



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Szerves Kémia és Technológia Tanszék

**Felületmódosított szilikagél hordozók előállítása és vizsgálata szakaszos
és folyamatos reaktorban felhasználható lipázok rögzítésére**

TDK dolgozat

2011.

Márkus Mária

IV. évfolyam
Vegyésszmérnök hallgató (BSc)

Témavezető: Dr. Poppe László, egyetemi tanár
BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Konzulens: Boros Zoltán, PhD hallgató
BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. Az enzimek.....	5
2.2. Enzimmkatalizált reakciók kinetikája	7
2.3. Lipázok alkalmazása szerves szintézisekben	9
2.4. Az enzimmkatalizált folyamatok jellemzése	10
2.5. Enzimmkészítmények előállítása, aktivitása	11
2.6. Az enzimmrögzítés.....	12
2.7. A hordozó felületének módosítása	15
3. Eredmények és értékelésük	17
3.1. Enzimek adszorpciója felületmódosított szilárd hordozóra	18
3.2. Az alkalmazott közeg hatása a szilikagélek felületmódosítására	22
3.3. Szilikagélek felületmódosításának optimalizálása	25
3.4. A lipázok adszorpciós rögzítésének optimalizálása	27
3.5. Felületmódosított szilikagélre rögzített lipázok alkalmazása folyamatos, átfolyósos reaktorokban.....	28
3.5.1. Az 1-feniletanol kinetikus rezolválása folyamatos, átfolyósos bioreaktorokban	29
3.5.2. Racém aminok kinetikus rezolválása folyamatos, átfolyósos bioreaktorokban	31
4. Kísérleti rész	35
4.1. Alkalmazott analitikai módszerek	35
4.2. Felhasznált anyagok	36
4.2.1. Oldószerek, vegyszerek.....	36
4.2.2. Biokatalizátorok	36
4.3. Szilikagélek felületmódosítása	36
4.4. Szilikagélek felületmódosításának optimalizálása	37
4.5. TRIS-puffer oldat készítése.....	37
4.6. Enzimek adszorpciós rögzítése szilikagél hordozókra	37
4.7. Biokatalizátorok tesztelése szakaszos üzemben.....	38
4.8. Biokatalizátorok tesztelése folyamatos üzemben.....	38
4.8.1. Racém 1-feniletanol kinetikus rezolválása folyamatos üzemben.....	38
4.8.2. Racém aminok kinetikus rezolválása folyamatos üzemben	38
5. Összefoglalás.....	39
6. Köszönetnyilvánítás	41
7. Irodalomjegyzék	42

Rövidítések jegyzéke

AmPrTMS	(3-aminopropil)trimetoxiszilán
CaLB	<i>Candida antarctica</i> B lipáz
CrL	<i>Candida rugosa</i> lipáz
DKM	Diklórmétán
PhTMS	Feniltrimetoxiszilán
Grace 150, G150	Grace Davisil® 150 szilikagél
Grace 250, G250	Grace Davisil® 250 szilikagél (40-63 µm)
Grace 915, G915	Grace Daraclar® 915 szilikagél
Grace 920, G920	Grace Daraclar® 920 szilikagél
G-Si-60, Geduran	Geduran® Si60 szilikagél
GC	Gázkromatográfia
IPA	2-propilalkohol
Lipáz AK	<i>Pseudomonas fluorescens</i> lipáz
Lipáz PS	<i>Burkholderia</i> (korábban <i>Pseudomonas</i>) <i>cepacia</i> lipáz
OctTMS	Oktiltrimetoxiszilán
PhTMS	Feniltrimetoxiszilán
PQ300	PQ300 szilikagél
TBME	<i>tert</i> -butil-metil-éter
THI	Tetrahedrális intermediér
TRIS	Trizma® HCl [trisz-(hidroximetil)-aminometán]

1. Bevezetés

Napjainkban a biokatalizátorok alkalmazása az optikailag aktív vegyületek előállításán túl zöld kémiai szempontból is egyre fontosabb. A biokatalízis iránti érdeklődés a 20. század elején vette kezdetét, melynek két fő kiváltója a szénhidrátok és aminosavak mikroorganizmusokkal történő nagy mennyiségű előállítása, illetve ezen szervezetek gyógyszerészeti és vegyipari célú használata volt, a penicillin felfedezését követően.¹ Az elmúlt évtizedek fejlesztéseinek, kutatásainak eredményeként ma választékos és hasznos biokatalizátor gyűjtemény áll rendelkezésünkre. Túlzás volna azt állítani, hogy minden szerves szintetikus reakciónak található egy enzimkatalizált formája, mégis nagy változatosságot figyelhetünk meg, annak tudatában, hogy mindegyik enzim ugyanazon 20 aminosav korlátozott választékából épül fel.

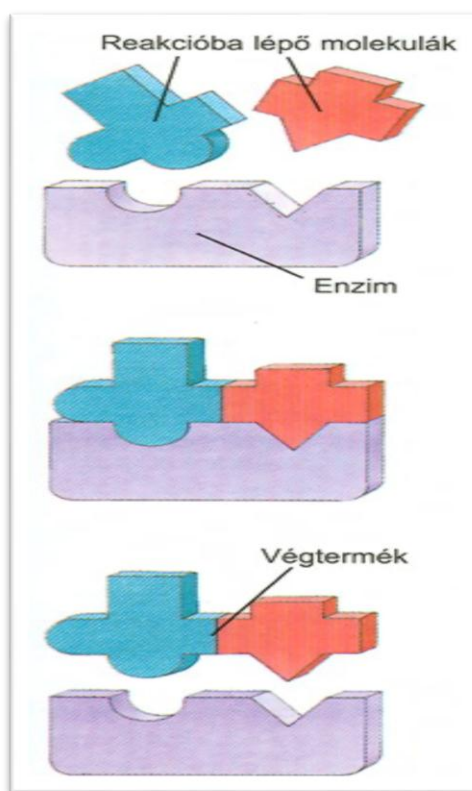
Az ismert enzimek közül több száz kereskedelemből is beszerezhető, közülük sok már rögzített formában is ismert. Azonban az enzimek ipari felhasználásának gátat szabnak a gazdaságossági megfontolások. A tiszta enzimek használata általában drága, ezért az elmúlt 30 évben nagy hangsúlyt helyeztek az enzimek rögzítésére.²⁻⁶ Az immobilizálás előnye többek között, hogy az enzimek a reakció után könnyen kinyerhetővé és újrafelhasználhatóvá válnak.⁷ Az eljárás folyamatos fejlődésének köszönhetően, az enzimek katalitikus tulajdonságai is hatékonyan befolyásolhatók, így nőhet a stabilitásuk, aktivitásuk és szelektivitásuk. Fontos azt is megemlíteni, hogy a rögzített enzimek könnyebben kezelhetőek, és az eltarthatóság javulásával is gazdaságosabbá válhatnak. Az enzim tulajdonságainak ilyen módon elért javulását elsősorban a felhasznált hordozó határozza meg.

Munkám célja az enzimek rögzítéséhez alkalmazható, felületmódosított, akár ipari használatra is alkalmas, olcsó hordozók fejlesztése és ezek alkalmazhatóságának tanulmányozása közvetlenül az enzimekkel katalizált sztereoszelektív reakciók segítségével. Mivel a különböző enzimek különbözőképpen módosított hordozókon rögzülhetnek jól, ezért az általunk előállított felületmódosított szilikagélekkel lehetőségünk nyílik enzimkeverékek elválasztására, tisztítására is.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az enzimek

Az enzimek kémiai szerkezetük alapján részben az egyszerű, részben az összetett fehérjékhez sorolhatók. Fontos élettani szerepük miatt, a hormonokkal és a vírusfehérjékkel együtt, külön csoportnak, a fiziológiailag aktív fehérjék csoportjának is tekinthetők. Az enzimek molekulamérete általában több nagyságrenddel nagyobb a szubsztrátumukénál. Ennek következtében a katalízisnél az enzimnek csak egy viszonylag kis része kerül a szubsztrátummal közvetlen kapcsolatba.⁷ Az enzimnek ezt a részét aktív centrumnak nevezzük, mely kettős feladatot lát el. Azon felül, hogy kötőhelyül szolgál a szubsztrátum molekulának, ez kerül kapcsolatba az átalakulásban részt vevő atomokkal, így katalizálja is egyben a folyamatot. Az aktív centrum kötőhelye és katalitikus helye nem feltétlenül esik az enzim molekula azonos részére. A nagy térbeli kiterjedésű enzimfehérjék gyakorta több szubsztrátumkötő vagy aktív hellyel rendelkeznek, ezen felül kosubsztrát és enzim modulátorkötő helyek is létezhetnek rajtuk.⁸



1. ábra Az enzimek szubsztrátum kötésének kulcs-zár mechanizmusa

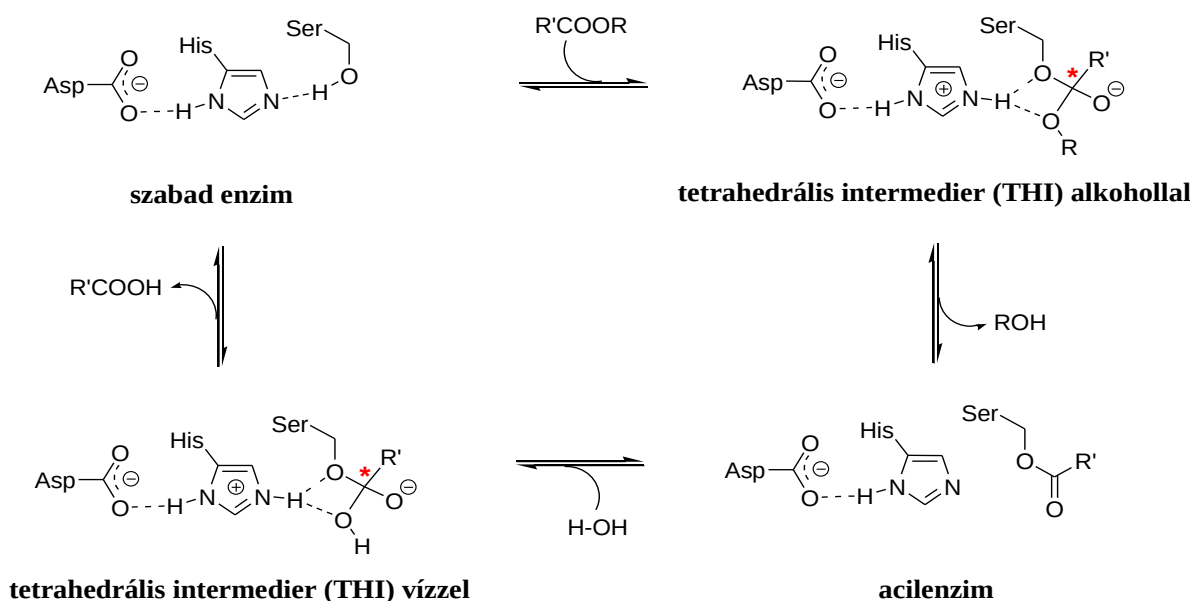
Az enzimek elnevezése egységes enzimológiai nómenklatúra alapján történik. Eszerint egy enzim elnevezésekor két alapvető szempontot kell figyelembe venni: az egyik a folyamat, amelyet az enzim katalizál, a másik az a speciális szubsztrátum, amelyre az enzim hat.⁹ A Nemzetközi Enzimbizottság (EC) az enzimeket az általuk katalizált reakciók szerint hat csoportba sorolta: oxidoreduktázok, transzferázok, hidrolázok, liázok, izomerázok, ligázok. Minden enzimet egy négy számjegyből álló kód jelöl, melynek első tagja arra utal, hogy az enzim melyik csoportba sorolható a fent említettek közül. A további két szám szűkíti az enzim alkalmazásának körét a szubsztráttal és az alkalmazott kofaktorral, míg az utolsó jelöli az enzimet az alosztályán belül.⁷ Kofaktorigényük szerint az enzimek további két csoportba sorolhatók. Azok, melyek működéséhez nem kellenek kofaktorok, egyszerűbben alkalmazhatók szintetikus célokra, méretnövelésük is gazdaságosabb.⁹

A lipázok a trigliceridek hidrolízisét katalizáló emésztőenzimek, melyek az hidrolázok alcsoportjába tartoznak, állatokban, növényekben és mikroorganizmusokban egyaránt előfordulnak. A lipázok alkalmazása igen sokrétű és rendkívül dinamikusan nő az élet legkülönbözőbb területein. A teljesség igénye nélkül, ilyen terület a vegyipar, a mosószeripar, tejipar és a lipázoknak szerepe van orvosi alkalmazásokban is.¹⁰ A lipázok heterogén katalízis során fejtik ki hatásukat, mivel a szerves és vizes fázis határfelületén működnek. Egyes lipázok specifikusak lehetnek a triglicerid észter-kötéseinek hasadására.¹¹ Különböző specifikitást mutathatnak az acil csoport lánchosszúsága szerint is, a nagyobb szénatomszámú észterek hidrolízise általában gyorsabb. A legtöbb lipáz szerves anyag vagy micella jelenléte nélkül gyakorlatilag inaktív, illetve természetes szubsztrátjaik általában vízzel nem elegyedő, tehát erősen hidrofób, lipofil karakterűek. Az enzimek aktív konformációjának fenntartásában, a fehérje flexibilitásának biztosításában nélkülözhetetlen szerepe van a víznek. Valamennyi víz minden enzim működéséhez szükséges, de ennek mennyisége változó. Szerves oldószeres közegben egyes lipázok működésükhöz csak kismennyiségű vizet (<0,3%) igényelnek, míg más enzimek optimális aktivitásukat valamivel magasabb víztartalomnál (2–13%) érik el. A víz és a szerves oldószer aránya, megoszlása a rendszerben, a polaritási viszonyok jelentősen befolyásolják az enzim működését.¹²

A lipázok aktív helyének hidrofób kötésre alkalmas régiójának két része van, az úgynevezett *hidrofób zseb* és az *alagút*. E két rész képes befogadni a neutrális zsírok zsírsav oldallánc(ai)t, illetve hosszabb szénláncú alkoholoknál szükség esetén az alkohol

oldalláncát is. Az alkohol és acil molekularészletek kötőhelyei átfedhetnek az enzim hidrofób kötő régiójában.^{11,13}

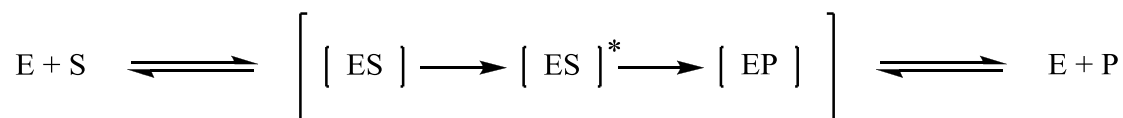
A lipázok működése során a katalitikus szerin nukleofil támadással az észter csoport karboniljára addicionál. Ezt követően a kilépő alkohol távozásával alakul ki az acil-enzim, amely ezután a belépő vízzel tetrahedrális intermediert (THI) képez (5. ábra).^{13,14} Ezt követően a karbonsav eltávozása után az enzim újabb hidrolízis katalizálására képes.



5. ábra A lipázok működési mechanizmusa¹⁴

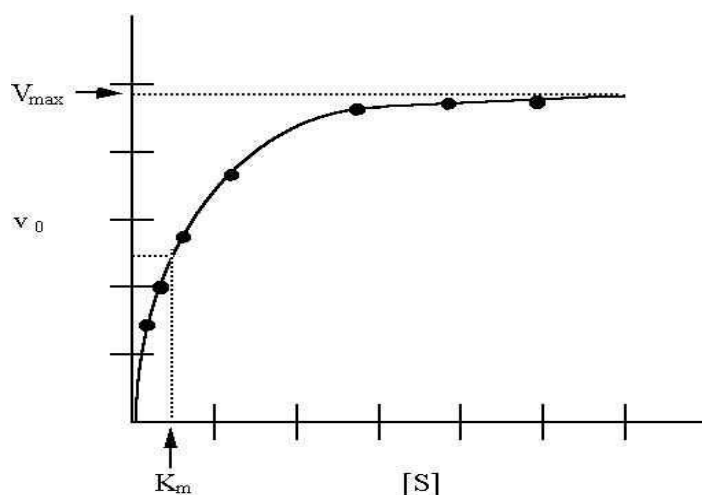
2.2 Enzimkatalizált reakciók kinetikája

Az enzimek által katalizált reakciók kinetikáját először Michaelis és Menten tanulmányozták, és ma is az ő általuk lerakott alapokon vizsgáljuk az enzimikus folyamatok mechanizmusát.¹⁵ A modell két meghatározó lépésből áll (2. ábra). Az első, egyensúlyi lépésében az enzim és a szubsztrát között egy átmeneti komplex alakul ki, melyben a termék átalakulása is bekövetkezik. A második, lassú lépés során kapjuk a terméket és a szabad enzimet. A két lépés lejátszódási ideje közötti különbség hatására, a katalízis során az enzim-szubsztrátum komplex felhalmozódik, ezért az egész enzimkatalízis reakciósebességét az enzim-szubsztrát komplex bomlásának sebessége határozza meg.



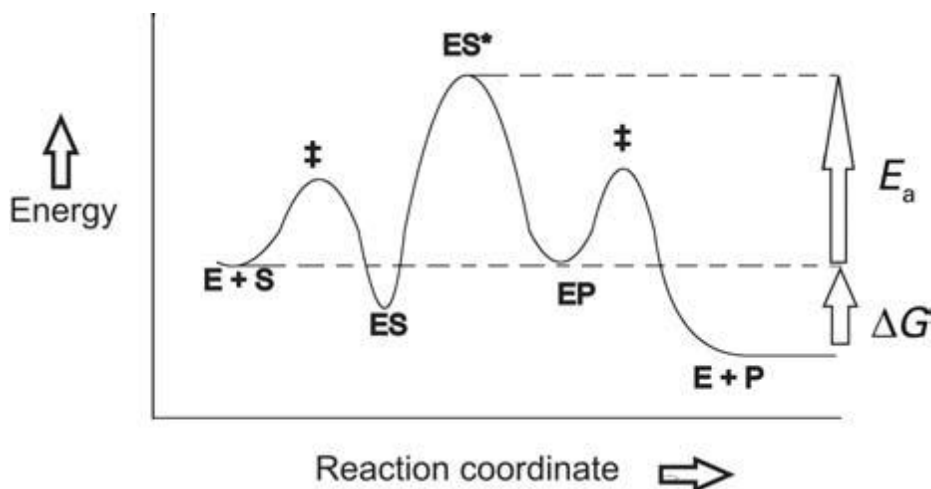
2. ábra A Michealis-Menten modell kétlépéses folyamata általánosan

Az enzimekkel végzett katalitikus reakciók során megfigyelhető, hogy a szubsztrát koncentrációját növelve, a reakció sebessége kisebb koncentráció-tartományban a szubsztrát mennyiségével lineárisan nő, majd stagnál. Ekkor szinte az egész enzim mennyiség enzim-szubsztrát komplexbe megy át (3. ábra). A reakció sebességének, tehát az enzim telítődése szab határt. Az enzimek túlnyomó többsége ezt a kinetikai modellt követi.



3. ábra A reakciósebesség alakulása a szubsztrátum koncentráció függvényében enzimkatalizált reakciók során

Ami a katalizált reakciók energiaprofiljáról általában elmondható, az az enzimkatalizált reakciókra is teljes mértékben helytálló. A 4. ábrán szemléltetett energiadiagram mutatja, hogy az enzim-szubsztrát komplex kialakulása milyen úton segíti a termék létrejöttét, az átmeneti állapot energiacsökkentő hatása révén.¹



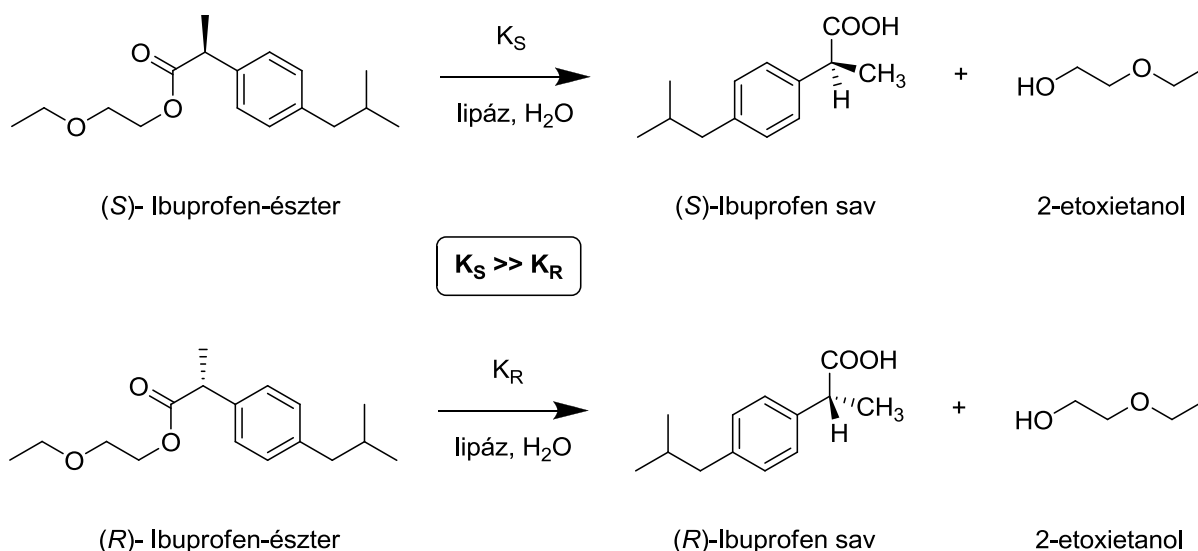
4. ábra Az enzimkatalízis energiadiagramja

2.3. Lipázok alkalmazása szerves szintézisekben

A környezetbarát technológiák és a katalizátorok újrafelhasználhatósága az utóbbi időben egyre nagyobb jelentőséggel bírnak a szintetikus alkalmazások területén.⁸ Ennek is köszönhető a biokatalizátorok egyre szélesebb körű elterjedése és a megnövekedett igény, a lehetséges felhasználási területek bővítése iránt. Az enzimek számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek, ezt támasztja alá, hogy az enzimkatalizált folyamatok akár 10-12 nagyságrenddel gyorsabbak lehetnek, mint az adott reakció katalizátor nélkül.⁹ Az enzimek szintézisekre való alkalmazása rendkívül előnyös lehet komplex, polifunkciós molekulák szintézise esetén, ugyanis felmerülhetnek olyan problémák, amelyek a klasszikus eljárásokkal nem vagy nem elég hatékonyan oldhatók meg, mint a racemizáció vagy a kémiai szelektivitás. A mai kor követelményeinek megfelelően környezetbarát¹⁶ királis molekulák, így igen magas szelektivitással különböztetnek meg enantiotóp csoportokat és felületeket.^{10,11} A megfelelő enzim alkalmazása kemo-, régió- és enantioszelektív átalakulást tesz lehetővé, valamint adott esetben nem kell oldallánc-védelemről és annak eltávolításáról sem gondoskodni. Ezenkívül használatukkal megelőzhető az aktiválószer használata, így gazdaságosabbá tehető a folyamat. A felhasználásukat az is előnyössé teszi, hogy viszonylag enyhe körülmények között, szobahőmérsékleten és semleges pH környékén működnek a legjobban. Az enzimek működését aktivitásukkal és szelektivitásukkal jellemezhetjük. Ezekre azonban számos tényező befolyással lehet, mint például a termék és szubsztrátum koncentrációja, a pH és a

hőmérséklet valamint a rendszerben előforduló többi anyag. Az egyes tényezők módosításával befolyásolhatjuk az enzimkatalizált reakció lefolyását.

Lipázok ipari alkalmazhatóságának szemléltetés példája az *(R,S)*-etoxietil-ibuprofen-észter enzimatis kinasz rezolválása rögzített lipázzal (6. ábra):¹⁷



6. ábra *(R,S)*-etoxietil-ibuprofen-észter kinasz rezolválása

2.4. Az enzimkatalizált folyamatok jellemzése

Enzimekkel enantiomer szelektív reakciók is megvalósíthatók, mivel királis tulajdonságuk miatt képesek a racém elegyet alkotó enantiomerek megkülönböztetésére. Az enzimekkel katalizált reakciók szelektivitásának jellemzéséhez két fontos paramétert használhatunk, az enantiomer felesleget (enantiomeric excess, *ee*) és az enantiomer szelektivitást (*E*).¹⁸ Ezeket a következő módon lehet számítani:

$$ee[\%] = \frac{M - M^*}{M + M^*} * 100$$

ahol *M* a fő enantiomer móltörtje, *M** pedig a szennyező enantiomer móltörtje.

Az enantiomer szelektitás (*E*) megmutatja, hogy az enantiomerek megkülönböztetése mennyire volt sikeres. Az *E* érték reverzibilis reakciók esetén a következő egyenlet szerint számolható:

$$E = \frac{\ln[1-(1+K)c(1+ee_p)]}{\ln[1-(1+K)c(1-ee_p)]} = \frac{\ln[1-(1+K)(c+ee_s\{1-c\})]}{\ln[1-(1+K)(c-ee_s\{1-c\})]}$$

Az összefüggésben szereplő K egyensúlyi állandót jelöl, míg a konverzió (c) a következő kifejezéssel adható meg:

$$c = \frac{ee_p}{ee_s + ee_p}$$

A képlet irreverzibilis reakciók esetében nagymértékben egyszerűsödik. Ekkor a konverzió (c) és a termék illetve szubsztrát frakciók enantiomer feleslegeinek [$ee(P)$, illetve $ee(S)$] értékeiből háromféleképpen számolható az enantiomer szelektivitás (E):

- c és $ee(P)$ értékekből:¹⁹

$$E_{c,ee_p} = \frac{\ln[1-c(1+ee_p)]}{\ln[1-c(1-ee_p)]}$$

- c és $ee(S)$ értékekből:¹⁹

$$E_{c,ee_s} = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]}$$

- és az $ee(S)$ és $ee(P)$ értékekből:²⁰

$$E_{ee_s,ee_p} = \frac{\ln[(1-ee_s)/(1+ee_s/ee_p)]}{\ln[(1+ee_s)/(1+ee_s/ee_p)]}$$

2.5. Enzimmészítmények előállítása, aktivitása

Az enzimeket egyre szélesebb körben alkalmazzák az iparban, gyógyászatban, tudományos kutatásokban.¹⁰ Az enzimeket ki kell vonni eredeti környezetükből, hogy ezekre a célokra felhasználhatók legyenek. Ez enzimmészítmények formájában valósítható meg. Az enzimmészítmények előállításának módja alapanyagonként és enzimenként változik. Az alkalmazott eljárásokkal szemben támasztott fontos kritérium, hogy kíméletes legyen a fehérjetermészetű enzim molekulához, amely nem megfelelő behatásra könnyen inaktiválódhat. Első lépés az enzimm kivonat előállítása. A nyersanyag előkészítése után a sejtből kinyerik az enzimet mechanikai feltárás és kioldás során. Ezután az enzimm kivonatot

szűréssel vagy centrifugálással tisztítják meg a különböző lebegő szennyeződésektől. Az így előállított enzimkivonatok sok egyéb oldott állapotban lévő kísérőanyagot tartalmazhatnak. Egyes ipari alkalmazásokhoz ilyen formában is jól használható, viszont gyógyszerészeti és tudományos felhasználás során teljesen tiszta, homogén enzimkészítményekre van szükség.

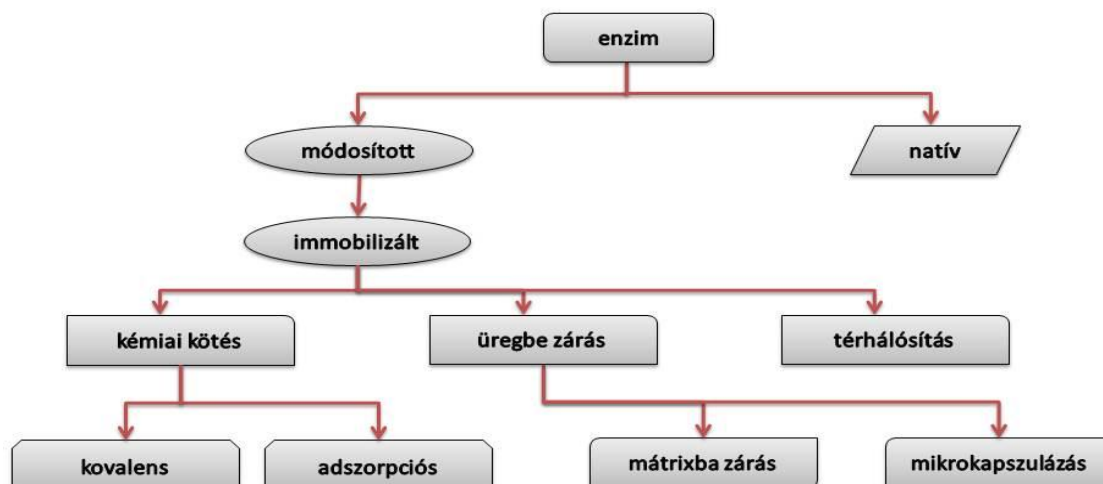
Különböző anyagok enzimtartalmát sokszor csak közvetve tudjuk meghatározni. Pontosan ismert körülmények között, ismert töménységű szubsztrátumra engedjük hatni az enzimet, és időegységenként mérjük a szubsztrátum töménységének változását. Az így meghatározott enzimaktivitást egységekben, Unit-ban fejezzük ki:

$$U_e = \frac{c * n_s}{t * m_e} \left[\frac{\mu mol}{min * g} \right] [U]$$

ahol c a konverzió, n_s a szubsztrát anyagmennyisége, t az idő, m_e az enzim tömege.

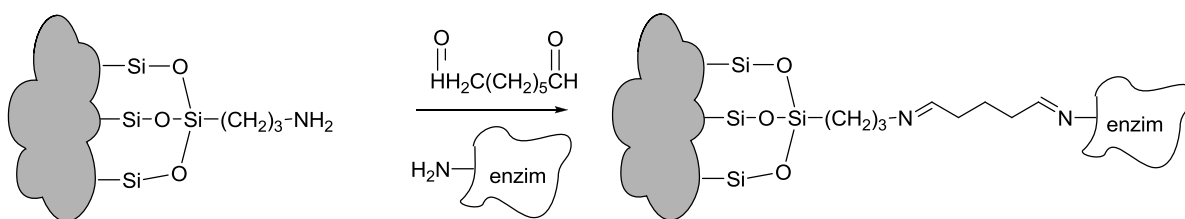
2.6. Az enzimrögzítés

Az analitikai tisztaságú enzimkészítmények általában nagyon drágák és felhasználásuk után nem nyerhetők vissza, ami alkalmazásukat gazdasági okok miatt megnehezíti. Ennek a problémának egy lehetséges megoldása az enzimek szilárd hordozón történő rögzítése. A rögzítésnek alapvetően három módja van: kémiai kötés a hordozóval, szerves vagy szervetlen polimer gélbe zárás és az enzim molekulák közötti keresztkötés létrehozása, azaz a térhálósítás (7. ábra).²¹



7. ábra Az enzimek rögzítési módjai⁷

Az enzim és hordozó között kialakult kötés jellege alapján is osztályozhatjuk a rögzített enzimeket. Ez alapján két nagy csoportot különíthetünk el: a kémiai és a fizikai kötődésen alapuló kapcsolatot. A kémiai kapcsolódás kovalens kötéssel vagy ionadszorpció módon történhet. A kovalens kötés legtöbbször az enzim fehérjetermészetére épül, ekkor az enzim egyik aminosav oldallánca a hordozó rendszer felületén található funkciós csoporttal hoz létre kötést (8. ábra). Az enzimek közötti keresztkötések létrehozása is a kémiai módszerek csoportjába sorolható. Ilyen térhálósítás megvalósítására alkalmazható a glutáraldehid, mely két funkciós csoportjának köszönhetően, két amino-csoport végződésével is képes Schiff-bázist képezni.⁸



8. ábra Keresztkötések kialakítása glutáraldehiddel, 3APTES-sel [(3-aminopropil)triethoxiszilán] módosított szilikagélen²²

Az enzim molekulák aggregátumot képezhetnek, mely ipari szempontból nem előnyös. Ekkor a térhálósítást megelőzően az enzimet hordozóra viszik fel, és csak azután alakítják ki a keresztkötéseket, ezzel jobb mechanikai tulajdonságokat nyerve. A fizikai rögzítés módszerei között három fő csoportot különböztethetünk meg: az enzim adszorpciója hordozó felületére, az enzim bezárása egy polimer mátrixba, valamint az enzimoldat visszatartása olyan membránok segítségével, amelyek az enzimet nem, de a szubsztrátot és a terméket képesek átengedni.

Lipázok rögzítése esetén gyakran használatos módszer az enzim adszorpciója egy hordozó felületére. Ekkor egy hidrofób kölcsönhatás során a felület és az enzim egy kötőhelye között jön létre a kapcsolat. A kötő felületnek olyan hatást kell gyakorolnia az enzimre, hogy az olyan konformációt vegyen fel, mellyel alkalmas lesz katalitikus feladatait hatékonyan ellátni, tehát sikeresen jusson el a szubsztrát az enzim aktív centrumához. Az adszorpció megvalósítható egyszerű acetonos kicsapással, ugyanakkor ez nagyon sok nehézséget rejthet magában. A lipázok ugyanis hajlamosak inaktív aggregátumot képezni, így elvesztve magas katalitikus aktivitásukat. A kicsapás során továbbá gyakran nem csak egy enzim réteg kerül a felületre, hanem vastag, többrétegű enzimrendszer jön létre, amely jelentősen megnöveli a preparátum előállításának költségeit, ráadásul a több réteg nem garantálja a magasabb katalitikus aktivitást sem, valamint a lipáz enzim kedvezőtlen konformációja is megfigyelhető a hordozón.²³ Az immobilizálás megvalósítható a hordozó és az enzim-oldat összemérésével, majd rázatásával. Az enzimoldat különböző pufferek segítségével állítható elő, illetve a rázatást követő mosási eljáráshoz használt mosószer is változó lehet. Ezek megfelelőségére, az enzim működését befolyásoló hatásukra történtek laborcsoportunkban vizsgálatok.

A rögzített lipázoknak elsősorban ipari alkalmazásokban van jelentősége, gyakran használatos szerves közegben zajló biotranszformációk kivitelezésére. A rögzítéshez használt hordozók közül néhány: Celite, Duolite, Accurel, és a szilikagél. A szilikagélek felületi hidrofobicitásának növelése általában kedvezően hat a lipáz enzimek rögzítésére, így folyamatos kutatások zajlanak ennek kivitelezésével kapcsolatosan.^{23,24-30}

Az enzimrögzítésnek az enzimek frakcionált elválasztásában is egyre nagyobb szerep tulajdonítható. Lipázokra is igaz, hogy a hagyományos mikrobiológiai előállítás tisztítási, kinyerési fázisa a legtöbb esetben legalább négy - öt lépésből álló eljárás. A költségeket jelentősen megnöveli a folyamat kihagyhatatlan lépése, a hidrofób kölcsönhatáson alapuló

kromatográfiás és ioncserés eljárások. Jelenleg is zajlanak kutatások új enzimtisztítási stratégiák megvalósítására, melyek lehetővé teszik az enzimek olcsó, gyors és szelektív kinyerését. Az irodalomban már leírták a *Penicillium simplissimum* nyers fermentlevéből lipázok kinyerését, szelektív adszorpciós módszerrel, hidrofób oktil-, fenil- és butil-agarózra rögzítve.³¹ Vizsgálatainkat az említett technológiára is szeretnénk kiterjeszteni.

2.7. A hordozó felületének módosítása

A rögzítéshez felhasznált hordozó kiválasztását, annak szerkezeti tulajdonságai is befolyásolják. Rögzítési célokra gyakran alkalmaznak különböző pórusméretű szilikagéleket, azok hidrofób karakterisztikája miatt.²³ Fontos megvizsgálni, a rögzíteni kívánt enzim méretének és a kérdéses hordozó pórusméretének, alakjának kompatibilitását.²³ A túl kicsi pórusméret esetén a nagyobb enzimek csak a felszínen helyezkedhetnek el. Ezt a problémát a mezo- és makropórusos szilikagél alkalmazása oldhatja föl, melyekkel ez a nem kívánt hatás csökkenthető, és az enzimaktivitás is jelentősen növelhető. Az enzim biokatalitikus aktivitása alapvetően három tényezőtől függ: a hordozó pórusméretétől, a kialakult enzimrétegtől és a hordozó felületétől. A felület megfelelő módosításával, az enzim számára újabb kötődési helyek kialakításával az enzimmészítmény aktivitása növelhető.

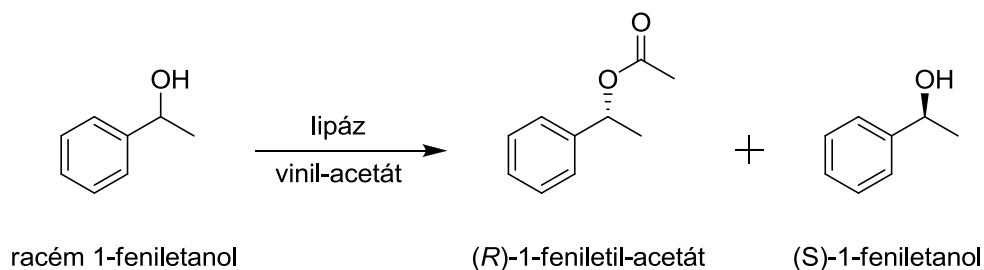
A módosítás kivitelezésére már születtek megoldások. Az aktiválás 80°C-os vákuumos előkezeléssel is megvalósítható, majd a szilárd hordozó toluol és oktiltriethoxiszilán 1:4 térfogatarányú oldatában való szuszpendálásával folytatódik. Ezután három napos kevertetés következik, majd acetonos és hexános mosás után vákuum alatt szárítják a hordozót. Ez az alapja a Wang-módszernek.³² Módosító anyagként elterjedten használnak különböző funkciós csoportokkal ellátott alkoxi-szilánokat, illetve alkoxi-kloroszilánokat.^{33,34}

A felületmódosításra alkalmas még a Stöber-módszer egy továbbfejlesztése is. A Stöber-módszer alapvetően egy fizikai folyamat, mellyel monodiszperz szilikagél részecskék állíthatók elő.³⁵ Az eljárás során nem kerül szilikagél a rendszerbe, pontosan ennek az előállítása a módszer lényege. Vizet, kis mennyiségű alkoholt és ammóniát tartalmazó rendszerbe tetraetoxiszilánt juttatnak, majd rázatás során kialakulnak az 50 és 2000 nanométer közötti részecskeátmérővel rendelkező szilikagél részecskék. Az átmérő nagysága a választott szilikátészterrel, az alkohol mennyiségével és fajtájával, illetve az összetevők térfogatával befolyásolható.^{35,36} A Stöber-módszer alapján később további

eljárásokat fejlesztettek megfelelő részecskeméretű szilikagél előállítására, majd ezeket felületmódosításra is elkezdték alkalmazni, optimalizálni. A mi kísérleteink alapja is a Stöber-módszer egy továbbfejlesztése, melyben két alkoholos keveréket készítenek. Az egyikbe kevés vizet és ammónium-hidroxidot adnak, a másikba pedig kis mennyiségű organoszilánt, majd intenzív kevertetés mellett összeöntik. Kis idő elteltével további organoszilánt adnak a rendszerhez, és még egy napig hagyják rázódni.³⁷

3. Eredmények és értékelésük

Dolgozatom témája, a napjainkban egyre nagyobb figyelmet kapó, biokatalitikus szintetikus reakciók során használt enzimek, visszanyerhetőségének, reakcióelegytől való elválasztásának megkönnyítésére alkalmas új módszerek vizsgálata. Az előbb felsorolt technológiai problémákból fakadó gazdaságossági nehézségek megoldására a közelmúltban már találtak viszonylag hatékony megoldást, ami az enzim felhasználás előtti rögzítésének (immobilizálás) kifejlesztése volt.⁹ Kísérleteink eredménye a korábban ismert egyszerű fizikai adszorpción alapuló enzimrögzítési módszer továbbfejlesztése, amely során a rögzítéshez felhasznált hordozó felületét különböző módosító csoportok segítségével változtatjuk. A módosított felületű hordozóra rögzített enzim aktivitását kinetikus rezolválási reakcióban teszteltük. A reakció információt ad az enzimkészítményünk enantiomer szelektivitásáról (*E*) és produktivitásáról is. A reakciókban modellünk a legegyszerűbb aromás szekunder alkohol, a racém 1-feniletanol enantiomerszelektív enzimatisztítás volt (9. ábra).³⁸



9. ábra A racém 1-feniletanol kinetikus rezolválása

Az enzimek katalitikus tulajdonságait a konverzióval (*c*), a specifikus biokatalizátor aktivitással (*U_b*), a specifikus enzim aktivitással (*U_e*), az enantiomer szelektivitással (*E*) és az enantiomer tisztasággal (*ee*) jellemeztük.

A specifikus enzim aktivitás [*U_e* (U/g)], a rögzített enzim számított enzimtartalmának aktivitását jelenti. Az immobilizált enzim aktivitása (*U_{e,imm}*) a racém alkohol mólszámából [*n_{rac}* (μmol)], a konverzióból [*c*], a reakcióidőből [*t* (perc)] és a biokatalizátor számított enzim mennyiségéből [*m_e* (g)] számítható (lsd. 2.6 alfejezet).

A specifikus biokatalizátor aktivitás [*U_b* (μmol×perc⁻¹×g⁻¹), (U/g)] a kiindulási alkohol mólszámából [*n_{rac}* (μmol)], a konverzióból [*c*], a reakcióidőből [*t* (perc)] és az immobilizált biokatalizátor tömegéből [*m_b* (g)] számítható.

$$U_b = \frac{(n_{rac} * c)}{(t * m_b)}$$

A fajlagos termelékenység [U_A (%)] egy viszonyszám, amellyel az immobilizált enzim specifikus aktivitását a szabad enzim specifikus aktivitására vonatkoztatjuk.

$$U_A = 100 * \frac{U_{e,immob}}{U_{e,szabad}}$$

Az enantiomer szelektivitást (E) a konverzióból és a visszamaradó alkohol vagy a képződő acetát enantiomer tisztaságából (ee) számítjuk (ld. 2.4 alfejezet).

A tesztreakciót egy napig futattuk, közben 4, 6 illetve 24 óra elteltével vettünk mintákat, majd GC- vel elemeztük.

3.1. Enzimek adszorpciója felületmódosított szilárd hordozóra

A kutatócsoportunkban végzett korábbi munka eredményei igazolták az enzimek szilárd hordozón való rögzítésének hatékonyságát.^{39,40} A kísérletek alátámasztották, hogy a fehérje természetű enzim szilárd hordozóra vitele nagyban megnövelte az enzim reakcióban mutatott aktivitását, szelektivitását, így annak biokatalitikus tulajdonságait. Továbbá nagyon fontos megállapítást tehettünk az eredmények alapján az enzimek készítmény eltarthatóságát illetően. Ugyanis a szilárd hordozóra rögzített enzim hőérzékenysége csökkent és a preparátum szobahőmérsékleten való tárolhatóságának időtartama is megnőtt. A megelőző kutatások eredményei azt is egyértelműen alátámasztják, hogy az enzim rögzítése, illetve a már immobilizált enzim tulajdonságai befolyásolhatók a szilárd hordozó fajtájával, karakterisztikájával. A rögzítés során 1:10 enzim/hordozó arányt választottunk, mert a kísérleteinket megelőzően más hordozókra adszorpciósan rögzített enzimeknél ez az arány volt megfelelő. Az optimális enzim/hordozó arány nem más, mint az az enzim mennyiség, amely telíti a hordozó felületét. Ennek meghatározására, jelenleg is folynak kutatócsoportunkban kísérletek. Az általunk végzett kutatások irányát ezek az információk nagymértékben meghatározták.

Kísérleteket végeztünk a választott hordozók felületének módosítására, a vizsgált enzimek kémiai viselkedését figyelembe véve. A teszteket négy különböző lipáz (lipáz AK, lipáz PS, CaLB, CrL) enzimen végeztük el. Ezen enzimekkel végzett korábbi kísérletek és ipari felhasználásuk is útmutatást adott ahhoz, hogy a vizsgálandó módosított hordozók előállításához, mely módosító csoportokat válasszuk. Így a felületmódosítást 3 különböző alkoxi-szilánnal, az OctTMS-nal, PhTMS-nal és AmPrTMS-nal végeztük el. A

hordozót enyhén bázikus alkoholos rendszerbe vittük, majd két részletben adagoltuk hozzá a megfelelő alkoxi-szilánt. A hat különböző szilikagélt először etanolos rendszerben módosítottuk, majd később megvizsgáltuk az alkalmazott alkoholos közeg hatását a felületmódosításra (3.2. fejezet). Az első módosítást 6 különböző szilikagél hordozón (Grace 920, Grace 150, Grace 250, PQ 300, Grace 915, Geduran) hajtottuk végre, majd az eredmények egyértelműen segítettek eldönteni, hogy melyik szilikagél a legalkalmasabb, illetve leghatékonyabb az adott enzim rögzítéséhez.

A tesztelés során minden hordozót módosítottunk mindegyik alkoxi-szilánnal, viszont az AmPrTMS-nal végzett kísérletek eredményei meglehetősen elmaradnak az OctTMS-nal és PhTMS-nal végzettekéhez képest, így a továbbiakban csak ezekkel foglalkoztunk. Ehhez hasonlóan a hordozók között is található nem kiemelkedően teljesítő, ezek sem szerepelnek a táblázatokban.

A lipáz AK tesztelése az OctTMS-nal és PhTMS-nal módosított szilikagélekkel jelentős eredményeket hozott (1. táblázat). A fajlagos termelékenység 5-8-szorosára növekedett a szabad (rögzítetlen) enzim termelékenységéhez viszonyítva. Hasonló mértékben megsokszorozódott a specifikus enzim aktivitás is. A legnagyobb specifikus enzim aktivitást és termelékenységet is a Grace 250 OctTMS-nal módosított hordozóra rögzített lipáz AK produkálta.

1. táblázat A racém 1-feniletanol kinetikus rezolválása módosított és módosítatlan felületű szilikagélre immobilizált lipáz AK alkalmazásával, vinil-acetát acilezőszer jelenlétében, 4 óra elteltével.

Enzim	Hordozó	Módosító csoport	c %	E ^a	U _e U/g	U _A %
AK ^b	-	-	51	> 200	17	100
AK ^c	G920	-	1	93	3	19
AK	G920	Oktil	3	>100	12	71
AK	G920	Fenil	19	>>200	71	406
AK ^c	G915	-	2	>100	6	32
AK	G915	Oktil	27	>>200	104	594
AK	G915	Fenil	23	>>200	88	505
AK ^c	G150	-	1	45	2	13
AK	G150	Oktil	14	>>200	54	311
AK	G150	Fenil	12	>>200	44	251
AK ^c	G250	-	1	>100	4	25
AK	G250	Oktil	35	>>200	132	755
AK	G250	Fenil	11	>>200	43	243
AK ^c	Geduran	-	<1	11	1	7
AK	Geduran	Oktil	19	>>200	71	407
AK	Geduran	Fenil	6	>200	22	126

^aAz *E* értékét *c* és *ee*_(P) és *ee*_(S) segítségével határoztuk meg.²⁰ Az *E* értékek amennyiben 100-200 közé esik >100-nak, ha 200-500 közé esik >200-nak és ha 500 fölé esik >>200-nak tüntetjük fel, ^b Rögzítetlen lipáz AK, 4 óra reakcióidő eltelté után. ^c Az eredeti, módosítatlan szilikagélre rögzített lipáz AK, 4 óra reakcióidő eltelté után.

A 2. táblázatban a lipáz PS enzim tesztelésével nyert adatok találhatóak. Az eredmények szépen tükrözik, hogy a felületmódosított hordozóra történő rögzítés hatása ebben az esetben is pozitív. A legjobb eredményt a lipáz AK-hoz hasonlóan a Grace 250 hordozóra rögzített lipáz PS produkálta és láthatóan a feniles és oktilos módosítás is nagyon hatékony volt. A lipáz PS enzim Geduran hordozóra rögzített formája nem hozott kiemelkedő eredményt, azonban teljesítménye így sem marad el a szabad enzimétől.

2. táblázat A racém 1-feniletanol kinetikus rezolválása módosított és módosítatlan felületű szilikagélre immobilizált lipáz PS enzim alkalmazásával, vinil-acetát acilezőszer jelenlétében, 4 óra elteltével.

Enzim	Hordozó	Módosító csoport	c %	E ^a	U _e U/g	U _A %
PS ^b	-	-	30	>>200	10	100
PS ^c	G920	-	14	>>200	53	513
PS	G920	Oktil	16	>>200	61	583
PS	G920	Fenil	7	>200	26	246
PS ^c	G915	-	19	>200	73	700
PS	G915	Oktil	26	>>200	97	935
PS	G915	Fenil	18	>>200	68	654
PS ^c	G150	-	2	>200	8	74
PS	G150	Oktil	25	>>200	94	904
PS	G150	Fenil	22	>>200	83	799
PS ^c	G250	-	<1	73	3	26
PS	G250	Oktil	48	>>200	183	1766
PS	G250	Fenil	31	>>200	116	1116
PS ^c	PQ 300	-	1	76	5	49
PS	PQ 300	Oktil	31	>>200	118	1141
PS	PQ 300	Fenil	12	>>200	44	425

^aAz *E* értékét *c* és *ee_(P)* és *ee_(S)* segítségével határoztuk meg.²⁰ Az *E* értékek amennyiben 100-200 közé esik >100-nak, ha 200-500 közé esik >200-nak és ha 500 fölé esik >>200-nak tüntetjük fel, ^b Rögzítetlen lipáz PS, 4 óra reakcióidő eltelté után. ^c Az eredeti, módosítatlan szilikagélre rögzített lipáz PS, 4 óra reakcióidő eltelté után.

A CaLB enzim specifikus enzim aktivitása és fajlagos termelékenysége egyöntetűen a PhTMS-nal módosított szilikagéleken a legnagyobb. A lipáz AK és PS tesztjeivel összhangban a CaLB enzim esetében is a Grace 250 hordozó adta a legjobb eredményeket. Ezen előzetes teszt eredményei segítségünkre voltak abban, hogy kiválasszuk a felületmódosításra legalkalmasabb hordozót és organoszilánt.

3. táblázat A racém 1-feniletanol kinetikus rezolválása módosított és módosítatlan felületű szilikagélre immobilizált CaLB enzim alkalmazásával, vinil-acetát acilezőszer jelenlétében, 4 óra elteltével.

Enzim	Hordozó	Módosító csoport	c %	E ^a	U _e U/g	U _A %
CaLB ^b	-	-	37	>>200	13	100
CaLB ^c	G920	-	20	>>200	77	598
CaLB	G920	Oktil	15	>>200	57	441
CaLB	G920	Fenil	37	>>200	139	1085
CaLB ^c	G915	-	20	>>200	77	603
CaLB	G915	Oktil	6	>200	21	166
CaLB	G915	Fenil	48	>>200	181	1414
CaLB ^c	G150	-	7	>200	30	232
CaLB	G150	Oktil	16	>>200	61	479
CaLB	G150	Fenil	36	>>200	135	1056
CaLB ^c	G250	-	24	>>200	92	722
CaLB	G250	Oktil	15	>>200	55	431
CaLB	G250	Fenil	48	>>200	182	1425
CaLB ^c	PQ300	-	30	>>200	114	891
CaLB	PQ300	Oktil	9	>200	36	278
CaLB	PQ300	Fenil	42	>>200	159	1244

^aAz *E* értékét *c* és *ee*_(p) és *ee*_(s) segítségével határoztuk meg.²⁰ Az *E* értékek amennyiben 100-200 közé esik >100-nak, ha 200-500 közé esik >200-nak és ha 500 fölé esik >>200-nak tüntetjük fel, ^b Rögzítetlen CaLB enzim, 4 óra reakcióidő eltelté után. ^c Az eredeti, módosítatlan szilikagélre rögzített CaLB enzim, 4 óra reakcióidő eltelté után.

A CrL enzimmel végzett tesztek eredményei alapján elmondható, hogy a felületmódosítás és a rögzítés ebben az esetben is hatékonynak bizonyult a szabad enzimhez képest. A CrL enzim működése az 1-feniletanol enzimatiszus acetilezésében lassabb és kevésbé szelektív, ezért a tesztreakció során 48 órás mintákat is vettünk, 4 óra elteltével ugyanis még alacsonyok voltak a konverzió értékek. Az enzimet jellemző szelektivitás és fajlagos termelékenység értékek nem alakultak olyan kiemelkedően, mint a fent ismertetett három enzim esetén, azonban az oktil-módosított G250 hordozón itt is 2,5-szeres fajlagos aktivitás növekedést értünk el a szabad enzimhez képest.

3.2. Az alkalmazott közeg hatása a szilikagélek felületmódosítására

A felületmódosítás ammóniás alkoholos közegben történik. A gazdaságossági megfontolásokat figyelembe véve a módosítási kísérletet kétféleképpen végeztük el. A Grace 920 és a Geduran hordozó felületmódosítását etanolon kívül metanolban is elvégeztük és teszteltük az ezekre rögzített enzimek viselkedését.

Az alkoholok közti különbségeket a következő táblázatokban a tesztreakció 6 órás eredményei szemléltetik, azonban az analógia a 4 és a 24 órás mintáknál is fennáll. A táblázatokban vastagon szedve láthatók azok az értékek, ahol metanollal értünk el a jobb eredményt. A lipáz AK enzim működését javította a metanos közegben végzett, fenil módosítású Grace 920 szilikagélre rögzítés. Az aminopropil-csoport hatása ugyan nagyon elmarad az oktil és a fenil csoportétól, de ebben az esetben is hatásosabbnak bizonyult a metanos módosítás. A Geduran hordozó esetén szintén a feniles módosítás során figyelhető meg a metanol jótékony hatása.

4. táblázat A racém 1-feniletanol kinetikus rezolválása etanos és metanos közegben módosított felületű szilikagélre immobilizált lipáz AK enzim katalizátor alkalmazásával, vinil-acetát acilezőszer jelenlétében, 6 óra elteltével.

Enzim	Hordozó	Közeg	Módosító csoport	c %	E ^a	U _e U/g	U _A %
AK	Grace920	etanol	Oktil	6	>200	15	123
AK	Grace920	metanol	Oktil	3	>200	7	62
AK	Grace920	etanol	Fenil	28	>>200	70	594
AK	Grace920	metanol	Fenil	35	>>200	89	756
AK	Grace920	etanol	Aminopropil	<1	37	2	18
AK	Grace920	metanol	Aminopropil	2	58	5	39
AK	Geduran	etanol	Oktil	26	>>200	6	564
AK	Geduran	metanol	Oktil	10	>>200	25	212
AK	Geduran	etanol	Fenil	9	>200	23	192
AK	Geduran	metanol	Fenil	13	>>200	32	270
AK	Geduran	etanol	Aminopropil	6	>200	14	121
AK	Geduran	metanol	Aminopropil	<1	30	2	13

^aAz *E* értékét *c* és *ee_(p)* és *ee_(s)* segítségével határoztuk meg.²⁰ Az *E* értékek amennyiben 100-200 közé esik >100-nak, ha 200-500 közé esik >200-nak és ha 500 fölé esik >>200-nak tüntetjük fel.

A lipáz PS enzimmel végzett kísérletekből nagyon jól látszik, hogy a metanos közegben végrehajtott módosítás a Grace 920 hordozó esetén egyöntetűen eredményesebb volt az etanoloshoz képest. Mind a három szilán prekursor kötődését olyan irányban befolyásolta, hogy a PS enzimnek a rögzítés után az aktivitása és a szelektivitása is növekedett. Az már az előzetes eredményekből is leszűrhető volt, hogy melyik enzim mely módosított hordozóra rögzítve működik nagyobb katalitikus teljesítménnyel. A metanol néhány esetben - mint a lipáz PS-nél is- tovább javít ezeken az eredményeken. Elmondható tehát, hogy kísérletsorozatunk megvalósítása hasznos volt, a technológia méretnövelése, egyes esetekben valóban gazdaságosabbá tehető az etanol metanolra történő cserélésével.

5. táblázat A racém 1-feniletanol kinetikus rezolválása etanolos és metanolos közegben módosított felületű szilikagélre immobilizált lipáz PS enzim katalizátor alkalmazásával, vinil-acetát acilezőszer jelenlétében, 6 óra elteltével.

Enzim	Hordozó	Közeg	Módosító csoport	c %	E ^a	U _e U/g	U _A %
PS	Grace920	etanol	Oktil	21	>>200	53	629
PS	Grace920	metanol	Oktil	43	>>200	110	1291
PS	Grace920	etanol	Fenil	9	>200	22	263
PS	Grace920	metanol	Fenil	16	>>200	41	485
PS	Grace920	etanol	Aminopropil	<1	7	<1	7
PS	Grace920	metanol	Aminopropil	2	94	5	64
PS	Geduran	etanol	Oktil	23	>>200	59	694
PS	Geduran	metanol	Oktil	15	>>200	37	438
PS	Geduran	etanol	Fenil	11	>>200	27	315
PS	Geduran	metanol	Fenil	19	>>200	47	5576
PS	Geduran	etanol	Aminopropil	<1	19	2	18
PS	Geduran	metanol	Aminopropil	<1	22	1	13

^aAz *E* értékét *c* és *ee*_(p) és *ee*_(s) segítségével határoztuk meg.²⁰ Az *E* értékek amennyiben 100-200 közé esik >100-nak, ha 200-500 közé esik >200-nak és ha 500 fölé esik >>200-nak tüntetjük fel.

A Grace 920 oktil módosításában jelentős különbség mutatkozik a metanol hatására. A korábbi etanolos teszt szerint a CaLB enzim feniles módosítással kiváló aktivitást, szelektivitást és konverziót produkált, metanol hatására még ezt is felül tudta múlni oktil módosítás során.

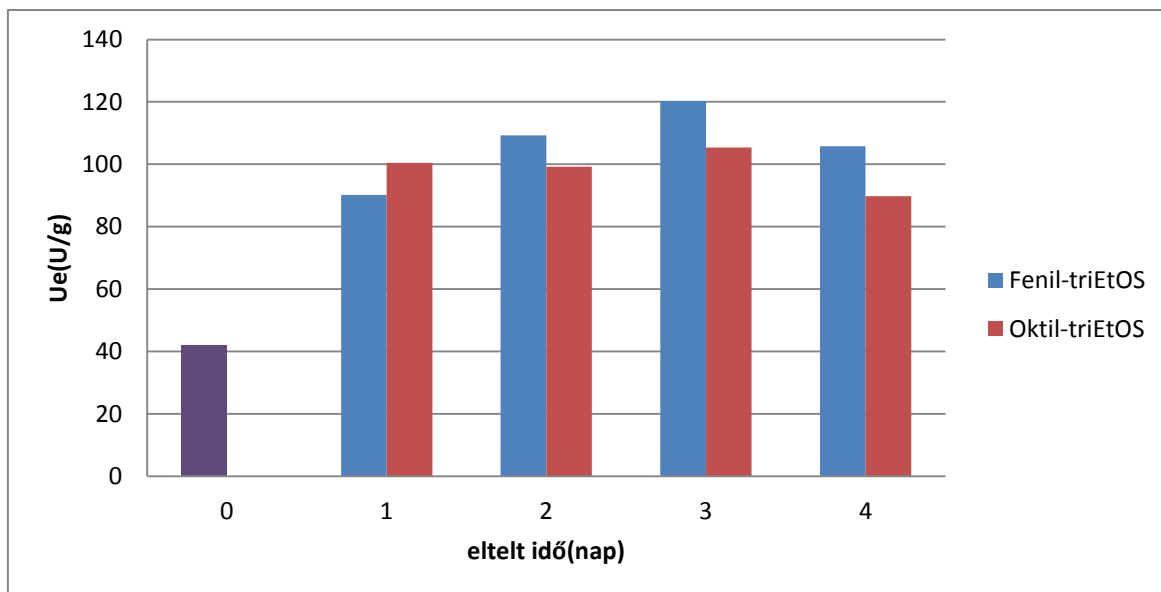
A metanol hatására nem nevezhető meg egy egyértelmű analógia. Az általunk vizsgált módosítatlan szilikagélek különböző szemcse- és pórusméret eloszlásúak, különböző fajlagos felületűek, több esetben előállításuk technológiája is jelentősen különbözik. Ezen paraméterek mind szerepet játszhatnak abban, hogy az egyes hordozókon a felhasznált alkoholos közeg cseréje eltérő hatást eredményez. Ezen jelenség megértéséhez további terveink között szerepel a több alkohol (propanol, izopropanol, butanol, *terc*-butanol, stb.) felületmódosításra gyakorolt hatásának vizsgálata. A gazdaságossági és ipari igények előtérbe helyezése miatt többféle módon denaturált etanolt is ki fogunk próbálni.

Ezen felül a módosított felület pontosabb karakterizálása érdekében, a módosítás és az enzimek adszorpciójának komplexebb értelmezése miatt jelenleg is folynak felület-analitikai vizsgálatok az elkészített mintákkal (nitrogén- és vízgőzadszorpció, pásztázó elektron mikroszkóp).

3.3. Szilikagélek felületmódosításának optimalizálása

A felületmódosításra kifejlesztett módszer kivitelezésének hátránya, hogy a rendszert viszonylag hosszú ideig, közel egy héten keresztül kell szobahőmérsékleten rázatni. Vizsgálatot végeztünk a felületmódosítás időfüggésére vonatkozóan, hogy optimalizáljuk a szükséges időt, és ipari méretben költséghatékonyabb legyen a technológia. Az időfüggési vizsgálatot a Grace 250 hordozóval végeztük el, mert az előzetes eredményekből megállapítottuk, hogy ez a hordozó alkalmazható a leghatékonyabban a vizsgált négy enzim adszorpciós rögzítésére.

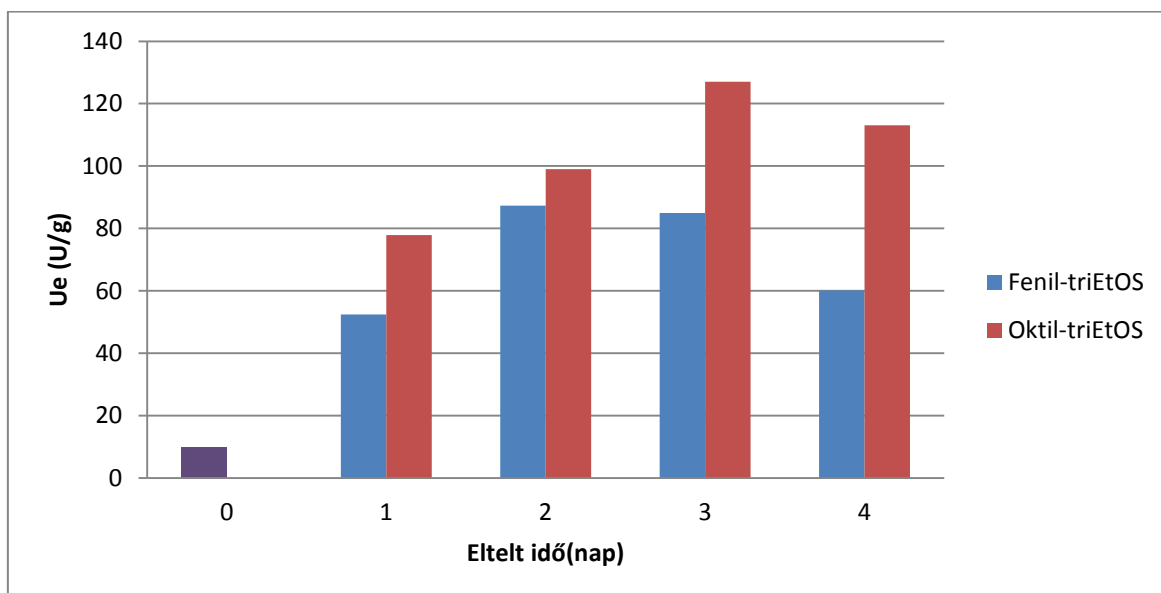
A tesztekhez a felületmódosítást öt napig végeztük, minden nap mintát vettünk a szilikagélből, és adszorpcióval rögzítettük rá a lipázokat. Az így elkészített biokatalizátorokat ismét a racém 1-feniletanol kinetikus rezolválási reakciójában teszteltük. A 10. ábra szemlélteti a Grace 250 oktil és fenil módosított hordozóra rögzített lipáz AK eredményeit. A rögzített lipáz AK katalízise a feniles módosítással volt a legjobb (részletesebben a 3.4. fejezetben). A diagramon látható, hogy a módosított hordozón adszorbeált enzimmészítmény aktivitása mind a két prekursornál a harmadik napon eléri maximumát, majd csökken. Ebben az esetben három nap alatt jobb eredmények érhetők el, mintha tovább hagyjuk rázódni a szuszpenziót még egy napig. Ismeretes, hogy a felületmódosítatlan szilikagélek pH=7 érték felett, a módosítottak pH=9 felett oldódnak⁴¹, így feltételezhetően három nap után az ammóniás alkoholos közegben a szilikagél felületének oldódása jelentőssé válik, és elveszíti az enzim-adszorpcióra alkalmas szerkezetét.



A 0 időpont a referencia, módosítatlan hordozóra rögzített lipáz AK enzim racém 1-feniletanol kinetikus rezolválási reakciójával tesztelve, 6 órás eredmény

10. ábra A Grace 250 hordozó felületmódosításának időfüggés vizsgálata, lipáz AK immobilizálása után racém 1-feniletanol kinetikus rezolválási reakciójával tesztelve, 6 órás eredmények

A lipáz PS az előzetes eredmények szerint is a PhTMS-nal módosított felületű Grace 250 szilikagélen mutatkozott jobbnak, ezt az időfüggés reprodukció is megerősíti. A lipáz AK-hoz hasonlóan a lipáz PS enzimnél is maximum figyelhető meg a diagramban. Szintén a harmadik napon eléri a maximumát a specifikus enzim aktivitás.



A 0 időpont a referencia, módosítatlan hordozóra rögzített lipáz PS enzim racém 1-feniletanol kinetikus rezolválási reakciójával tesztelve, 6 órás eredmény

11. ábra A Grace 250 hordozó felületmódosításának időfüggés vizsgálata, lipáz PS immobilizálása után racém 1-feniletanol kinetikus rezolválási reakciójával tesztelve, 6 órás eredmények

Az időfüggés vizsgálatot elvégeztük a CrL és CaLB enzimekkel is és hasonló eredményre jutottunk. Így megállapítható, hogy a felületmódosítás elvégezhető három nap alatt. A technológia méretnövelése esetén ezzel a lépéssel jelentősen gazdaságosabbá tehető a folyamat.

3.4. A lipázok adszorpciós rögzítésének optimalizálása

Az előzetes tesztek 6 különböző szilikagéllel végeztük el, ezzel az volt a célunk, hogy a módosításra legalkalmasabbat tudjuk majd választani. Az eredményeket összegezve, minden esetben a Grace 250 hordozó bizonyult a leghatékonyabbnak, a PhTMS és Oktil- triMetOS mellett is. Enzimenként változik, hogy mely módosítás a megfelelő (6. táblázat).

6. táblázat A racém 1-feniletanol kinetikus rezolválása módosított felületű Grace 250 szilikagélre immobilizált lipáz AK, lipáz PS, CaLB, CrL enzimek, illetve módosítatlan Grace 250 szilikagélre immobilizált enzimek alkalmazásával, vinil-acetát acilezőszer jelenlétében, 4 óra elteltével.

Enzim	Hordozó	Módosító csoport	c %	E ^a	U _e U/g	U _A %
AK	G250	-	1,1	>100	4,3	24,7
AK	G250	Oktil	34,7	>>200	131,8	755,2
PS	G250	-	0,7	73,1	2,7	26,2
PS	G250	Oktil	48,3	>>200	183,3	1766,0
CaLB	G250	-	24,3	>>200	92,4	721,7
CaLB	G250	Fenil	48	>>200	182,4	1424,5
CrL	G250	-	1,3	3,4	5,0	116,2
CrL	G250	Oktil	2,5	3,1	9,5	221,0

^aAz *E* értékét *c* és *ee_(P)* és *ee_(S)* segítségével határoztuk meg.²⁰ Az *E* értékek amennyiben 100-200 közé esik >100-nak, ha 200-500 közé esik >200-nak és ha 500 fölé esik >>200-nak tüntetjük fel. ^bAz eredeti, módosítatlan szilikagélre rögzített enzim, 4 óra reakcióidő eltelte után.

Az előzetes tesztek eredményei alapján a lipáz AK esetében a G250 hordozón az oktil módosítás hatékonyabbnak bizonyult az enzim adszorpciójára. Későbbi reprodukciós tesztek során és optimalizálási kísérletekben bebizonyosodott, hogy a lipáz AK esetében a fenil módosítás hatékonyabb az immobilizálásra. A másik három lipáznál a későbbi tesztek megerősítették az eddigi eredményeket.

Ennek az eltérésnek magyarázatául szolgál, hogy az adszorpciós rögzítés során jelentősen módosítottuk az addig alkalmazott módszert. Korábban a rögzítés során az enzimoldatot összemértük a megfelelő mennyiségű hordozóval, majd 20 percig rázattuk

szobahőmérsékleten és 1 napra hűtőbe tettük állni. A későbbiekben az összemérést követően az intenzív rázatást hűtött közegben ($\sim 4-8^{\circ}\text{C}$) fenntartottuk 1 napig.

A változtatás oka a fenil- és oktil- csoport hidrofóbicitásbeli különbségében keresendő. Az oktil- csoporttal módosított szilikagél az oktil-csoport hidrofóbicitásának következtében úszik az enzimdát tetején, míg a fenil módosított hordozó az oldat alján helyezkedik el, így állás közben az enzim molekulák csak diffúzióval jutnak a hordozó közelébe. Ennek kiküszöbölése, az állandó, egy napon át tartó hűtött, intenzív ráztatás biztosítja a szilárd-folyadék határfelület folyamatos és egyenletes érintkezését.

Reprodukciós tesztekkel igazoltuk, hogy ezzel a rögzítési móddal azonos katalitikus paraméterekkel rendelkező biokatalizátorokat tudunk előállítani (ezek az adatok ebben a dolgozatban nem szerepelnek).

3.5. Felületmódosított szilikagélre rögzített lipázok alkalmazása folyamatos, átfolyósos reaktorokban

Kutatócsoportunk régóta foglalkozik racém vegyületek enzimkatalizált átalakításaival. Korábban megvalósították racém szekunder alkoholok^{38,42,43} és racém aminok⁴⁴ kinetikus rezolválását, illetve prokirális diolok⁴⁵ aszimmetrikus átalakítását szakaszos és folyamatos üzemben. Kísérleteik eredményei minden esetben határozott produktivitás növekedést mutattak folyamatos üzemben a szelektivitás romlása nélkül. Eddigiekben főleg saját készítésű szilagél rendszerben rögzített enzimekkel, illetve kereskedelmi enzimekkel végeztek tesztek^{38,43-46}. Valamint folyamatos üzemben állítottak elő aminokat ketonok redukív aminálásával.⁴⁷

Az enzimpreparátumok előállítása során környezetbarát, gazdaságos és preparatív léptékben is megvalósítható módszer kifejlesztése volt a célunk. Az egyre szigorodó környezetvédelmi előírások a felhasználás terén is megkövetelik a leginkább környezetkímélőbb technológiák alkalmazását. Erre kiváló lehetőséget adnak a folyamatos, átfolyósos rendszerek. Kísérleteink során a kutatócsoport saját tervezésű laborreaktorát használtuk, melyhez CatCart® rozsdamentes acél, hő- és nyomásálló, katalizátorral tölthető oszlopokat alkalmaztunk. Az oszlopokba az általunk felületmódosított hordozóra rögzített négy különböző enzimből előállított, az előzetes szakaszos reakciókban legjobb katalitikus tulajdonságokat mutató biokatalizátorokat töltöttünk. Ezzel a reaktorról széles tartományban megvalósítható a hőmérséklet és az áramlási sebesség pontos szabályozása (-

10–100°C; 0,1–9,0 ml/perc). Így egy könnyen általánosítható eljárást kapunk eredményül, mely a szubsztrátok széles skáláján alkalmazható.

A szakaszos üzemben ismertetett specifikus biokatalizátor aktivitás számítására szolgáló képlet folyamatos rendszerekre módosul. Egy folyamatos rendszer specifikus reakciósebessége (r_{flow}) meghatározható⁴⁸ a termék koncentráció ($[P]$ [$\mu\text{mol ml}^{-1}$]), az áramlási sebesség (f [ml perc^{-1}]) és az enzim-töltet tömege (m_e [g]) ismeretében:

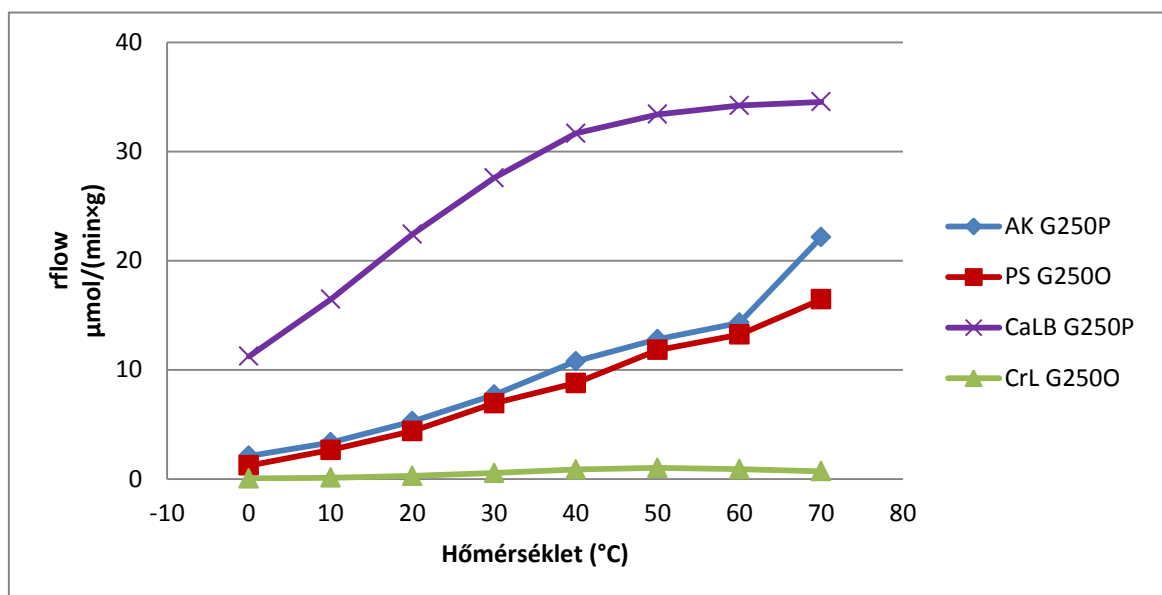
$$r_{\text{flow}} = \frac{[P] * f}{m_e} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \text{g}} \right]$$

3.5.1. Az 1-feniletanol kinetikus rezolválása folyamatos, átfolyósos bioreaktorokban

A laborcsoport munkája eddig még nem terjedt ki saját készítésű hordozóra adszorpciós technológiával rögzített enzimek folyamatos üzemű bioreaktorban történő tesztelésére. A következő diagramok ezeket az eredményeket mutatják be (12-13. ábra). Folyamatos üzemben is a racém 1-feniletanol enantiomerszelektív enzimátikus acilezését használtuk tesztreakcióként, így összehasonlíhattuk a szakaszos üzemben elért eredményekkel is. Folyamatos reaktorban az enzim reakcióban mutatott szelektivitását és produktivitását az átfolyási sebesség és a hőmérséklet függvényében vizsgálhatnánk. Mi a rendszer hőmérséklet függésére végeztünk tesztek, mivel ennek a paraméternek nagyobb befolyása van a reakció lefutására, illetve az enzim működésére. Az áramlási sebességet korábbi tapasztalatok alapján úgy választottuk meg ($0,2 \text{ ml perc}^{-1}$), hogy az általunk vizsgált hőmérséklet-tartományban ($0\text{--}70^\circ\text{C}$) a konverzió 0 és 50% között legyen.

A 12. ábrán szemléltetett produktivitas diagramból látható, hogy a CaLB enzim kiemelkedően viselkedik a többi enzimhez képest. A hőmérséklettel három esetben egyenesen növekszik a produktivitas. A CrL enzim ebben a reakcióban jóval kevésbé produktív, mint a másik három, az azonban látszik, hogy a produktivitasának maximuma van 50°C -nál, majd csökkenni kezd. Feltételezhetően a CrL enzim még ebben a formában is kevésbé hőtűrő, mint a többi általunk tesztelt lipáz. A lipáz AK a lipáz PS és a CaLB enzim 70°C -on éri el produktivitas maximumát. A CaLB enzim esetén stagnálás, kisebb mértékű növekedés figyelhető meg 40°C elérése után. Ez azzal magyarázható, hogy a kiemelkedően szelektív CaLB enzimmel a reakció már 40°C -on nagyon megközelíti (47,7%) az elméletileg elérhető maximális konverziót (50%). Ennek következtében hiába dolgozunk magasabb hőmérsékleten a produktivitas már nem növekszik számottevően,

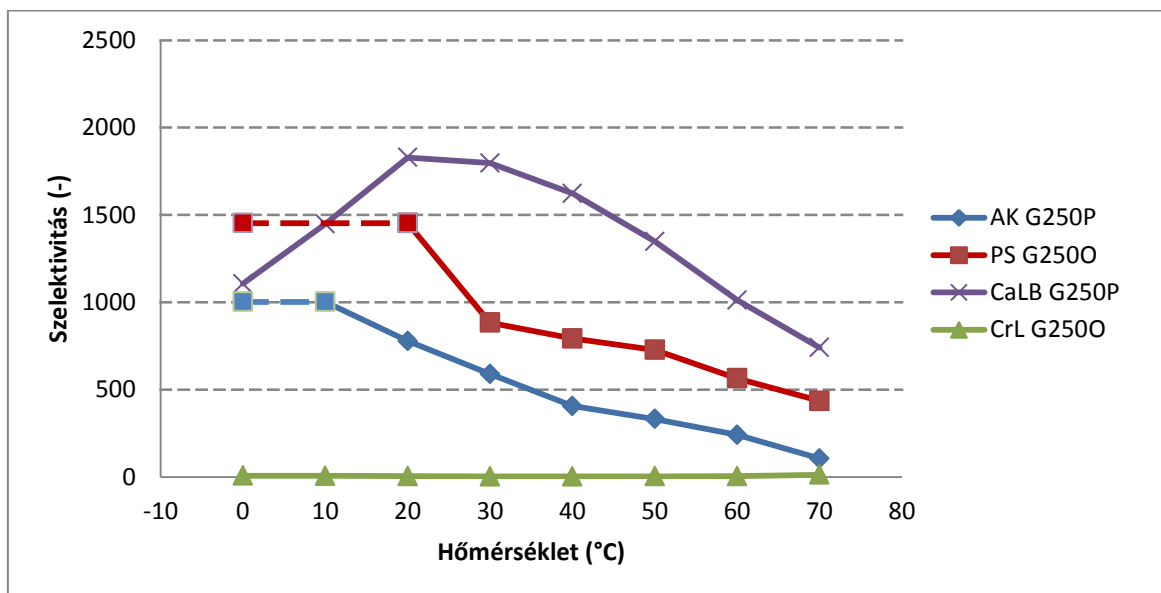
viszont a szelektivitása a hőmérséklet növelésével csökken (13. ábra), ezért ebben a rendszerben a legoptimálisabbnak mondható hőmérséklet az általunk vizsgált CaLB-katalizált kinetikus rezolválási reakció esetén a 40°C.



12. ábra Racém 1-feniletanol kinetikus rezolválásának produktivitása a hőmérséklet függvényében, Grace 250 oktil és fenil módosítású hordozóra rögzített lipáz AK, lipáz PS, CaLB, CrL enzimmal katalizálva

A 13. ábra a szelektivitást ábrázolja a hőmérséklet függvényében. A szaggatott vonallal jelzett pontoknál az alkalmazott analitika (királis állófázisú gázkromatográfia) kimutatási határa miatt a képződő termék számunkra szennyező enantiomerét [(S)-1-feniletil-acetát)] nem tudtuk detektálni a kromatogramokon, ezért ezekben az esetekben az enantiomerszelektivitás (E) számítására szolgáló képletekben (2.5 fejezet) a készülék mérhető zaj átlagértékét szerepeltettük. Mivel a valóságban ennek az enantiomernek a mennyisége csak kisebb lehet a zaj értékénél (különben jelként jelentkezne a kromatogramokon), ezért az így számított enantiomerszelektivitás (E) a valódi értéknél csak alacsonyabb lehet. A szaggatott vonal tehát az adott hőmérsékleten elérhető minimális szelektivitás-értéket (E) jelöli. Látható, hogy az enzimek alacsony hőmérsékleten elérik szelektivitásuk maximumát, ez ipari szempontból nagyon előnyös. Lipáz Ak és lipáz PS szelektivitása nagyobb tartományban mozog, mint CaLB esetén, amelynek szelektivitása nem monoton csökken a hőmérséklet emelkedésével, hanem maximumot ad 20°C körül. Ez is a CaLB enzim jobb felhasználhatóságát támasztja alá. Nagyobb szelektivitást produkál, emellett kevésbé érzékeny a reakció hőmérsékleti körülményeire is, így

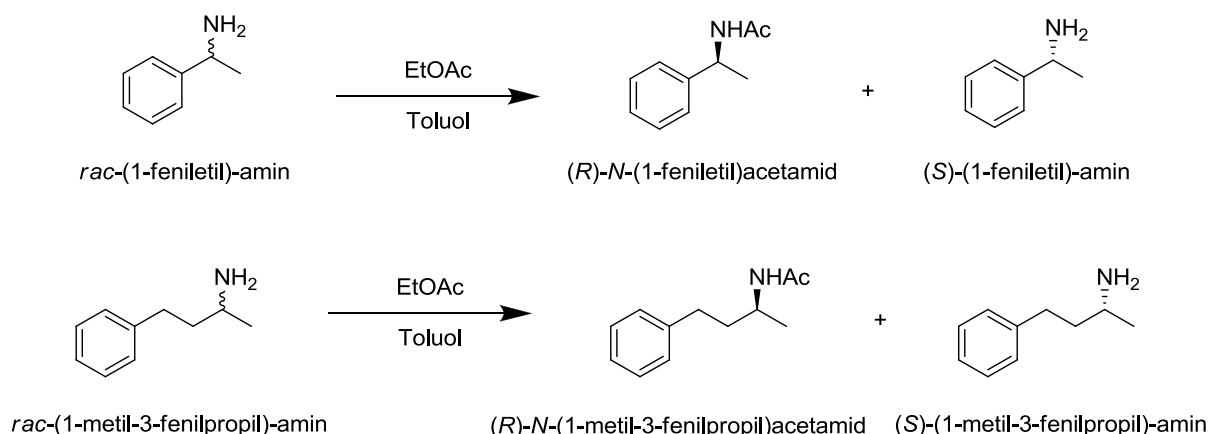
könnyebben szabályozható működése. A technológia optimalása szempontjából a rendszer jól szabályozható. A reakció követelményeinek megfelelően választható ki az optimális hőmérséklet annak függvényében, hogy a rezolválást produktívabban vagy inkább szelektívebben akarjuk elvégezni.



13. ábra Racém 1-feniletanol kinetikus rezolválásának szelektivitása a hőmérséklet függvényében, Grace 250 oktil és fenil módosítású hordozóra rögzített lipáz AK, lipáz PS, CaLB, CrL enzimmekkel katalizálva

3.5.2. Racém aminok kinetikus rezolválása folyamatos, átfolyós bioreaktorokban

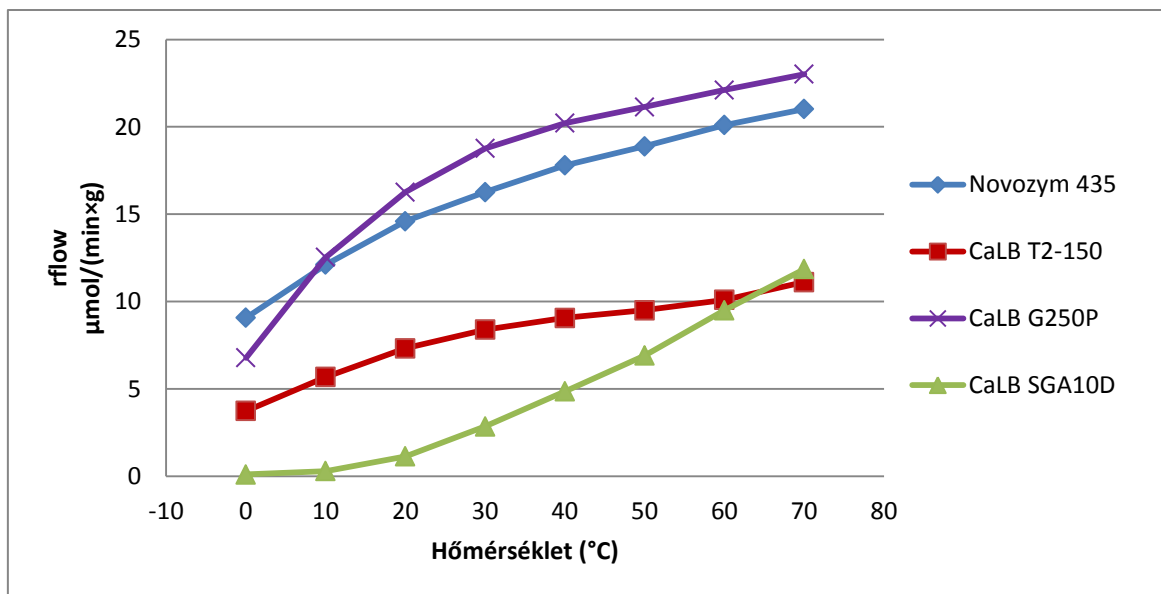
A CaLB enzim fenil módosítású Grace 250 hordozóra rögzítve a többi készítményhez képest a tesztreakcióban kiemelkedően jó eredményeket produkált. Mivel a CaLB enzim alkalmas racém aminok szelektív *N*-acilezésével kinetikus rezolválásra, ezért további kísérleteket végeztünk két különböző amin kinetikus rezolválásán keresztül. A reakciók az (1-feniletil)-amin és az (1-metil-3-fenilpropil)-amin sztereoszelektív enzimatis acilezése volt, melyek mechanizmusban nagyon hasonlóak az 1-feniletanollal végzett acilezéshez, azonban az aminok esetén az acilezőszer nem vinil-acetát, hanem etil-acetát volt.



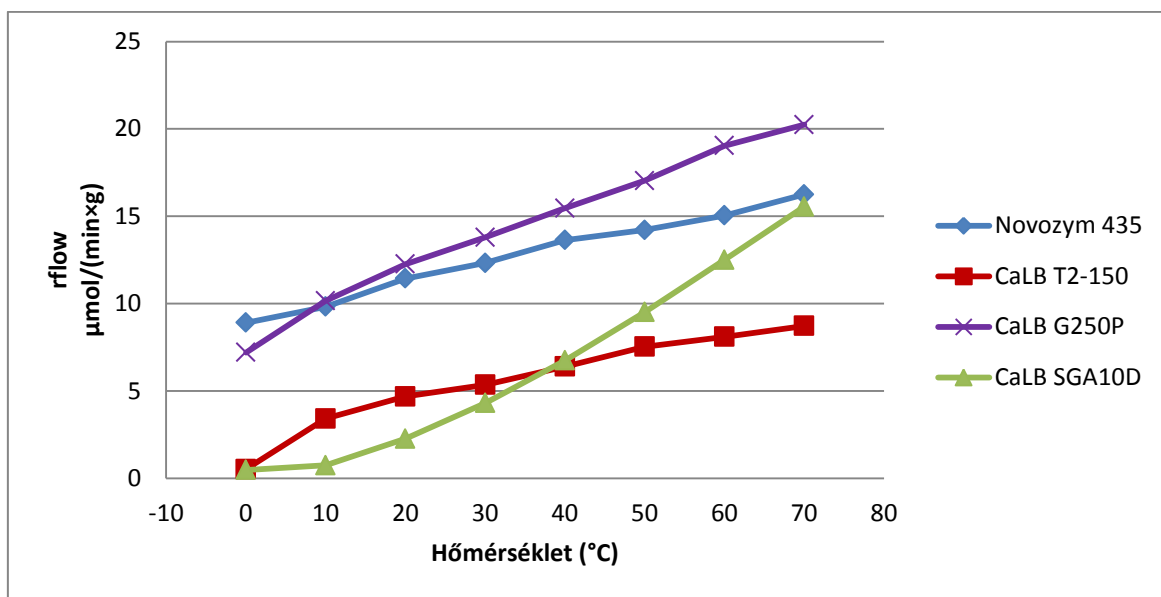
14. ábra A racém (1-feniletil)-amin és a racém (1-metil-3-fenilpropil)-amin kinetikus rezolválása etil-acetáttal

Alkoholok esetén a vinil-acetát jól alkalmazható acilezőszer, mert az acilezés során acetaldehiddé alakul, mely gázként eltávozik a rendszerből, így a termék keletkezésének irányába tolja el az eredetileg egyensúlyi reakciót a Le Chatelier elv szerint. Aminoknál a keletkező acetaldehid Schiff-bázist hozna létre az amin-csoporttal, így akadályozná az acilezést. A reakciókban ez esetben is az (*R*)-konfigurációjú szubsztrát átalakulása a preferáltabb, így szelektív enzimkészítmény alkalmazása esetén termékként tiszta (*R*)-acetamidot kaphatunk, míg a visszamaradó amin tisztán (*S*)-konfigurációjú.

A saját készítésű fenil-módosított Grace 250 hordozóra adszorpciósan rögzített CaLB enzim (CaLB G250P) mellett, egy a kutatócsoport által szol-gél mátrixban immobilizált (CaLB SGA10D) és két kereskedelmi enzimet (Novozym 435, CaLB T2-150) is teszteltünk. A kereskedelemben kapható enzimek közül a Novozym 435 akril gyöngyökre adszorpciós rögzítéssel előállított készítmény, míg CaLB T2-150 szintén akril gyöngyökre, de kovalensen kötött CaLB enzim. A korábban végzett tesztreakcióhoz hasonlóan itt is állandó áramlási sebesség mellett (0,2 ml perc⁻¹) 0-70°C-ig tartó hőmérséklet-tartományban vizsgáltuk meg a két reakció produktivitásának és szelektivitásának az alakulását. Az eredmények alapján elmondható, hogy mind a kettő aminnal végzett reakció során a fenil módosítású Grace 250 hordozóra adszorpciósan rögzített CaLB enzim mutatta a legnagyobb produktivitást (15-16. ábra). A saját készítésű enzimpreparátumunk felülmúlta a kereskedelmi enzimkészítményeket is.



15. ábra Az (1-metil-3-fenilpropil)-amin kinetikus rezolválásának produktivitása a hőmérséklet függvényében toluolban, etil-acetáttal, négy különböző CaLB enzimmészítménnyel tesztelve



16. ábra Az (1-feniletil)-amin kinetikus rezolválásának produktivitása a hőmérséklet függvényében toluolban, etil-acetáttal, négy különböző CaLB enzimmészítménnyel tesztelve

Megfigyelhető, hogy az enzimek működése és a görbék lefutása mindkét reakcióban azonosak. A szol-gél mátrixban rögzített enzim (CaLB SGA10D) alacsonyabb hőmérsékleten kevésbé aktív, mint a többi, magasabb hőmérsékleteken viszont már összemérhető velük. Ez feltételezhetően a szol-gél rögzítési technikának a következménye, ugyanis a polimer mátrixba zárás jelentősen növeli a diffúziós gátat, így alacsony hőmérsékleteken a szubsztrát nehezebben fér az enzimhez. A másik három készítmény

esetén az enzim a hordozó felületén van rögzítve. Összehasonlítva a Novozym 435-öt (amely az iparban legtöbbet alkalmazott CaLB enzimkészítmény) a saját adszorpciós készítményünkkel megfigyelhető, hogy 0°C-on a Novozym 435 még produktívabb, 10°C-on közel azonosak, ennél magasabb hőmérsékleten azonban a saját, felületmódosított hordozóra rögzített enzim jobban működik. Ez a tendencia mindkét reakcióban azonos.

A szelektivitás hőmérséklet függése hasonló lefolyású mind a négy enzimkészítmény esetén, nagymértékben hasonlítanak az 1-feniletanol reakciójában kimértekre. Magasabb hőmérsékleten alacsonyabb szelektivitásokat kaptunk. Az (1-feniletil)-amin kinetikus rezolválásában az enantiomerszelektivitás (E) értékek még 70°C-on is $\gg 200$ értékűek voltak. Legalacsonyabb értéket a Novozym 435 enzimmel értük el: 26,5% konverzió mellett $ee(P)=99,4\%$ tisztasággal állítottuk elő az (*R*)-*N*-(1-feniletil)acetamidot. Az (1-metil-3-fenilpropil)-amin *N*-acilezési reakciójában az összes enzim moderáltabb szelektivitást mutatott, 70°C-on az enantiomerszelektivitás (E) a leggyengébb esetben is >100 értékű volt. Ezen a hőmérsékleten is a Novozym 435 volt a legkevésbé szelektív: 42,2% konverzió mellett a termék (*R*)-*N*-(1-metil-3-fenilpropil)acetamid tisztasága $ee(P)=97,7\%$ volt.

A produktivitás hőmérsékletfüggésével ellentétben az enantiomerszelektivitások (E) lefutásában és értékeiben a különbözőképpen rögzített CaLB enzimek között nem volt jelentős különbség.

4. Kísérleti rész

4.1. Alkalmazott analitikai módszerek

A gázkromatográfiás méréseket Agilent 4890 és Agilent 5890 készülékeken végeztük, Hydrodex β -6TBDM ($25\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ mm}$ film, *t*-butil-dimetilszililezett β -ciklodextrin; Macherey&Nagel) és Hydrodex β -TBDAc ($25\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ mm}$ film, acetilezett és *t*-butil-dimetilszililezett β -ciklodextrin; Macherey&Nagel) enantiomerszelektív királis állófázist tartalmazó kolonnákkal. Vivőgázként hidrogént használtunk (fejnyomás 12 psi, lefűvadási arány 1:50). Injektor és FID detektor hőmérséklete: 250°C . A reakciók követéséhez a szükséges mintákat közvetlenül a reakcióelegyből vettük, majd diklórmetánnal hígítottuk megfelelő koncentrációra ($1\text{--}2\text{ mg ml}^{-1}$). Mennyiségi analízis céljából összemért standarddal határoztuk meg az acetátok alkoholokra vonatkoztatott és az acetamidok aminoszavakra vonatkoztatott moláris válaszfaktorát. A kromatogramok kiértékelésénél a tiszta alkoholok, acetátok, aminoszavak és acetamidok retenciós ideit vettük referenciaként.

Hőmérsékletprogramok:

- Hydrodex β -6TBDM, 120°C izoterm, 8 perc. Retenciós idők (t_R): (S)-1-feniletil-acetát: 4,13 perc; (R)-1-feniletil-acetát: 4,65 perc; (R)-1-feniletanol: 6,10 perc; (S)-1-feniletanol: 6,44 perc.
- Hydrodex β -TBDAc, $100\text{--}180^\circ\text{C}$ $8^\circ\text{C}/\text{perc}$, 180°C 5 perc. Retenciós idők (t_R): (S)-(1-feniletil)-amin: 2,88 perc; (R)-(1-feniletil)-amin: 3,04 perc; (R)-N-(1-feniletil)acetamid: 9,77 perc; (S)-N-(1-feniletil)acetamid: 9,98 perc.
- Hydrodex β -TBDAc, $140\text{--}170^\circ\text{C}$ $1^\circ\text{C}/\text{perc}$. Retenciós idők (t_R): *rac*-(1-metil-3-fenilpropil)-amin: 2,59 perc; (S)-N-(1-metil-3-fenilpropil)acetamid: 23,48 perc; (R)-N-(1-metil-3-fenilpropil)acetamid: 23,60 perc.

A folyamatos üzemű reakciók kivitelezéséhez a kutatócsoport saját tervezésű laborreaktorát használtuk. A CatCart™ reaktorokat ($70\text{ mm} \times 4\text{ mm ID}$, ThalesNano) fém ezüst szűrő membránokkal (Sterlitech Silver Membrane Filter, Sigma–Aldrich, No Z623237, pórus méret: $0,45\text{ }\mu\text{m}$) és teflon (PTFE) tömítések segítségével zártuk le. A rázatott lombikos reakciókat Heidolph Vibramax 100 és Titramax 1000 termosztálható és rázógépen végeztük.

4.2. Felhasznált anyagok

4.2.1. Oldószerek, vegyszerek

A felhasznált vegyszerek és oldószerek a Sigma-Aldrich, a Fluka, a Merck, az Alfa Aesar, a PQ Silica, a Reanal, a Grace és a Molar Chemicals termékei: 2-propanol, 1-feniletanol, (1-feniletil)-amin, (1-metil-3-fenilpropil)-amin, vinil-acetát, nátrium-klorid, telített ammónia-oldat, TRIS, feniltrimetoxiszilán, oktiltrimetoxiszilán, (3-aminopropil)trimetoxiszilán, G920, G915, G250, G150, PQ300, Geduran szilikagél, etanol, metanol, hexán, *terc*-butil-metil-éter, toluol, etil-acetát, diklórmétán.

A felhasznált oldószereket használat előtt frissen desztilláltuk.

4.2.2. Biokatalizátorok

A lipáz AK (*Pseudomonas fluorescens*), lipáz PS (*Pseudomonas cepacia*, régebben *Burkholderia cepacia* az Amano Europe; a *Candida rugosa* (triacilglicerol acilhidroláz VII.típus *Candida rugosa*-ból) a Sigma; a Novozym 435 (lipáz akril gyöngyön *Candida antarctica* B-ből), a Novozym CaLB L (rekombináns B lipáz oldat *Candida antarctica*-ból) a Novozymes Denmark; a CaLB T2-150 (*Candida antarctica* B lipáz kovelensen rögzítve száraz akril gyöngyökre) a Chiral Vision BV termékei.

A CaLB SGA10D enzim a kutatócsoport által szol-gél mátrixban rögzített *Candida antarctica* B lipáz.

4.3. Szilikagélek felületmódosítása

50 ml-es talp nélküli centrifugacsövekbe bemértük (4,0-4,0 g) a módosítani kívánt szilikagélt (Grace 920, Grace 915, Grace 150, Grace 250, Geduran, PQ 300), majd etanolban szuszpendáltattuk (40 ml) és hozzáadtunk telített NH₄OH oldatot (640 µl). Rázógépen (Heidolph Vibramax 100) szobahőmérsékleten ráztattuk olyan fordulaton, hogy a centrifugacsövek tartalma ne ülepedjen vissza (kb. 500 rpm). 1 óra ráztatás után a mintákhoz adtuk a megfelelő szilán-származékot (200-200 µl; PhTMS; OctTMS; 3-Aminopropil-triMetOS), majd még 23 óra ráztatás után hozzáadtunk a megfelelő szilán-származékból (600-600 µl; PhTMS; OctTMS; AmPrTMS).

További 4 nap rázatás után a mintákat kivettük, majd lecentrifugáltuk (Hermle Z400K, 3500 rpm, 20°C, 20 min), a felülúszót ledekantáltuk, majd a maradékot felszuszpendáltuk etanolban (45 ml-re a centrifugacső jelzése szerint). Újabb centrifugálás után (3500 rpm, 20°C, 20 min) ismét ledekantáltuk a felülúszót, a maradékot újra szuszpendáltuk etanolban (45 ml-re a centrifugacső jelzése szerint), majd ismét centrifugáltuk (3500 rpm, 20°C, 30 min). A felülúszót leöntöttük, majd a maradékot petricsészén, szobalevegőn legalább 3 napig szárítottuk, naponta átkeverve.

4.4. Szilikagélek felületmódosításának optimalálása

50 ml-es talp nélküli centrifugacsővekbe bemértünk Grace 250 szilikagélt (4,0-4,0 g), majd etanolban szuszpendáltattuk (40 ml) és hozzáadtunk telített NH_4OH oldatot (640 μl). Rázógépen (Heidolph Vibramax 100) szobahőmérsékleten ráztuk olyan fordulaton, hogy a centrifugacsővek tartalma ne ülepedjen vissza (kb. 500 rpm). 1 óra rázatás után a mintákhoz adtuk a megfelelő szilán-származékot (200-200 μl ; PhTMS; OctTMS), majd még 23 órát ráztuk. Ekkor egy fenil és egy oktil módosított mintát kivettünk (2. nap), ezeket a fent leírt mosási eljárás szerint mostuk. A maradék mintákhoz hozzáadtunk a megfelelő szilán-származékból (600-600 μl ; PhTMS; OctTMS). További 24 óra rázatás után kivettünk a rázógépből még egy-egy fenil és oktil módosított szilikagélt (3. nap), ezeket is a fentiek szerint mostuk, a többi mintát további 24 órát ráztuk, majd mostuk.

4.5. TRIS-puffer oldat készítése

Analitikai mérlegen bemértünk 12,14 g TRIS-t és 5,29 g NaCl-t, majd 1000 ml desztillált vízben oldjuk, az oldat pH-ját koncentrált sósavval 7,5-re állítjuk.

4.6. Enzimek adszorpciós rögzítése szilikagél hordozókra

2 mg/ml koncentrációjú enzim-oldatot készítettünk TRIS-pufferből és a megfelelő enzimporból vagy folyadékból, majd 12,5 ml oldathoz 250 mg hordozót adtunk. Az így elkészített elegyeket rázógépen hűtött közegben (4-8°C) kevertettük egy napon keresztül, majd a mintákat üvegszűrőn (G4) szűrtük, mostuk kétszer izopropanollal és egyszer hexánnal. Az elkészített biokatalizátorokat 8 órán keresztül szobalevegőn szárítottuk.

4.7. Biokatalizátorok tesztelése szakaszos üzemben

A reakciókat 4 ml-es teflon zárólemez és menetes kupak segítségével légmentesen lezárt reakcióedényben végeztük, melybe 50 mg biokatalizátort, 50 μ l racém 1-feniletanolt, 100 μ l vinil-acetátot és 1 ml hexán/*terc*-butil-metil-éter = 2/1 arányú elegyét mértük be, majd 30 °C-on temperált rázógépre helyeztük (Heidolph Vibramax 1000, 1200 rpm).

Az elegyből adott időközönként mintát vettünk, amelyet diklórmétánnal 1 mg/ml töménységűre hígítottunk. Az így kapott mintákat királis állófázist tartalmazó kolonnán (Hydrodex β -6TBDM) gázkromatográfiás módszerrel elemeztük.

4.8. Biokatalizátorok tesztelése folyamatos üzemben

4.8.1. Racém 1-feniletanol kinetikus rezolválása folyamatos üzemben

Az 1-feniletanol (10 mg ml⁻¹ vagy 50 mg ml⁻¹) hexán/*terc*-butil-metil-éter/vinil-acetát 9/3/1 arányú oldatát az asztali laborreaktorban felületmódosított szilikagélre rögzített lipázokkal (AK G250P, PS G250O, CaLB G250P, CrL G250O) töltött CatCart® oszlopon áramoltattuk át 0,2 ml perc⁻¹ átáramlási sebességgel 0-70°C hőmérséklet-tartományban 10°C-os lépésközökkel. Minden hőmérsékleten a stationer állapot beállta után (a teljes rendszer térfogatának ~8-szorosa; GC-vel követve) az átfolyó reakcióelegyből vett mintából gázkromatográfiásan (Hydrodex β -6TBDM) határoztuk meg az elegy enantiomer összetételét. A reakció előtt és után a rendszert hexánnal mostuk (1,0 ml perc⁻¹; 20 perc).

4.8.2. Racém aminok kinetikus rezolválása folyamatos üzemben

A megfelelő racém amin (10 mg ml⁻¹) toluol/etil-acetát 9/1 arányú oldatát az asztali laborreaktorban CaLB enzimmel (Novozym 435, CaLB T2-150, CaLB G250P, CaLB SGA10D) töltött CatCart® oszlopon áramoltattuk át 0,2 ml perc⁻¹ átáramlási sebességgel 0-70°C hőmérséklet-tartományban 10°C-os lépésközökkel. Minden hőmérsékleten a stationer állapot beállta után (a teljes rendszer térfogatának ~8-szorosa; GC-vel követve) az átfolyó reakcióelegyből vett mintából gázkromatográfiásan (Hydrodex β -TBDAc) határoztuk meg az elegy enantiomer összetételét. A reakció előtt és után a rendszert toluollal mostuk (1,0 ml perc⁻¹; 20 perc).

5. Összefoglalás

Munkám célja gazdaságos, környezetbarát technológia kidolgozása volt enzimpreparátumok egyszerű, méretnövelhető kinyerésére és rögzítésére. A technológia fejlesztése során elsődleges szempont volt az enzim katalitikus tulajdonságainak javítása is. A kitűzött célt szilikagélek változatos felületi tulajdonságának kialakítását lehetővé tevő új felületmódosítási módszer kidolgozásával valósítottuk meg. A felületmódosított hordozókat lipázok rögzítésére felhasználva számos előnyös tulajdonságú új biokatalizátort állítottunk elő és ezek biokatalitikus sajátságait jellemeztük.

A szilikagélek felületmódosítását a Stöber-módszert³⁶ továbbfejlesztve végeztük el. A vizsgálatok során hat különböző szilikagél módosítottunk többféle szubsztituált trialkoxiszilánnal, majd az így elkészített hordozókra adszorpciós módszerrel lipázokat (CaLB, AK, PS, CrL) rögzítettünk. Mind a négy enzim esetében a Grace 250 hordozó módosított változatai bizonyultak legjobbnak, a lipáz AK és a CaLB enzimek a fenil, míg a lipáz PS és a CrL enzimek az oktil módosított hordozókon rögzültek jobban.

Gazdaságossági szempontokat figyelembe véve, megvizsgáltuk a felületmódosításhoz használt közeg hatását is. Az első kísérleteknél alkalmazott etanolt metanolra cserélve néhány esetben a rögzített enzim biokatalitikus tulajdonságai kedvezően változtak. Terveink között szerepel további alkoholok, illetve többféle módon denaturált etanol tesztelése is.

Mivel az első tesztsorozatban felhasznált felületmódosított szilikagélek előállítására egy hetet vett igénybe, a felületmódosítás rövidítése céljából vizsgálatokat végeztünk a reakció optimális időszükségletének megállapítására. Úgy találtuk, hogy a módosítást három napig végezve nyerhetőek az enzimrögzítésben legjobb tulajdonságú hordozók. Amennyiben a felületmódosítási reakciót tovább végeztük a rögzített enzimek biokatalitikus tulajdonságai romlottak.

A szakaszos üzemben elért legjobb tulajdonságokat felmutató négy lipáz rögzítését méretnöveltük és a készítmények biokatalitikus sajátságait a racém 1-feniletanol kinetikus rezolválásával folyamatos, átfolyásos reaktorban is teszteltük. A reakciók hőmérsékletfüggését vizsgálva megállapítottuk, hogy a hőmérséklet emelkedésével a produktivitás minden lipáz készítménynél monoton nő. A rögzített lipázok szelektivitása három enzim esetében monoton csökken, míg a CaLB enzim szelektivitása 20°C körül maximális.

A fenil-módosított szilikagélen rögzített CaLB enzimet tovább vizsgáltuk az (1-metil-3-fenilpropil)-amin és az (1-feniletil)-amin folyamatos üzemű kinetikus rezolválásában. E reakciókban a produktivitás a hőmérséklet emelkedésével monoton nőtt, míg az enantiomer szelektivitás csökkent. Ezt a biokatalizátort összehasonlítottuk különböző kereskedelembe is kapható, illetve egy szol-gél mátrixba zárt saját készítésű CaLB készítménnyel. Összehasonlító vizsgálataink során mindkét szubsztráttal minden tekintetben az új fejlesztésű fenil-módosított szilikagél hordozóra adszorpcióval rögzített CaLB enzimünk bizonyult a legjobbnak.

Terveink között szerepelnek optimalizációs kísérletek mind a felületmódosítás, mind az enzimadszorpció paramétereinek további finomítására. Vizsgálni szeretnénk továbbá az általunk fejlesztett felületmódosított szilikagélek felhasználhatósági területeinek bővítését, további enzimek és további felületmódosításra alkalmas organoszilánok alkalmazásával. A Felhasználhatósági területek bővítéseként tanulmányozni szeretnénk a különböző hidrofobicitású módosított szilikagélek nyers fermentléből történő frakcionált, szelektív enzimadszorpcióra való alkalmazhatóságát is.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Poppe Lászlónak kiváló témavezetéséért és magas színvonalú szakmai támogatásáért. Köszönettel tartozom konzulensemnek, Boros Zoltánnak a preparatív munkák koordinálásáért illetve szakmai segítségnyújtásáért. Külön köszönet a „*Déli 2es labor*” minden hallgatójának és munkatársának a sok hasznos tanácsért és a rengeteg segítségért.

7. Irodalomjegyzék

1. Grogan, G. „*Practical Biotransformations – A Beginner’s Guide*”, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.
2. Umemura, I., Takamatsu, S., Sato, T., Tosa, T., Chibata, I. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **1984**, 20, 291-295.
3. Kennedy, J. F., Melo, E. H. M., Junel, K. *Chemical Engineering Progress*, **1990**, 7, 81-89.
4. Parthasarathy, R. V., Martin, C. R. *Nature*, **1994**, 369, 298-301.
5. Girono, L., Drioli, E. *Trends in Biotechnology*, **2000**, 18, 339-349.
6. Bakker, M., Van De Velde, F., Van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. *Biotechnology and Bioengineering*, **2000**, 70, 342-348.
7. Gasztonyi, K., Lásztity, R. „*Élelmiszer-kémia I.*”, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, **1992**.
8. Sevélla, B. „*Biomérnöki műveletek és folyamatok*”, Műegyetemi Kiadó, Budapest, **2009**.
9. Poppe, L., Novák, L. „*Biokatalízis a szintetikus szerves kémiában; A kémia újabb eredményei*”, Akadémia Kiadó, Budapest, **1991**.
10. Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. „*Industrial Biotransformations*”, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
11. Poppe, L., Novák, L. „*Selective Biocatalysis – A Synthetic Approach*”, Wiley-VCH, Weinheim, **1991**.
12. Chojnacka, A., Obara, R., Wawrzencyk, C. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, 18, 101–107.
13. Warshel, A., Russell, S. *Journal of the American Chemical Society*, **1986**, 108, 6569-6579.
14. Warshel, A., Naray-Szabó, G., Sussman, F., Hwang, J. K. *Biochemistry*, **1989**, 28, 3629-3637.
15. Menten, L., Michealis M. I. *Biochemische Zeitschrift*, **1913**, 49, 333-369
16. Bódai, V. *Környezetvédelem*, **2002**, 3-4, 41
17. Whittall, J., Sutton, P. W. „*Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations*”, Wiley-VCH, Weinheim, **2010**.

18. Guo, Z-W., Sih, C. J. *Journal of the American Chemical Society*, **1989**, *111*, 6836-6841.
19. Chen, C. S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G., Sih, C. J. *Journal of the American Chemical Society*, **1982**, *104*, 7294-7299.
20. Rakels, J. L. L., Straathof, A. J. J., Heijnen, J. J. *Enzyme and Microbial Technology*, **1993**, *15*, 1051-1056.
21. Cao, L., van Langen, L.M., Sheldon, R.A. *Current Opinion in Biotechnology*, **2003**, *14*, 387–394.
22. Kim, J-K., Park, J-K., Kim, H-K. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* , **2004**, *241*, 113–117.
23. Blanco, R. M., Terreros, P., Fernández-Pérez, M., Otero, C., Díaz-González, G. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2004**, *30*, 83-93.
24. Oladepo, D. K., Halling, P. J., Larsen, V. F. *Biocatalysis and Biotransformation*, **1995**, *12*, 47-54.
25. Wu, H., Huang, S., Jiang, Z. *Catalysis Today*, **2004**, *98*, 545–552.
26. Nawani, N., Singh, R., Kaur, J. *Electronic Journal of Biotechnology*, **2006**, *9*, 559-565.
27. Lozano, P., De Diego, T., Sauer, T. Vaultier, M., Gmouh, S., Iborra, J. L., *Journal of Supercritical Fluids*, **2007**, *40*, 93–100.
28. Gao, S., Wang, Y., Wang, W., Luo, G., Dai, Y. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2010**, *62*, 218–224.
29. Kato, K., Seelan, S. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2010**, *109*, 615–617.
30. Laszlo, J. A., Jackson, M., Blanco, R. M. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2011**, *69*, 60–65.
31. Cunha, A. G., Fernández-Lorente, G. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2009**, *156*, 563-575.
32. Weetall, H. H. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **1993**, *41*, 157-188.
33. Bosley, J. A., Clayton, J. C. *Biotechnology and Bioengineering*, **1994**, *43*, 934-938.
34. Wannerberger, K., Arnebrant, T. *Journal of Colloid and Interface Science*, **1996**, *177*, 316-324.
35. Bogush, G.H., Tracy, M.A., Zukoski IV, C.F. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **1988**, *104*, 95-106.

36. Stöber, W., Fink, A., Bohn, E. *Journal of Colloid and Interface Science*, **1968**, 26, 62-69.
37. Wu, Z., Han, H., Han, W., Kim, B., Ahn, K. H., Lee, K. *Langmuir* **2007**, 23, 7799-7803.
38. Csajági, C., Szatzker, G., Tőke, E. R., Ürge, L., Darvas, F., Poppe, L. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 19, 237-246.
39. Tomin, A., Weiser, D., Hellner, G., Bata, Z., Corici, L., Péter, F., Koczka, B., Poppe, L. *Process Biochemistry*, **2011**, 46, 52-58.
40. Tomin, A., Weiser, D., Bata, Z., Corici, L., Péter, F., Poppe, L. *Studia Universitatis Babes-Bolyai, Seria Chemia*, **2009**, 54, 77-82.
41. Fekete, J. „*Folyadékkromatográfia elmélete és gyakorlata*”, Edison House, Budapest, **2006**.
42. Tomin, A., Hornyánszky, G., Kupai, K., Dorkó, Z., Ürge, L., Darvas, F., Poppe, L. *Process Biochemistry*, **2010**, 45, 859-865.
43. Weiser, D., Boros, Z., Hornyánszky, G., Tóth, A., Poppe, L. *Process Biochemistry*, **2011**, beküldve
44. Falus, P., Boros, Z., Hornyánszky, G., Nagy, J., Ürge, L., Darvas, F., Poppe, L. *Studia Universitatis Babes-Bolyai, Seria Chemia*, **2010**, 55, 289-296.
45. Boros, Z., Szigeti, M., Tomin, A., Kovács, P., Ürge, L., Darvas, F., Poppe, L. *Studia Universitatis Babes-Bolyai, Seria Chemia*, **2009**, 54, 69-75.
46. Hellner, G., Boros, Z., Tomin, A., Poppe, L. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2011**, 353, 2481-2491.
47. Falus, P., Boros, Z., Hornyánszky, G., Nagy, J., Ürge, L., Darvas, F., Poppe, L. *Tetrahedron Letters*, **2011**, 52, 1310-1312.
48. Tomotani, E. J., Vitolo, M. *Journal of Food Engineering*, **2007**, 80, 662–667.