzzad és tartja magában a folyadék fázist. Így a mosási lépések során a teljes, nem a mátrixban lévő folyadékot le lehetett szívni róla pipettával.

Az eredmények alapján egyértelműen látszik, hogy az alkalmazott oldószernek jelentős hatása van (5.5 ábra). A 2-propanol (IPA) és acetonitril (ACN) esetén nagyon alacsony a relatív aktivitás értéke, míg a dimetil-szulfoxid (DMSO) és csak puffert tartalmazó elegy esetén 60 % feletti.



5.5. ábra: Relatív aktivitás értékek különböző oldószerek esetén.

A kísérletek során egy másik érdekes jelenségre is figyelmes lettem. Az 5.6 ábra mutatja, hogy nem minden oldószer esetén alakult ki szemmel látható mátrix. Az IPA és a puffer esetén nagyon hasonló jellegű katalizátorokat kaptam. Ezzel szemben az ACN és a DMSO alkalmazásával mintha nem történt volna meg a térháló kialakulása.



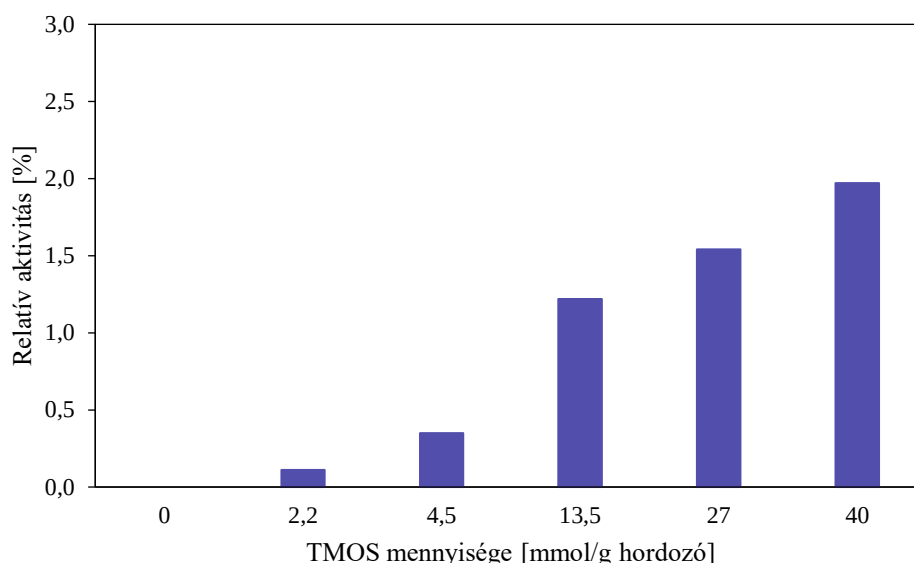
5.6. ábra: Különböző oldószerekben létrehozott, mátrixba zárt biokatalizátorok.

Balról jobbra: IPA, ACN, DMSO, puffer

5.4. TMOS alkalmazása TEOS helyett

A szerves oldószerek hatása mellett elvégeztem más típusú szilánnal is a mátrixba zárást, ezzel vizsgálva hatását az aktivitásra. A referencia mellett olyan biokatalizátorral is elvégeztem a tesztreakciót, mely TMOS nélküli, de a mátrixképzéshez szükséges elegyben rázódott, így vizsgálva, hogy valóban a 2-propanol jelenléte okozza-e az aktivitásvesztést. A szilikaréteg képzése során azonos arányokban alkalmaztam a szilán prekuzort, mint a TEOS esetében, és az elegy minden esetben tartalmazta a kb. 11 % 2-propanolt. Mivel a tetrametoxi szilán jóval gyorsabban hidrolizál, ebben az esetben a stabilizáló réteg kialakítása csak 2,5 órát vett igénybe, és ezt követően el is távolítottam a biokatalizátort az elegyből. A két legnagyobb szilán mennyiség (54 és 80 mmol/g hordozó) esetén nem végeztem el a katalizátor lemosását és nem teszteltem reakcióban sem, mivel annyira begélesedett és összeálltak a részecskék, hogy nem tudtam hatékonyan szeparálni a mágneses részecskéket a folyadék fázistól.

A relatív aktivitás értékek ebben az esetben is növekvő tendenciát mutatnak, viszont az előzőekhez hasonlóan 3 % alattiak. A TMOS nélküli, de a mátrixképzés elegyében rázódó katalizátorral egyáltalán nem történt termék képződés, így elmondható, hogy valószínűleg a 2-propanol csökkenti le jelentős mértékben az aktivitást.



5.7. ábra: Relatív aktivitás értékek a TMOS mennyiségének függvényében.

TMOS alkalmazás azért is lehet előnyös, mert bár drágább perkurzor mint a TEOS, a mátrixképzés végbe megy pár óra alatt. Ezzel szemben a TEOS-ból kialakított réteg kialakulásához jóval több idő szükséges.

5.5. TEOS mennyiség optimalizálása pufferben

Az alacsony aktivitás okának kiderítésére végzett kísérletek során egyértelműen kiderült, hogy a 2-propanol jelenti a problémát. A kiváltására használt DMSO esetén a nem bevont hordozóhoz igen hasonló aktivitást mértem, ugyanakkor a katalizátor jellege is igen hasonló volt a stabilizáló bevonatot nem tartalmazó biokatalizátoréhoz, mintha nem épült volna ki a bevonat. Ezért a további optimalizálást a szerves oldószer nélküli mátrixképzéses módszerrel végeztem, és emellett megismételtem a DMSO-val végzett kísérletet is, hogy további vizsgálatokat tudjak végezni.

A szerves oldószermentes stabilizálások során ugyanazokat a TEOS-mágneses nanorészecske arányokat alkalmaztam, mint korábban. A bevonat képződés során már tapasztaltam eltérést a 2-propanolos módszerhez képest. A nagyobb TEOS tartalmú minták sokkal jobban gélesedtek, és a lemosásuk is nehezebb volt. A növekvő TEOS mennyiséggel itt is növekedett egy ideig a katalizátorok térfogata, és vízmegtartása. A legtöbb szilán prekursorból kiinduló bevonás esetén itt is tapasztaltam a végső katalizátor térfogat csökkenését. A magyarázat ebben az esetben is az lehet, hogy a TEOS nagyobb része nem a nanorészecske köré épülő térháló kialakítására fordítódott, hanem attól függetlenül szol-gél képződésre.

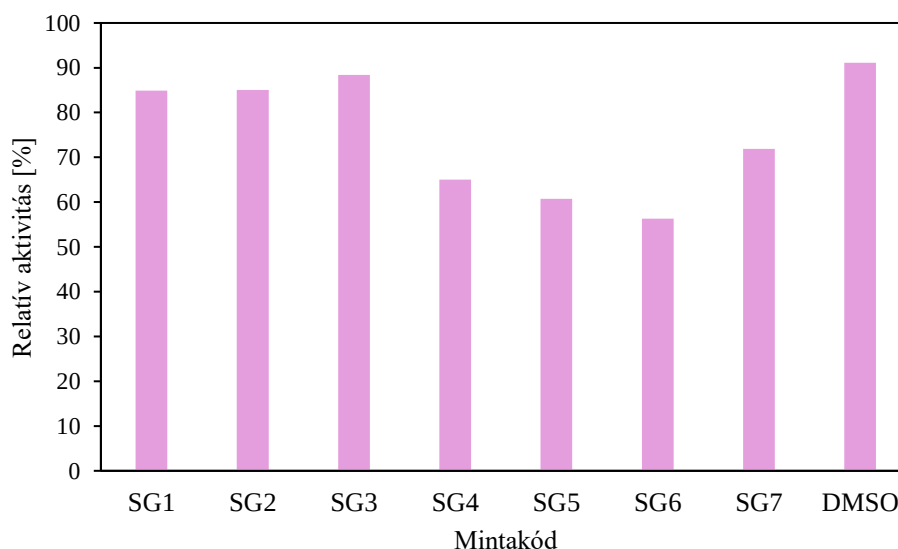


5.8. ábra: Különböző TEOS mennyiségekkel létrehozott biokatalizátorok pufferben.

Balról jobbra: 0; 2,2; 4,5; 13,5; 27; 40; 54 és 80 mmol/g hordozó.

Annak érdekében, hogy vizsgáljam a stabilizáló szol-gél réteg hatékonyságát a már megszokott α -metilbenzilamin – acetofenon átalakításban teszteltem a biokatalizátorok aktivitását 5 egymás utáni körben visszaforgatva azokat, körönként 2 órás reakcióidőt alkalmazva.

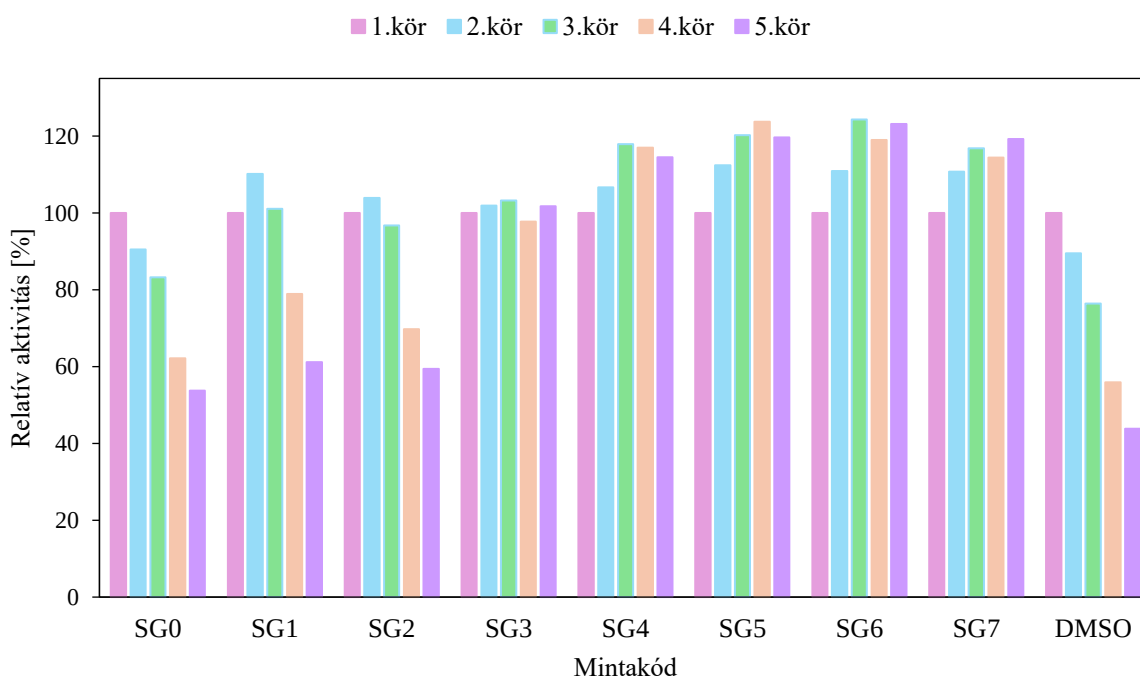
Ebben az esetben az első körös reakciónál már azt tapasztaltam, hogy amennyiben kevesebb TEOS-t alkalmaztam a bevonásnál, és így vékonyabb térháló épült ki jobb aktivitásokat értem el (5.9. ábra). A vastagabb szilikaréteg nagyobb diffúziós gátat jelent, mely lassítja a reakciót, így a mért specifikus biokatalizátor aktivitás is kisebb lesz. Ez a kutatócsoport korábbi eredményeivel is összhangban volt.



5.9. ábra: Szilikaréteggel stabilizált biokatalizátorok aktivitása, a nem stabilizált biokatalizátorhoz viszonyítva.

Az SG7-es minta esetén, bár itt használtam a legtöbb szilánt, a megugró aktivitás magyarázata lehet, hogy ahogyan fentebb is látható, a kiépült stabilizáló bevonat vélhetően nem volt olyan vastag, mint az SG4-6 mintáknál. A nem stabilizált katalizátorhoz viszonyítva a legjobb aktivitást az SG3 és a DMSO koszolvens mellett készült biokatalizátorokkal értem el. Az alkalmazott TEOS mennyiség minkét esetben 13,5 mmol/g nanorészecske volt.

A visszaforgatások során minden katalizátortípus esetén az adott katalizátor első tesztreakciós körben mért aktivitását vettem 100%-nak, és ehhez viszonyítottam a következő körökben mért értékeket. A reakciók végén háromszor átmostam a biokatalizátorokat, mielőtt elindítottam volna a következő mérési kört. Az első lemosás során vizsgáltam a mosóoldatok elnyelését is, annak érdekében, hogy lássam mennyire mosódik ki a termék a katalizátor mellől. Ez leginkább a folyadékot jobban megtartó, vastagabb szilikaréteget tartalmazó minták esetén volt kérdéses. Mivel a harmadik mosás végére az első mosófrakcióhoz képest annak töredékére csökkent az elnyelés, ezért a továbbiakban 3 mosási lépést iktattam be a visszaforgatások közé.



5.10. ábra: Visszaforgatási kísérletek a csak komplexképzéssel rögzített és a szilikaréteggel stabilizált katalizátorok esetén.

A visszaforgatások során egyértelműen kijött a nem stabilizált (SG0) katalizátor hátránya. Még így is folyamatos aktivitáscsökkenést tapasztaltam, pedig a reakcióközegben nem volt olyan vegyület, mely kiszorította volna az enzimet a komplexből. Látható tehát, hogy az utólagosan kialakított bevonat mindenképp stabilizálja az enzimet és védelmet nyújt nem csak a lemosódással, de az esetleges további inaktíválódáshoz vezető tényezőkkel szemben is.

Szintén csökkenő tendenciát mutatott a két legkevesebb szilánprekurzorral stabilizált katalizátor, az SG3 minta esetén, melynek a relatív aktivitása is a legnagyobb volt, az ötödik kört követően sem tapasztaltam aktivitáscsökkenést.

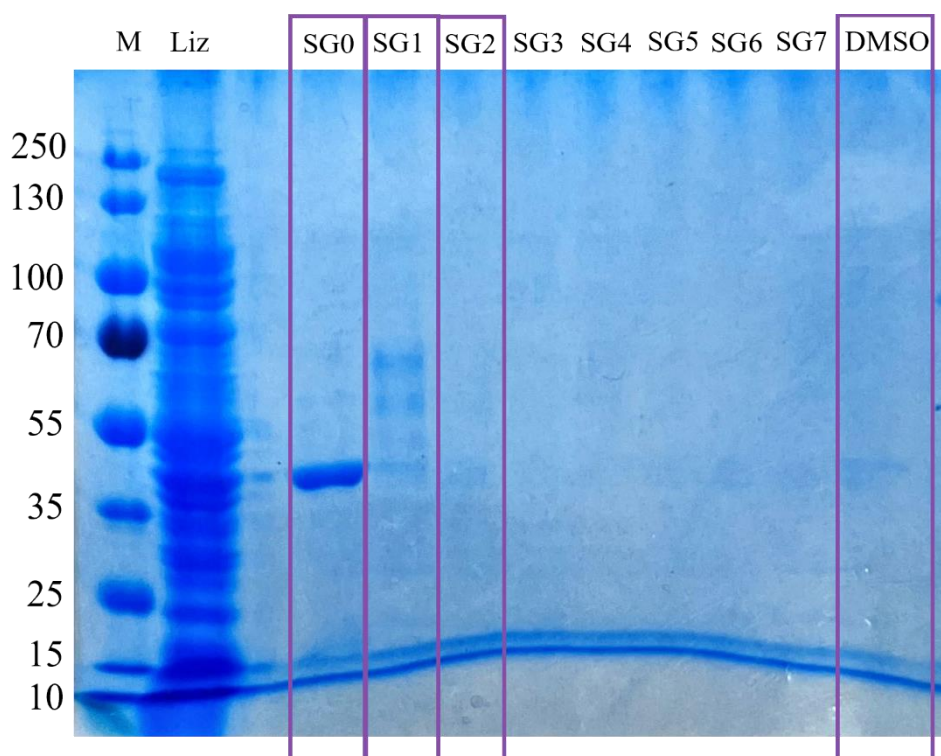
A további növekvő TEOS mennyiség mellett stabilizált minták esetén körről-körre kis mértékben növekedett az aktivitás, ezért a harmadik kört követően ismét elkezdtem vizsgálni a reakciók közötti mosófrakciókat, és azt tapasztaltam, hogy az SG4-7 minták esetében a harmadik lemosás után vett mintában is emelkedett abszorbanciát mértem. Ennek oka az lehetett, hogy a körök között folyamatosan telítődött szilikaréteg, és egyre nehezebb volt kimosni belőle a reakciókomponenseket. A negyedik kör végén addig ismételtam a mosásokat, amíg a mosó oldat elnyelése meg nem egyezett a tiszta pufferével, majd friss puffer alatt tettem el éjszakára a biokatalizátorokat. Az ötödik kör előtt vizsgáltam ennek a puffernek is az elnyelését, és azt tapasztaltam, hogy a legnagyobb térfogattal rendelkező SG6 minta esetén az éjszaka folyamán növekedett az elnyelés, tehát további reakciókomponensek oldódtak ki a mátrixból. Ezek alapján sem a túl kevés, sem a túl sok TEOS prekursor alkalmazása nem előnyös, mivel az első esetben nem alakul ki megfelelő réteg a kellő védelemhez, utóbbinál pedig a rétegbe diffundáló reakciókomponenseket nagyon nehéz eltávolítani, valamint a mért biokatalizátor aktivitás is csökken a nagyobb diffúziós gát miatt.

Bár az első körös mérés után a DMSO jelenlétében stabilizált biokatalizátor is ígéretesnek tűnt, a visszaforgatások során itt is folyamatos aktivitáscsökkenést tapasztaltam. Azonban a módszer teljes elvetése előtt, a továbbiakban érdemes lenne megvizsgálni itt is a TEOS mennyiségének a hatását, hiszen elképzelhető, hogy csak az optimális TEOS mennyiség van máshol a pufferes módszerhez képest. Ugyanakkor, ha csak nagyobb szilán prekursor mennyiséggel lehet jó eredményeket elérni, akkor mind gazdasági, mind környezetvédelmi szempontból előnyösebb lehet a szerves oldószer mentes módszer mellett maradni.

5.6. Enzimszivárgás vizsgálata

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjak arról, hogy a legígéretesebbnek tűnő csak HEPES pufferben végzett stabilizálás során valóban kialakul egy olyan szilikaréteg, mely a fémion-fehérje komplex felbomlása esetén vissza tudja tartani az enzimet, elúciós vizsgálatot végeztem. A katalizátort olyan imidazol oldatban (1M, LS pufferben oldva, $pH = 7,5$) rázattam, melyet az IMAC elvű fehérjetisztítások során alkalmaznak a hisztidinjelölt fehérje kiszorítására a komplexből. Minden, a visszaforgatások során is vizsgált biokatalizátor típusból elvégeztem a lemosást. A biokatalizátort fél órán át kevertettem az imidazol oldatban, majd az oldatból

mintát vettem és gélelektroforézissel vizsgáltam, hogy megjelent-e a célenzim az oldatban. Referenciaként a nem stabilizált biokatalizátorral is elvégeztem a lemosási kísérletet. A gélképen (5.11. ábra) jól látható, hogy ebben az esetben a csak komplexképzéssel rögzített enzim kimosódik a komplexből és megjelenik a lemosó oldatban. Az SG1-es minta esetén is halványan láthatók fehérjefrakciók a gélképen. A DMSO-s minta esetén mindenképpen szükséges egy megerősítő töményebb mintaoldat készítése, hogy egyértelműen el lehessen dönteni, hogy látható-e fehérje a gélen. Nagyon pozitív viszont, hogy a legígéretesebbnek tűnő SG3 mintához tartozó sávban egyáltalán nem látható fehérje, tehát a mátrix valóban visszatartja a transzamináz enzimet.



5.11. ábra: Enzim kimosódás vizsgálata gélelektroforézissel.

M: marker (bal oldalon az ismert fehérjetömegek vannak megadva kDa-ban); Liz:lizátum. Lila kerettel a visszaforgatások során aktivitáscsökkenést mutató biokatalizátorokhoz tartozó mintákat jelöltem.

6. Összefoglalás

Kutatómunkám során előállítottam mágneses nanorészecskéket, melyek felületét módosítottam. A szelektivitásért felelős csoport kialakításához háromfajta aminoszilánt alkalmaztam linkerként, és vizsgáltam hatásukat a megkötött enzim mennyiségére és a végső biokatalizátor aktivitására. Az aminocsoportokon keresztül etilén-diamin-tetraecetsavból alakítottam ki a kobaltionok komplexálására képes csoportokat. A rögzítési folyamat során a célenzim hisztidinjén keresztül komplexet alkotott a fémionnal. Az eredmények alapján megállapítható, hogy az NH₂A részecskével értem el a legmagasabb rögzített enzim mennyiséget és specifikus enzimaktivitást, így ezzel folytattam a további kísérleteket. Az is látható, hogy az NH₂B részecske sem tér el jelentősen tőle, emiatt a későbbiekben ezzel is érdemes lehet tesztek elvégezni.

Utólagos stabilizálás céljából a hordozó és az enzim köré szol-gél mátrixot képeztem, mellyel az enzimszivárgást szerettem volna megelőzni. Első lépésként különböző TEOS mennyiségekkel végeztem el a szilikaréteg kialakítását, ahol a reakcióelegyben való oldódását 2-propanol segítette (~11%). A kész biokatalizátorok aktivitása jelentősen lecsökkent a bevonat nélkülihez képest. Ezt arra a két okra vezetem vissza, hogy a szerves oldószer jelentősen károsítja az enzimet, lecsökkentve ezzel az aktivitását, illetve, hogy túl hosszú a kontaktidő a réteggépzéskor.

Az első eset vizsgálatára három szerves oldószerrel (IPA, ACN, DMSO) és szerves oldószer alkalmazása nélkül végeztem el a bevonást egy kiválasztott szilán prekursor mennyiséget kiválasztva. Az aktivitás DMSO és csak puffer esetén maradt magas, viszont csak az utóbbinál volt látható bevonat képződése.

A kontaktidő csökkentésére TMOS-t alkalmaztam IPA jelenlétében, azonos mennyiségeket használva, mint a TEOS-sal. Emellett vizsgáltam, hogyan változik az aktivitás amennyiben szilán prekursor nélkül, csak a szol-gél mátrixképzés egyéb komponenseivel rázatom rövid kontaktidővel a biokatalizátort. A végső katalizátorok aktivitása ebben az esetben is jelentősen elmaradt a referenciához képest, és a nem bevont, de az IPA tartalmú elegyben rázódó biokatalizátor is elveszítette az aktivitását. Így a két kísérlet alapján megállapítottam, hogy az IPA alkalmazása csökkenti számottevően az enzim aktivitását.

A TEOS mennyiség optimalizálását, ennek okán, elvégeztem szerves oldószer hozzáadása nélkül, csak puffer alkalmazásával. Ezzel párhuzamosan vizsgáltam a DMSO-val létrehozott katalizátort is. Az eredmények ekkor már azt mutatták, amit korábban is tapasztaltak

a kutatócsoportban más enzim és aminoszilános felület esetén (de IPA-s mátrixképzéssel): vékonyabb szilikaréteg esetén magas a relatív aktivitás, a rétegvastagság, és ezzel a diffúziós gát, növekedésével azonban csökken. Ezen katalizátorok viselkedését egymás után megismételt, mosási lépéseket tartalmazó, többszöri visszaforgatással is vizsgáltam a tesztreakciókban. A stabilizálás nélküli esetben jelentősen csökkent az aktivitás körről-körre, ahogy a vékony szilikaréteggel rendelkező katalizátoroknál és a DMSO mintánál is. A vastagabb rétegeknél a mátrix magában tartotta a terméket, kimosása így nehezen volt megvalósítható, emiatt fordulhatott elő aktivitás növekedés.

Az enzimszivárgás tanulmányozására imidazol oldatos lemosást végeztem el, majd a mintákat gélelektroforézissel vizsgáltam. A stabilizálás nélküli katalizátor esetén egyértelműen látható, hogy az enzim lejött a felületről. Jelet adott a két legvékonyabb réteggel rendelkező biokatalizátor, illetve a DMSO-val előállított is. A többi esetben nem látható a fehérje, így ezeknél sikerült a stabilizálás.

A későbbiekben szeretném vizsgálni a TMOS-sel való réteggépzést csak puffer jelenlétében. Ezzel a végső katalizátor kialakítása jelentősen kevesebb időt venne igénybe, ami még úgy is előnyös lehet, hogy drágább az alkalmazott prekursor. Emellett DMSO-val is elvégezném az optimalizálást TEOS és TMOS esetén is. Ezzel felderítve, hogy az ideális mennyiség gazdasági és környezetvédelmi szempontok alapján elfogadható vagy nem. A kísérleteket kiterjeszteném az NH_2B részecskére is, hiszen az előkísérletben ezzel is magas rögzített enzimmennyiséget és aktivitást értem el. Emellett tervezem optimalizálni a részecske felületét, a beépített aminoszilán mennyiségével befolyásolható a kötőkapacitás és így a felületi enzimsűrűség, mely hatással lehet az aktivitásra (túl zsúfolt felület esetén hiába magas a kikötött enzimmennyiség, az ehhez arányosan viszonyított aktivitás csökkenhet). Emellett a stabilizáló szilikaréteg összetételének változtatásával is elérhető további aktivitás növekedés. A TEOS mellett egyszeresen és kétszeresen szubsztituált szilánokat alkalmazva kevésbé sűrű térháló hozható létre, mely az enzimet még képes visszatartani, de lehetővé tesz a reakciókomponensek könnyebb diffúzióját.

Összességében elmondható, hogy sikerült feltárni a kezdeti nehézségek okát és az SG3 mintával sikeresen stabilizáltam a felületen rögzített enzimet, teljesen elkerültem a szivárgását, illetve minimalizáltam a diffúziós gátat és a termékvisszatartást.

Irodalmi hivatkozások

- [1] Z. Molnár, E. Farkas, Á. Lakó, B. Erdélyi, W. Kroutil, B. G. Vértessy, C. Paizs, L. Poppe, *Catalysts* **2019**, 9, DOI 10.3390/catal9050438.
- [2] Sevelle Béla, *Biomérnöki Műveletek És Folyamatok*, **2011**.
- [3] E. Katchalski-Katzir, D. M. Kraemer, *J Mol Catal B Enzym* **2000**, 10, 157–176.
- [4] P. V. Iyer, L. Ananthanarayan, *Process Biochemistry* **2008**, 43, 1019–1032.
- [5] O. Barbosa, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, *Biotechnol Adv* **2015**, 33, 435–456.
- [6] Pécs Miklós, *Fermentációs Feldolgozási Műveletek*, **2011**.
- [7] C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb Technol* **2007**, 40, 1451–1463.
- [8] Dr. Bell Evelin, Fém-Fehérje Komplex És Átmenetifém Katalizátorok Fejlesztése És Alkalmazása, **2021**.
- [9] J. M. Guisan, F. López-Gallego, L. Betancor, C. Mateo, V. Grazu, G. Fernandez-Lorente, J. Rocha-Martin, J. M. Bolivar, K. Ovsejevi, C. Manta, F. Batista-Viera, *Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press, Totowa, NJ, **2013**.
- [10] E. Kranen, C. Detzel, T. Weber, J. Jose, *Microb Cell Fact* **2014**, 13, DOI 10.1186/1475-2859-13-19.
- [11] T. Jesionowski, J. Zdarta, B. Krajewska, *Adsorption* **2014**, 20, 801–821.
- [12] D. Weiser, F. Nagy, G. Bánóczy, M. Oláh, A. Farkas, A. Szilágyi, K. László, Á. Gellért, G. Marosi, S. Kemény, S. Kemény, L. Poppe, *Green Chemistry* **2017**, 19, 3927–3937.
- [13] C. Mateo, V. Grazu, J. M. Palomo, F. Lopez-Gallego, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Guisan, *Nat Protoc* **2007**, 2, 1022–1033.
- [14] E. Araya, P. Urrutia, O. Romero, A. Illanes, L. Wilson, *Food Chem* **2019**, 288, 102–107.
- [15] R. A. Sheldon, S. van Pelt, *Chem Soc Rev* **2013**, 42, 6223–6235.
- [16] Sánta-Bell, Molnár, Varga, Nagy, Hornyánszky, Paizs, Balogh-Weiser, Poppe, *Molecules* **2019**, 24, 4146.
- [17] B. Alács, A. Zrinyi, G. Hornyánszky, L. Poppe, E. Bell, *Catalysts* **2024**, 14, DOI 10.3390/catal14010014.
- [18] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature* **1975**, 258, 598–599.
- [19] J. Porath, B. Olin, *Biochemistry* **1983**, 22, 1621–1630.
- [20] G. Cao, J. Gao, L. Zhou, Z. Huang, Y. He, M. Zhu, Y. Jiang, *Biochem Eng J* **2017**, 128, 116–125.
- [21] Y.-M. Ko, C.-I. Chen, C.-J. Shieh, Y.-C. Liu, *Biochem Eng J* **2012**, 61, 20–27.
- [22] Y.-M. Ko, C.-I. Chen, C.-C. Lin, S.-C. Kan, C.-Z. Zang, C.-W. Yeh, W.-F. Chang, C.-J. Shieh, Y.-C. Liu, *Biochem Eng J* **2013**, 79, 200–205.
- [23] J. M. Guisan, F. López-Gallego, L. Betancor, C. Mateo, V. Grazu, G. Fernandez-Lorente, J. Rocha-Martin, J. M. Bolivar, K. Ovsejevi, C. Manta, F. Batista-Viera, *Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press, Totowa, NJ, **2013**.
- [24] D. Weiser, F. Nagy, G. Bánóczy, M. Oláh, A. Farkas, A. Szilágyi, K. László, Á. Gellért, G. Marosi, S. Kemény, L. Poppe, *Green Chemistry* **2017**, 19, 3927–3937.
- [25] R. A. John, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1995**, 1248, 81–96.
- [26] D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, *Trends Biotechnol* **2010**, 28, 324–332.
- [27] M. D. Patil, G. Grogan, A. Bommarius, H. Yun, *Catalysts* **2018**, 8, 254.

- [28] K. Szmejda, T. Florczak, I. Jodłowska, M. Turkiewicz, *Biotechnology and Food Science* **2017**, *81*, 23–34.
- [29] J. E. Clifton, I. Collins, P. Hallett, D. Hartley, L. H. C. Lunts, P. D. Wicks, *J Med Chem* **1982**, *25*, 670–679.
- [30] F. Steffen-Munsberg, C. Vickers, H. Kohls, H. Land, H. Mallin, A. Nobili, L. Skalden, T. van den Bergh, H. J. Joosten, P. Berglund, M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *Biotechnol Adv* **2015**, *33*, 566–604.
- [31] A. Łyskowski, C. Gruber, G. Steinkellner, M. Schürmann, H. Schwab, K. Gruber, K. Steiner, *PLoS One* **2014**, *9*, DOI 10.1371/journal.pone.0087350.
- [32] M. Höhne, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *Adv Synth Catal* **2008**, *350*, 807–812.
- [33] C. Iglesias, P. Panizza, S. Rodriguez Giordano, *Appl Microbiol Biotechnol* **2017**, *101*, 5677–5687.
- [34] C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science (1979)* **2010**, *329*, 305–309.
- [35] A. R. Martin, D. Shonnard, S. Pannuri, S. Kamat, *J Bioprocess Biotech* **2011**, *01*, DOI 10.4172/2155-9821.1000107.
- [36] D. Koszelewski, D. Pressnitz, D. Clay, W. Kroutil, *Org Lett* **2009**, *11*, 4810–4812.
- [37] J.-S. Shin, H. Yun, J.-W. Jang, I. Park, B.-G. Kim, *Appl Microbiol Biotechnol* **2003**, *61*, 463–471.
- [38] M. Fuchs, D. Koszelewski, K. Tauber, W. Kroutil, K. Faber, *Chemical Communications* **2010**, *46*, 5500–5502.
- [39] J. S. Shin, B. G. Kim, *Biotechnol Lett* **2009**, *31*, 1595–1599.
- [40] S. S. Yi, C. won Lee, J. Kim, D. Kyung, B. G. Kim, Y. S. Lee, *Process Biochemistry* **2007**, *42*, 895–898.
- [41] C. Lang, D. Schüler, D. Faivre, *Macromol Biosci* **2007**, *7*, 144–151.
- [42] M. Zahn, *Journal of Nanoparticle Research* **2001**, *3*, 73–78.
- [43] G. Scheunert, O. Heinonen, R. Hardeman, A. Lapicki, M. Gubbins, R. M. Bowman, *Appl Phys Rev* **2016**, *3*, 011301.
- [44] A. S. Teja, P.-Y. Koh, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* **2009**, *55*, 22–45.
- [45] S. Majidi, F. Zeinali Sehgig, S. M. Farkhani, M. Soleymani Goloujeh, A. Akbarzadeh, *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **2016**, *44*, 722–734.
- [46] X.-M. Li, G. Xu, Y. Liu, T. He, *Nanoscience & Nanotechnology-Asia* **2012**, *1*, 14–24.
- [47] A. Scano, V. Cabras, M. Piloni, G. Ennas, *J Nanosci Nanotechnol* **2019**, *19*, 4824–4838.
- [48] Q. Wang, W. Jia, J. Guo, J. Zhang, *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* **2012**, *23*, 1527–1532.
- [49] X.-M. Li, G. Xu, Y. Liu, T. He, *Magnetic Fe₃O₄ Nanoparticles: Synthesis and Application in Water Treatment*, **2011**.
- [50] A.-H. Lu, E. L. Salabas, F. Schüth, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 1222–1244.
- [51] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *J Colloid Interface Sci* **1968**, *26*, 62–69.
- [52] D. R. Hristov, E. Mahon, K. A. Dawson, *Chemical Communications* **2015**, *51*, 17420–17423.