



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar

Nagy Flóra

BSc. IV. évfolyam

Biomérnök szakos hallgató

**Terner szol-gél rendszerekbe rögzített lipázok
szisztematikus optimalizálása és felhasználhatósága**

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

Konzulens: Weiser Diána, PhD hallgató
BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék

A dolgozat bemutatását a TÁMOP - 4.2.2.B-10/1--2010-0009
"Új tehetséggondozó programok és kutatások a Műegyetem tudományos
műhelyeiben" című program támogatta.

OTDK dolgozat
Budapest, 2012

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Poppe Lászlónak munkám kimagasló szakmai támogatásáért és hogy lehetővé tette számomra, hogy a csoportjában dolgozhassak.

Köszönöm szépen konzulensemnek, Weiser Diánának, hogy megtanított a munkamódszerekre, és a mérések tervezésében és kiértékelésében nagy segítségemre volt.

Köszönet illeti Kemény Sándor professzor urat (BME, Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszék), aki a kísérletterv elkészítésében nyújtott kiváló szakmai segítséget és Koczka Bélát (egyetemi docens, BME, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék), aki az elektronmikroszkópos felvételek elkészítésében segített.

Végül szeretném megköszönni a Szerves Déli II. labor minden tagjának, hogy a munkám során felmerülő kérdéseimre mindig készségesen válaszoltak és segítettek.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	6
1.1. Célkitűzés.....	7
2. Irodalmi áttekintés.....	8
2.1. Az enzimek általános jellemzése	8
2.2. A katalízis molekuláris mechanizmusának modellei	9
2.3. Az enzimaktivitást befolyásoló tényezők.....	10
2.3.1. A pH hatása	10
2.3.2. A hőmérséklet hatása	10
2.4. Egyszerű enzimkatalizált rendszerek kinetikája	11
2.5. Az enzimkatalizált reakciók jellemzése	12
2.6. Enzimrögzítés.....	14
2.6.1. Kémiai módszerek.....	15
2.6.2. Fizikai módszerek	18
2.7. Szol-gél mátrixba zárás	19
2.8. Rögzített enzimes rendszerek kinetikája	21
2.9. Lipázok.....	22
2.9.1. Lipáz AK.....	23
2.9.2. CaL B	24
2.10. Kísérlettervezés	24
3. Kísérleti rész	27
3.1. Felhasznált oldószerek, vegyszerek, anyagok.....	27
3.1.1. Biokatalizátorok	27
3.2. Szol-gél immobilizálás.....	27
3.3. Biokatalizátorok tesztelése.....	27
3.4. Biokatalizátorok hőstabilitásának vizsgálata	28
3.5. Biokatalizátorok visszaforgathatóságának vizsgálata	28

3.6. Stabilitás vizsgálat felületaktív anyaggal szemben	28
3.7. Alkalmazott analitikai módszerek.....	29
4. Eredmények és értékelésük	30
4.1. Terner szol-gél rendszerek hatása a CaL B enzim biokatalitikus képességeire	32
4.2. Terner szol-gél rendszerek hatása a Lipáz AK enzim biokatalitikus képességeire	44
4.3. Hőstabilitás vizsgálatok szerves közegben	55
4.4. Biokatalizátorok visszaforgathatóságának vizsgálata	60
4.5. Stabilitás vizsgálat felületaktív anyaggal szemben	62
4.6. Szol-gél rögzített biokatalizátorok szerkezeti tulajdonságai	64
5. Összefoglalás	66
6. Függelék.....	68
7. Felhasznált irodalom	86

Rövidítések jegyzéke

CaL B	<i>Candida antarctica</i> B lipáz
Lipáz AK	<i>Pseudomonas fluorescens</i> lipáz
IPA	2-Propilalkohol
PEG	Polietilén-glikol 1000'
TRIS	Trizma® HCl [tris-(hidroximetil)-aminometán]
NaF	Nátrium-fluorid
TEOS	Tetraetoxiszilán
PTEOS	Fenil-trietoxiszilán
OTEOS	Oktil-trietoxiszilán
DMDEOS	Dimetil-dietoxiszilán
MTBE	terc Butil-metiléter
TRX-100	Triton-X 100 detergens
BSA	Borjú Szérum Albumin
GC	Gázkromatográfia
SEM	Pásztázó elektronmikroszkóp (Scanning Electron Microscope)
UV-VIS	Ultraibolya-látható spektroszkópia

1. Bevezetés

Napjaink szintetikus eljárásaiban az enzimkatalizált átalakításoknak egyre növekvő szerep jut főként a gyógyszeripar és orvosi diagnosztika, élelmiszer-, textil-, bőr-, papír- és vegyipar, valamint a környezetvédelem területén. [1, 2, 3, 4, 5] Az enzimek szerkezetükből fakadó szelektivitása lehetővé teszi enantiomertiszta anyagok előállítását, ami a modern gyógyszeripar számára elengedhetetlen. Erre a legismertebb példa az (R)-thalidomide (Contergan), amely altató, nyugtató hatású, viszont enantiomer párja – az (S)-thalidomide – kis mennyiségben is teratogén hatású [6].

Az enzimek terápiás és diagnosztikai alkalmazása a modern orvostudomány számára is nélkülözhetetlen. Ennek oka, hogy számos bakteriális és vírusos megbetegedés ellen kiválóan alkalmazhatók, valamint rák terápiában való szerepük is egyre kutatottabb [7, 8, 9]. A biológiai eredetű, illetve jelentőségű molekulák meghatározása a huszadik század analitikai kémiájának egyik legfontosabb, kiemelkedő nehézségű feladata volt. A biomolekulák szelektív felismerése érdekében az analitika gyakran a természetben fellelhető bioreceptor-ligandum kölcsönhatásokra támaszkodik, amely gyakran biokatalitikus, enzim reakciókon keresztül valósul meg [10, 11, 12].

Az enzimek aktivitása és stabilitása nagyban függ a reakciókörülményektől és a környezeti paraméterektől, a nem megfelelő körülményekre biokatalitikus aktivitásuk és szelektivitásuk elvesztésével reagálhatnak. Homogén fázisú alkalmazásuk során a reakcióelegyből és a terméktől nehezen választhatóak el, amely komoly technológiai problémát jelent az ipar számára. Terápiás alkalmazásuk során pedig a kívánt biohasznosulásuk okozhat nehézséget. Ezekre a problémákra jelenthetnek megoldást az enzimrögzítési technikák, amelyekkel sok esetben aktív és stabil készítmények állíthatóak elő. Megfelelő rögzítési módszer megválasztásával az adott enzim alkalmas lehet ipari, enzim terápiás, illetve bioanalitikai célokra egyaránt [13, 14, 15].

A lipázok a legszélesebb körben alkalmazott enzimek közé tartoznak. Olcsó és sokoldalú biokatalizátorként számos helyen alkalmazzák őket a gyógyszeriparban, élelmiszeriparban, sőt alternatív energiatermelésnél képesek növényi olajból bioüzemanyagot képezni [10, 16, 17]. A természetben a lipázok katalizálják a trigliceridek hidrolízisét zsírsavakra és glicerinre a lipid-víz határfelületen. A szintetikus folyamatokban a lipidek katalizálhatnak számos enantio- és regioszelektív reakciót, például a hidrolízist, észterezést, átészterezést, aminolízist és ammonolízist [18]. Az élő

szervezetben a lipázok a legfontosabb emésztő enzimek közé tartoznak. A pancreas lipáz hiánya komoly zsíremésztési és felszívódási zavarokat okozhat, melyek májbetegséget, krónikus hasnyálmirigy gyulladást, gyulladós bélbetegséget okozhatnak. Az enzim hiány lipáz tartalmú terápiás szerekkel hatékonyan kezelhető [19, 20].

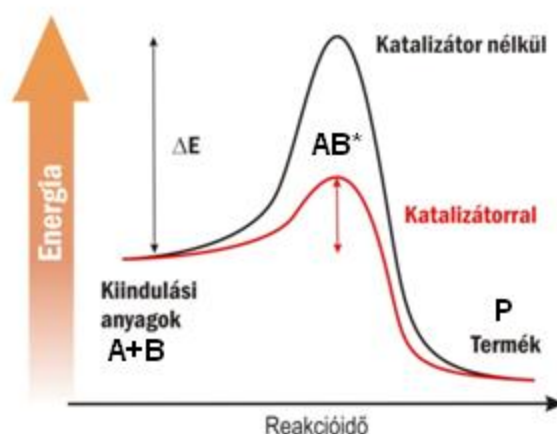
1.1. Célkitűzés

Munkám célja az egyszerű, hatékony és széles körben alkalmazható enzimrögzítési technika fejlesztése. Céлом a lipáz enzimek szol-gél rögzítéséhez használt különböző organoszilánok (TEOS, PTEOS, OTEOS, DMDEOS) arányának finomhangolásával az enzimkészítmények aktivitásának, szelektivitásának és stabilitásának fokozása volt. Szisztematikus kísérletterv segítségével vizsgáltam a szol-gél mátrix összetétele és a szubsztrát affinitás összefüggését aromás és alifás racém alkoholok kinetikus reszolválásában. Emellett tanulmányoztam az általam fejlesztett szol-gél lipázok hőstabilitását és a reakcióelegyből történő többszöri visszaforgathatóságát. Távlati célom a különböző enzimek rögzítési módszereinek általánosítható optimalizációs módszerének kidolgozása és az eljárás méretnövelése ipari felhasználás céljából.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az enzimek általános jellemzése

Az enzimek az élő szervezetekben végbemenő kémiai reakciók fehérje típusú katalizátorai (biokatalizátorok). Katalitikus tulajdonságuk a szervesetlen katalizátorokéhoz hasonlóan a reakciósebesség növelésében nyilvánul meg, új, csökkent aktiválási energiájú reakcióút megnyitásával (1. ábra). Más katalizátorokhoz hasonlóan az enzimek nem befolyásolják a katalizált reakciók egyensúlyi állapotát, csupán az egyensúly kialakulását gyorsítják meg.



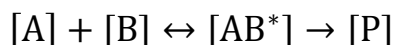
1. ábra: Az enzimkatalízis energiaprofilja

Az enzimek egy vagy több fehérjeláncból álló, természetes aminosavakból felépülő lineáris polimerek [21]. Más fehérjékhez hasonlóan, az enzimek is egyszerűek (proteinek) vagy összetettek (proteidek) lehetnek. A proteinek csak polipeptidlánc alkotja. A proteidek közé tartozó enzimek fehérjerészből (apoenzim) és nem fehérjetermészetű részből (koenzim) épülnek fel. Az apoenzim és a koenzim együttesét holoenzimnek nevezzük. Az apoenzim nem képes funkcióját ellátni a koenzim nélkül. Az enzimek katalitikus hatásának fő jellegzetessége a nagyfokú szelektivitás, ami azt jelenti, hogy az enzim csak meghatározott szubsztrátummal lép kapcsolatba. Az enzim-szubsztrát kapcsolódás az aktív centrumon történik meg, ahol az enzim reverzibilis módon megköti a molekulát és a rá jellemző módon átalakítja azt.

Az Eyring-féle abszolút reakciósebességi elmélet alapján ahhoz, hogy A és B anyagból P termék képződhessen, a reakciónak termodinamikailag lehetségesnek kell lennie (azaz a kiindulási anyagok szabadenergia szintje magasabb a képződő termékénél), továbbá a rendszerrel további energiát szükséges közölni, hogy egy átmenetileg még a kiindulásnál

is magasabb, aktivált energiaszintre kerüljön. Ez a plusz energia az aktiválási energia (E_a).

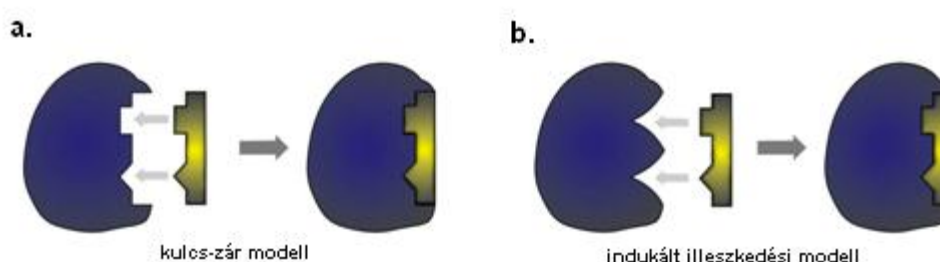
A reakció általános sémája enzimekre:



ahol $[AB^*]$ az aktivált komplexet jelöli.

2.2. A katalízis molekuláris mechanizmusának modellei

- Emil Fischer kulcs-zár elmélete (1890): A szubsztrát úgy illeszkedik az enzimbe, mint kulcs a zárba (2. ábra/a).
- Fluktuációs elmélet (1900-as évek): Az enzimnek állandóan változik a konformációja, a megfelelő konformációjú enzim fog reakcióba lépni a szubsztráttal.
- Indukált illeszkedés elmélete (D.E. Koshland, 1958): A szubsztrát molekula részleges kötődése az enzim konformációjának oly mértékű megváltozását okozza, hogy az enzim-szubsztrát komplex létre jöhessen (2. ábra/b) [22].



2. ábra: A kulcs-zár modell és az indukált illeszkedés elmélet modellje

Maga az aktív centrum az egész enzimnek csak egy kicsiny részét alkotja. Az enzim-szubsztrát kötésben a kovalens kötésekön kívül gyenge másodlagos kötőerők (van der Waals, hidrofób kölcsönhatás), H-kötések és ionos kötések is részt vesznek. Az aktív centrum nem poláris karakterű, a kötés specifikitását az aktív centrum atomjainak meghatározott elrendeződése adja.

2.3. Az enzimaktivitást befolyásoló tényezők

2.3.1. A pH hatása

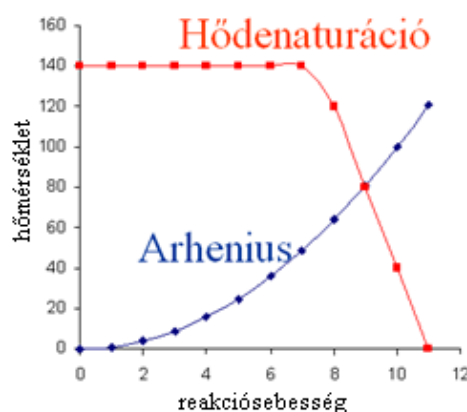
Mivel az enzimek fehérjék, ezért igen érzékenyek a közeg pH-jával szemben. Ennek oka kettős:

- a pH-érzékenység összefüggésben állhat a fehérje szerkezetének irreverzibilis megváltozásával, például a molekula denaturációjával;
- a katalitikus aktivitás függ az elektrosztatikus töltések mennyiségétől, ami viszont a pH függvényében nagymértékben változik.

Az enzimek nagy része az izoelektromos pontján vagy annak közelében fejt ki maximális aktivitását, azaz ilyen tartományban pH-optimuma van. Az enzimek aktivitása az optimális tartományon kívül fokozatosan csökken, majd a molekula denaturálódik és elveszíti aktivitását. Az enzimek általában szintén pH-optimumukon őrzik meg legjobban aktivitásukat, vagyis ezen a pH-értéken a legtartósabbak.

2.3.2. A hőmérséklet hatása

A reakciósebesség hőmérsékletfüggése egy maximumos görbével jellemezhető, két hatás eredőjeként. A növekvő hőmérséklet egyfelől ugyanis fokozza a reakciósebességet (Arrhenius-egyenlet), másrészt azonban adott hőmérséklet felett bekövetkezik az enzim hődenaturáció miatti inaktiválódása (3. ábra). A hőmérsékletet újra lecsökkentve a megváltozott konformáció visszaállhat az eredeti állapotába (reverzibilis hőinaktiválódás), de az is előfordulhat, hogy egy nem aktív térszerkezet stabilizálódik (irreverzibilis hőinaktiválódás) [22].



3. ábra: Enzimreakciók sebessége a hőmérséklet függvényében [22]

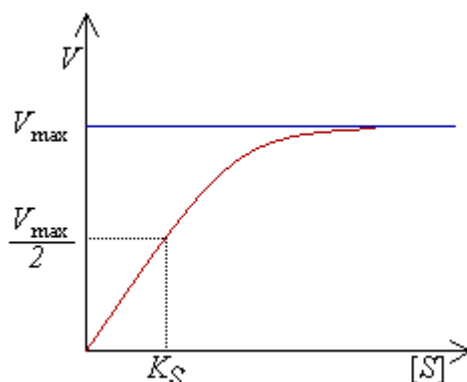
2.4. Egyszerű enzimkatalizált rendszerek kinetikája

A gyakorlati munka során fontos, hogy olyan matematikai összefüggéseket ismerjünk, amelyek alapján a reakciókat és a hozzájuk felhasznált enzimeket jellemezni, összehasonítani tudjuk (sebesség, időbeli lefutás). Ebben nyújt segítséget a rendszerek kinetikai leírása.

A Michealis és Menten féle megközelítés szerint az enzimes reakciók az alábbi sémával írhatók le:



ahol E a biokatalizátort, S a szubsztrátot, ES* a kialakult enzim-szubsztrát komplexet, P a reakció során képződő terméket jelöli. A modellnél fel kell tételeznünk az első lépés gyors beállítását és a második lépés irreverzibilitását ($k_{-1}=0$). A szubsztrát koncentráció függvényében ábrázolva a reakció sebességét, a 4. ábra szerinti telítési görbét kapjuk.



4. ábra: A Michaelis-Menten kinetika szerint lezajló reakció lefutási görbéje [22]

amely a Michaelis-Menten kinetika szerint leírható az alábbi egyenlettel:

$$[V] = V_{\max} \frac{[S]}{K_S + [S]}$$

A kifejezésben szereplő V a termék képződésének sebessége, ezen reakció maximális értéke $V_{\max}$ (amit akkor kapunk, ha a teljes enzim mennyiség ES* komplexben kötött formában van jelen), S a szubsztrát koncentrációját adja meg, K_S pedig az ES* komplex disszociációs állandója.

A gyakorlatban K_S helyett a K_M Michaelis-állandót alkalmazzák (az ES^* komplex steady state állapotát feltételezve), amely kifejezhető a reakciósebességi állandók segítségével:

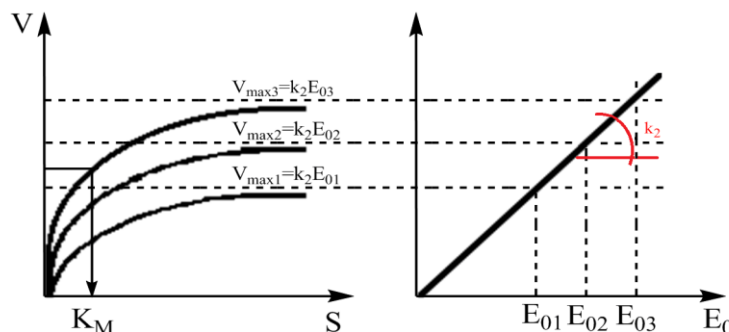
$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

valamint, a jelen lévő szabad enzim $[E]$, szubsztrát $[S]$ és enzim-szubsztrát komplex $[ES]$ koncentrációival is:

$$K_M = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

Gyors egyensúlyt (rapid ekvilibriumot) feltételezve egy reakcióra $K_M = K_S$.

A reakcióhoz bemért enzim mennyiségéről a $V_{\max}$ ad információt, ez az enzimaktivitás mérőszáma. $V_{\max}$ ismeretében meghatározhatjuk a k_2 elsőrendű sebességi állandót, amely már egyedileg jellemzi az adott enzimet („turnover number”-nek is nevezik). Értelmezve a turnover numbert, megadja az egységnyi enzim (μmol) által 1perc alatt létrehozott termék mennyiségét (μmol) [22].



5. ábra: k_2 elsőrendű sebességi állandó grafikus meghatározása [22]

2.5. Az enzimkatalizált reakciók jellemzése

Az enzimek és így a lipázok enantiomer szelektív reakciókban való alkalmazásukat lehetővé teszi, hogy királis makromolekulákként képesek megkülönböztetni egy racém elegy enantiomerjeit. Ennek kapcsán fontos néhány fogalmat megemlíteni:

- az *enantiomer felesleg* (enantiomeric excess, *ee*) az anyag tisztaságának mértékét adja meg, a következőképpen definiálható:

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

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

- az *enantiomerszelektivitás* (E) segítségével az enantiomerek megkülönböztetésének eredményessége fejezhető ki. Ez reverzibilis reakciók esetében:

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

Az összefüggésben szereplő K egyensúlyi állandót jelöl, míg c a konverzió.

- a *konverzió* (c) a következő kifejezéssel adható meg:

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

A fenti összefüggés (E) irreverzibilis reakciók esetében nagymértékben egyszerűsödik. Ekkor a konverzió (c) és a termék (ee_p), illetve szubsztrát (ee_s) frakciók enantiomer feleslegeinek értékeiből háromféleképpen számolható az enantiomerszelektivitás (E): [23]

- c és ee_p értékekből:

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

- c és ee_s értékekből:

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

- ee_s és ee_p értékekből:

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

Valójában ritkán dolgoznak tiszta enzim preparátumokkal, így nem ismert pontosan az enzimek tömege sem grammal, sem molárisan, éppen ezért a g/dm^3 vagy mol/dm^3

koncentrációk sem alkalmazhatóak a jelen lévő biokatalizátor mennyiségének megadására. Ehelyett az enzimegységet (*Unit*) használják, amely szubsztrát átalakítási vagy termékképződési sebességet jelent [22]. Az enzim egység általánosan elfogadott definíciója:

Egy egység az az enzim mennyiség, amely 1 μmol szubsztrátot alakít át vagy 1 μmol terméket képez 1 perc alatt adott reakció körülmények között. Az adott reakció körülményeket (hőmérséklet, pH, puffer molaritása, stb.) tehát minden aktivitás egység esetén egyértelműen meg kell adni a rendszer egzakt meghatározása érdekében.

A biokatalizátor specifikus aktivitása [U_B ($\mu\text{mol} \times \text{perc}^{-1} \times \text{g}^{-1}$), (U/g)] a kiindulási alkohol mólszámából [n_{rac} (μmol)], a konverzióból [c], a reakcióidőből [t (perc)] és biokatalizátor tömegéből [m_B (g)] számítható az alábbi képlet szerint:

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

2.6. Enzimirögzítés

A heterogén fázisú enzimes reakciók számos előnnyel rendelkeznek a homogén enzimes reakciókhoz képest. A homogén enzimes reakciók előnye, hogy a rendszer homogén, valamint az enzim izolálásán kívül más előkészületet nem igényel, de ezzel szemben állnak a gazdasági hátrányok. Homogén vizes közegben felhasználva az enzimek drágák, csak egyszer használhatók fel, az alkalmazott reakció után elvesznek. A pH, a hőmérséklet, a súrlódási konformáció változás és az ozmotikus nyomás együttes hatása miatt használatuk során csökken a stabilitásuk. Másfelől, mivel az enzimek vízben oldhatóak, elválasztásuk a termék és a szubsztrát keverékétől gazdaságilag nem célravezető folyamat, mivel csak bonyolult, drága módszerekkel lehet őket a reakcióelegyből kivonni. Tárolásuk során is csökken stabilitásuk, technológiai hátrányuk, hogy a terméket szennyezik, a tisztításukat nehezítik [22].

Az enzim immobilizációs technológia azonban segíthet kiküszöbölni ezeket a hátrányokat. A hagyományos enzimátikus reakciókat helyettesítve a rögzített készítményekkel lehetővé válik, hogy az enzim nagy mennyiségű szubsztrátot alakítson át, hiszen könnyen elkülöníthető a termék és szubsztrát keverékéből, ezáltal az enzim újra felhasználható. Az immobilizált enzimek a natív formával összevetve fokozott stabilitást, aktivitást és szelektivitást mutatnak, könnyen kezelhetők és tárolhatók, így fontos irányvonalat jelentenek a biotechnológiában [2, 4, 24, 25, 26].

A rögzített enzimeket különböző módon osztályozhatjuk. A felosztás alapja lehet az enzim és a hordozó között kialakult kötés jellege, valamint a hordozó típusa. A kialakuló kapcsolat alapján kémiai és fizikai módszereket különböztethetünk meg (1. táblázat).

	Rögzítési módszer	Előnyök	Hátrányok
Kémiai módszerek	Keresztkötött enzim kristályok (CLECs)	- szabályozható szemcseméret, - magas aktivitás, stabilitás	- nagyon nagy tisztaságú enzimet igényel - drága
	Keresztkötések enzim aggregátumok között (CLEA)	- egyszerű - olcsó - hatékony	kedvezőtlen mechanikai sajátságok
	Kovalens kötés hordozóhoz	stabil készítmény	csökkenhet az enzim aktivitása, szelektivitása
	Egyedi enzim nanorészecskék (SENs)	- hatékony enzimes rendszerek - potenciális biomedicina	- körülmenyes módszer - érzékeny, rövid élettartam
Fizikai módszerek	Adszorpció hordozó pórusaiban	- egyszerű - hatékony	- kiseb stabilitás - enzim deszorpció
	Alginátba zárás	- egyszerű - olcsó - hatékony	instabil készítmények
	Nanorészecskébe, nanoszálba zárás	- nagy hatékonyság - szabad diffúzió	drága
	Szol-gélbe zárás	- hatékony - stabil	nagyobb diffúziós gát

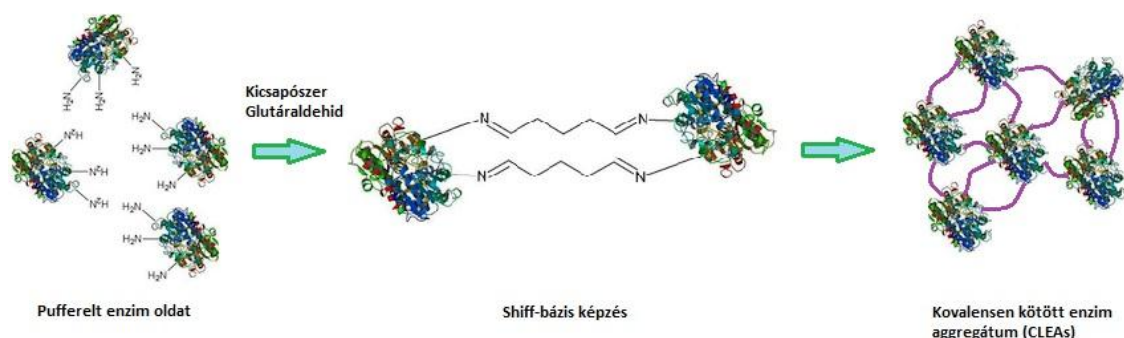
1. táblázat: Enzim rögzítési módszerek

2.6.1. Kémiai módszerek

Enzimek közötti keresztkötések

Manapság népszerű módszer az enzimek kovalens kötésekkel történő egymáshoz rögzítése. Robusztus, hatékony, nagy stabilitást biztosító eljárás a CLECs (Cross Linked Enzyme Crystals), mellyel kontrollálható részecskeméretű (1-100 μm) biokatalizátorok állíthatóak elő. Hátránya, hogy a nagyon nagy tisztaságú enzimek előállítása igen költséges és körülményes. Ennél egyszerűbb technika a CLEAs, amely során az egyes

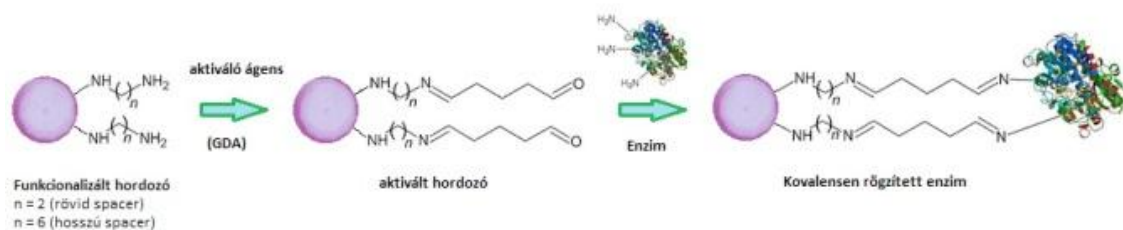
enzimmolekulákat bi- vagy multifunkciós reagensek segítségével összekapcsolják, majd a fehérjék kicsapásával nagy molekulaméretű, oldhatatlan aggregátumokat alakítanak ki. A keresztkötések kialakítására legelterjedtebben a glutáraldehidet alkalmazzák, amely Schiff-bázis képzés közben a fehérjék szabad aminoszócsoportjaival (N-terminális) lép reakcióba (6. ábra). A rögzítés során fellépő körülmények, mint például az enzim szerves közeggel történő kicsapása érintheti az enzim aktív centrumát, így a folyamat aktivitásvesztéshez is vezethet.



6. ábra: Kovalensen kötött enzimaggregátumok előállítás (CLEAs)

Kovalens kötés szilárd hordozóra

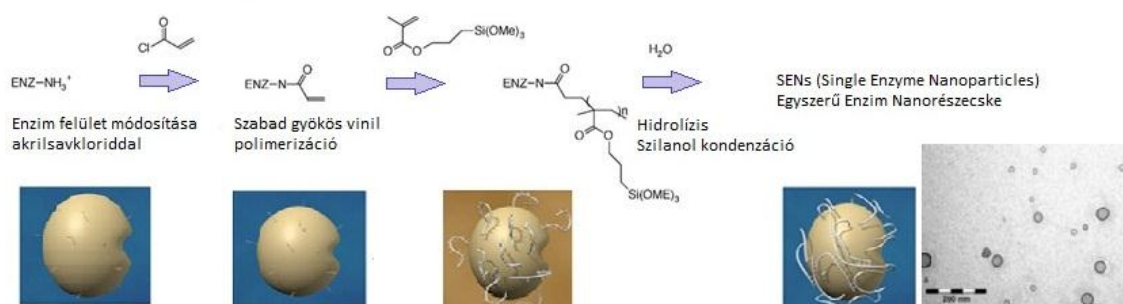
Az enzim aggregátumok kifejezetten kedvezőtlen mechanikai tulajdonságokkal rendelkeznek, ezért az enzimeket kovalensen előzetesen funkcionális hordozóra kötik. Az ilyen készítmény lényegesen jobb szerkezeti tulajdonságokkal rendelkezik, amely nagymértékben javíthatja az enzimmészítmény alkalmazhatóságát, tárolási lehetőségeit (7. ábra). A hordozó felszínére felvitt funkciós csoportokat a leggyakrabban glutáraldehiddel aktiválják, majd az enzimet $-NH_2$ csoportjain keresztül Schiff-bázis képzéssel rögzítik. Ez a technika stabil biokatalizátorokat eredményez, ám a kialakuló kovalens kötések gyakran az enzim szerkezetét is befolyásolják, amely katalitikus aktivitására kedvezőtlenül hathat.



7. ábra: Kovalens rögzítés szilárd hordozóhoz

Egyedi enzim nanorészecskék (SENs)

Modern rögzítési módszernek mondható az ún. egyedi enzim nanorészecskék előállítása (single enzyme nanoparticles, SENs), amelyek esetében minden egyes fehérje részecske néhány nanométer vastagságban szerves vagy szervetlen porózus anyaggal van körbevéve. Ez az újfajta eljárás eltér mind a mezopózus anyagokon, mind a szol-géleken való rögzítéstől. A módszer előnye, hogy az így átalakított fehérje molekulák egy-két nagyságrenddel stabilabb katalitikus aktivitást mutatnak és a szubsztrátum szabad mozgása sem korlátozódik [27]. Az eljárás első lépésben a fehérje molekulák felszíni lizin aminosavainak szabad amino csoportjait akrilsav-kloriddal módosítják. Kis mennyiségű felületaktív anyagot alkalmazva a módosított fehérjék ún. hidrofób ionpár formában feloldhatóvá válnak hexánban. Az ezután következő polimerizációs lépésnél a hexános fázisban a fehérje szabad felszínére van szükség, amihez elengedhetetlen az ionpár képzéssel történő oldódás. Vinil csoportot és trimetoxiszilil csoportot egyaránt tartalmazó szilil monomereket adva a hexános elegyhez ultraibolya fénnel történő gyökképzéssel, szabad gyökös vinil polimerizációt indítottak, amellyel lineáris polimereket állítottak elő. Az ortogonális polimerizációs lépésben a polimerek a fehérje felszínéhez kapcsolódnak oly módon, hogy a polimer intermediert vizes oldatba juttatva, a leágazó trimetoxi-szilil csoportok egymással kapcsolódnak, így minden egyes fehérje molekula körül keresztkapcsolt polimer háló alakul ki (8. ábra). A reakció körülmények finoman szabályozhatóak, így a keresztkötések túlnyomó többségben az egyes fehérje molekulákon belül alakulnak ki, különálló nano-méretű részecskéket eredményezve (8. ábra). Ezt követően a sajátos szerkezettel rendelkező SENs molekulák polimer háléhoz is köthetőek többszörös kovalens kötések keresztül [28].

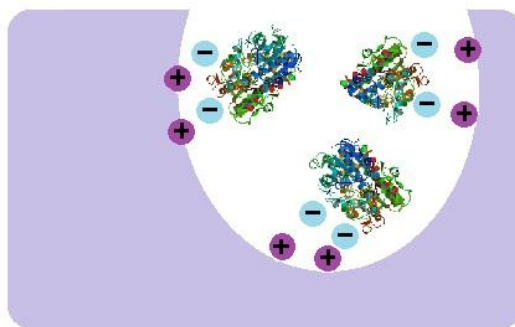


8. ábra: Egyedi enzim nanorészecskék előállítása

2.6.2. Fizikai módszerek

Adszorpció pórusos hordozón

A legelső enzimrögzítési módszert Nelson és Griffin 1916-ban véletlenül fedezte fel, amikor az élesztő invertáza aktív szénen adszorbeálva megőrizte aktivitását a szacharóz hidrolízisében [29, 30]. Ennél az esetnél az enzimek és a hordozó felülete között gyenge van der Waals kötések találhatók, de előfordulhatnak a kötésben hidrogén hidak és hidrofób kölcsönhatások is (9. ábra). A hordozóként szervetlen (szilikagél, aktív szén, üveg) és szerves (cellulóz, polimer gyöngyök) hordozókat alkalmaznak. Leggyakrabban az adszorpciót kevertetéssel és rázatással hajtják végre. A módszer hátránya, hogy a gyenge kötőerők miatt szubsztrát- és ionkoncentráció, valamint hőmérsékletváltozás hatására az enzim deszorpciója is előfordulhat.



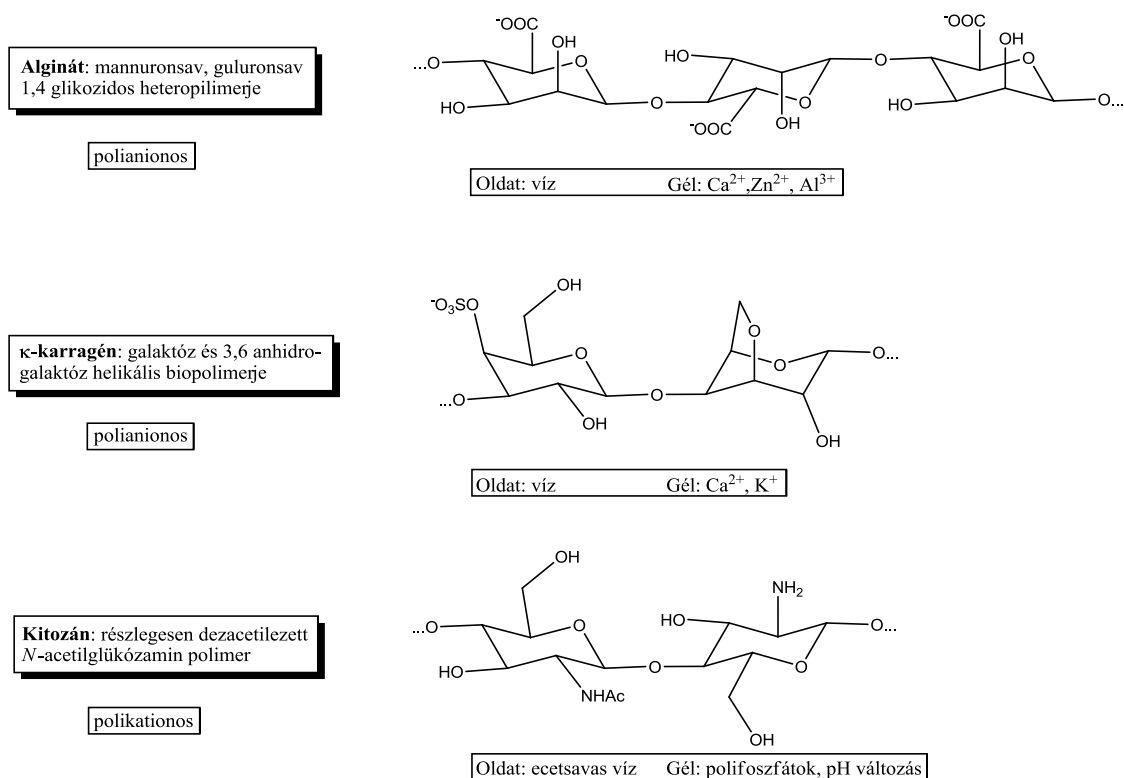
9. ábra: Enzimek adszorpciója pórusos hordozón

Gélbezárás

Természetes polimer gélek

A gélbe zárás egyik legelterjedtebb és legegyszerűbb módszere az alginátba zárás, amely során a fehérje pufferelt oldatát fém-alginát (legtöbbször Na-alginát) oldattal keverik össze, majd kisebb cseppeket képezve Ca^{2+} ionokat tartalmazó puffer oldatba csepegtetik. Eközben a Na^+ és Ca^{2+} ionok kicserélődnek és mivel a Ca-alginát vizes közegben nem oldódik az fehérje molekulák az alginát gél golyócskák belsejébe záródnak. Az alginát gélbe zárás folyamat során a Ca^{2+} koncentrációja kulcsfontosságú paraméter, különben a képződő gél gyöngyök feloldódnak. A módszer hátránya, hogy gélbe zárt enzimeket frissen kell előállítani, kereskedelmi forgalomban készen nem kapható. Manapság a Ca^{2+} ionok enzim inhibitor hatásának kiváltására Zn^{2+} ionokat is sikeresen alkalmaznak.

Más, algináthoz hasonló, gél képződésre hajlamos polimereket alkalmaznak fehérjék immobilizálására, ilyen például a kitozán és a karragén. A kitozán egy részlegesen dezacetilezett kitin, a karragén pedig tengeri vörösmoszat eredetű poliszaharid-szulfátészter (10. ábra).



10. ábra: Természetes gél képző polimerek

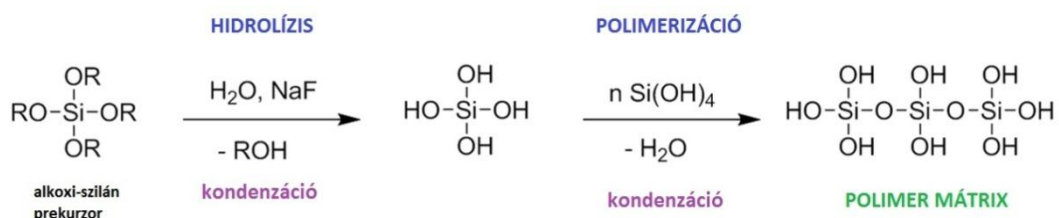
Alginátokat és más természetes polimereket fehérjék mikrokapszulázása során is gyakran alkalmaznak, melyek terápiás felhasználása is egyre elterjedtebb [31]. Az eljárás során a fehérjéket körülbelül 300 μm átmérőjű kapszulákba zárják, amelyeket áteresztő membrán határol. A membrán a protein molekulákat visszatartja, de a szubsztrátok ki-be áramlását nem gátolja. Alapvetően két típusú mikrokapszula létezik. Az egyik folytonos polimer membránnal rendelkezik, a másik típusnál pedig nem állandó koacervátumok vannak jelen. Mindkét esetben nagy fajlagos felület érhető el ($\sim 2500 \text{ cm}^2 / \text{cm}^3$ fehérje oldat). Ennek köszönhetően viszonylag nagy reakció sebességek érhetőek el, noha a polimer membrán diffúziós gátat szab.

2.7. Szol-gél mátrixba záras

A szol-gél rendszerekről már az 1800-as évekből is találhatóak publikációk, de jelentősebb érdeklődésre csak az 1900-as évektől tett szert a terület [32].

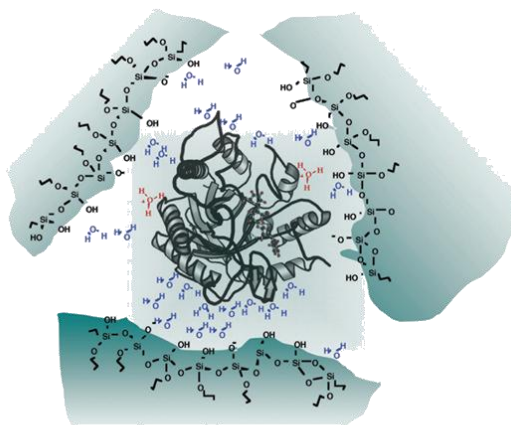
Felhasználásukat tekintve igen sokrétűek, a szol-gél rendszerek alkalmazhatóak kémiai és bioszenzorokban, elektródokban, immuno adszorbenseknél, környezetvédelmi és biotechnológiai területen is. Az eljárás extrém körülmények nélkül, homogén, nagy tisztaságú, stabil terméket ad, ennek köszönhető, hogy számos területen nagy jelentőséggel bír.

A szol-gél eljárás két lépésből áll: az első lépésben stabil kolloid rendszert (szolt) állítanak elő a prekursor molekulák sav- vagy báziskatalizált hidrolízisével. A második, kondenzációs lépés végére egy még jelentős folyadékmennyiséget tartalmazó polimer mátrix képződik, amely a megfelelő szárítási eljárások után éri el végső, felhasználásra alkalmas, szilárd állapotát. A szol-gél rendszerek, legelterjedtebb prekursorai az organoszilán molekulák, jellemzően alkoxi-szilánok, amelyeknek számos származéka széles körben elérhető.



11. ábra: A szol-gél eljárás folyamata

A szol-gél rendszerekben történő enzim rögzítés során az enzimet az első lépésben, az éppen kialakuló szolhoz adják hozzá [32, 34]. A folyamat során az enzim egy bizonyos konformációban rögzül, vagyis szerkezete „megfagy”, amely nagymértékben meghatározhatja katalitikus működését (12. ábra). Ebből következik, hogy a szol-gél folyamat körülményei, paraméterei nagyban befolyásolhatják az enzim végső biokatalitikus képességeit [33, 34].



12. ábra: A szol-gél mátrixban történő enzimrögzítés folyamata

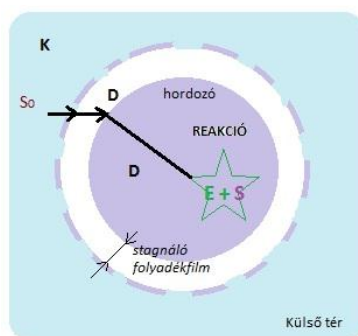
Az eddigi kutatások, eredmények azt engedik feltételezni, hogy a polimer mátrix összetétele kulcsfontosságú lehet a benne rögzített enzim aktivitásának, szelektivitásának alakulásában [4, 33, 34].

2.8. Rögzített enzimes rendszerek kinetikája

A rögzített enzimes rendszerek olyan speciális heterogén rendszerek, ahol az átalakítandó szubsztrátnak a katalizátor szemcséjének felületére és belsejébe kell diffundálnia, a keletkezett terméknek pedig egy ellentétes irányú transzportfolyamaton kell végbemennie (13. ábra). Mindkét esetben koncentrációgradiens alakul ki a termékre és szubsztrátra nézve a folyadék főtömege és a reakció tényleges helye között. E gradiens pedig a diffúziós folyamatok hajtóereje.

Három jól megkülönböztethető transzportrégióról beszélhetünk.

- A szubsztrát transzportja a folyadék főtömegéből a rögzített katalizátor felületén stagnáló folyadékréteghez. Ezt a fázist jó keveredés jellemzi, és nem kell sebesség meghatározó ellenállással számolni.
- Diffúzió a stagnáló folyadékfilmen keresztül a részecske felületére.
- Diffúzió a részecske belsejébe, a reakció tényleges helyére, az enzim a részecske belsejében rögzített.



13. ábra: Anyagátadási viszonyok a rögzített enzimszemcséknél

Az első két transzport a külső anyagátadási ellenállás, amely nagysága befolyásolható a reakcióközeg mechanikai mozgatásával (pl. keverés a reaktorban), de figyelembe kell venni a keverés roncsoló hatását a hordozó és a felületén rögzített fehérje esetében is. A harmadik fázisra a belső anyagátadási ellenállás jellemző, melynek nagysága függ a hordozó alakjától, az enzim homogenitásától a hordozórészecskén belül, a pórusokon belüli molekuláris diffúzió gátlásának mértékétől és a hordozószemcse külső felületénél esetleg lévő további diffúziós határréteg(ek)től [22].

2.9. Lipázok

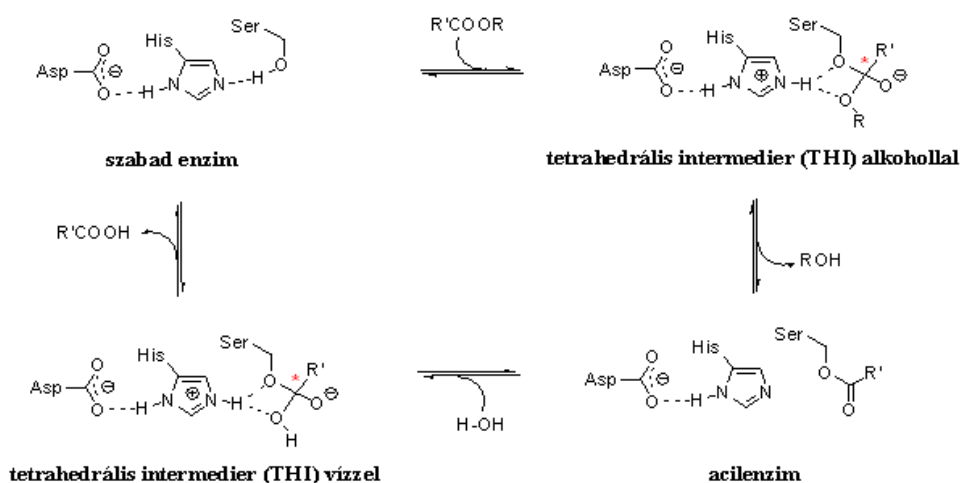
A lipázok a legszélesebb körben alkalmazott enzimek. Biotechnológiai szempontból jelentősek, az enzimtechnológia területén is vezető szerepet játszanak. Elsősorban a glicerinnel zsírsavakkal képzett hármassztereket, a triglicerideket hidrolizálják glicerinné és zsírsavakká, de emellett katalizálhatnak észterezési, acilezési reakciókat is [35]. A lipázok relatív szubsztrátum-fajlagosságú enzimek, így a zsírsavak közötti szerkezeti különbségek ellenére lényegében valamennyi zsíradék lebontására képesek. Megtalálhatók az emlősök májában, a ricinusmagban, továbbá egyes penészgombák és baktériumok anyagcseretermékei között egyaránt [36]. A különböző eredetű lipázok aktivitása szubsztrátumonként eltérő, de valamennyi megegyezik abban, hogy hatásukat emulziókban, a zsír- és víz határfelületén fejtik ki legjobban, ebből a szempontból az általuk katalizált folyamat heterogén katalízisnek minősül. A legtöbb lipáz szerves cseppecske vagy micella nélkül gyakorlatilag inaktív, természetes szubsztrátjaik lipofil karakterűek. Csak szerves oldószeres vagy csak vizes közegben is alkalmazhatóak. A megfelelő feltételek mellett a reakcióközeg víztartalmával befolyásolható a katalízis iránya. Kevés vizet tartalmazó (vagy vízmentes) közeg az észterezési reakcióknak, míg a vizezebb közeg a hidrolízisnek kedvez, de részolválásnál például előnyös lehet egymással nem elegyedő racém szerves savakból álló kétfázisú rendszer választása is [37]. A lipázok

aktivitása általában lúgos közegben maximális. Optimális pH-juk 7,0-8,8 érték között van. Hőmérsékleti optimumuk 30 - 40°C.

A lipázok aktív centrumának hidrofób kötésre alkalmas régiójának két része különböztethető meg, az úgynevezett hidrofób zseb és az alagút. E két rész képes befogadni a neutrális zsírok zsírsav oldalláncait, valamint hosszabb szénláncú alkoholoknál az alkohol oldalláncát is.

Az enzim hidrofób kötő régiójában az alkohol és acil molekularészletek kötőhelyei átfedhetnek egymással [38, 39].

A lipázok működése (ábra) során a szerin nukleofil támadással addicionál az észtercsoport karboniljára. Ezt követően a kilépő alkohol távozásával alakul ki az acil-enzim, amely ezután a belépő alkohollal tetrahedrális intermediert (THI) képez [38], amely átmenetileg új asszimmetria centrum kialakulását okozza.



14. ábra: Lipázok működési mechanizmusa

2.9.1. Lipáz AK

A *Pseudomonas fluorescens* törzsből izolált lipáz 476 aminosavból áll, 50 kDa molekulatömegű enzim. Különféle enzimrögzítési technikákban felhasználható (adszorpció, keresztkötés, szol-gél rögzítés és ezek kombinációja), a lipázok sokoldalúsága miatt lúgos pH-n és anionos felületaktív anyagok jelenlétében is alkalmazhatók különböző hosszúságú zsírsavak hidrolízisére [40, 41].

2.9.2. CaL B

A *Candida antarctica* B lipáz 324 aminosavból épül fel, 35 kDa molekulatömegű enzim. Kedvező tulajdonságai (pH és hő tűrés, megfelelő minőségű termék és kevés melléktermék képzése) révén széleskörűen alkalmazható lipáz. Regió- és sztereospecifikus reakcióban is felhasználható mind a hidrolízist, mind a szintézist tekintve. Acilezési reakcióknál szubsztrátként többféle anyagot, például alkoholokat, aminosavat is képes hasznosítani, beleértve a természetes eredetűeket [42, 43].

A kiválasztott lipázok robusztus szol-gélben rögzített formája ideális biokatalizátor lehetne olyan biotranszformációkban, mint például racém alkoholok szakaszos és folyamatos üzemű rendszerben végzett kinetikus reszolválása.

2.10. Kísérlettervezés

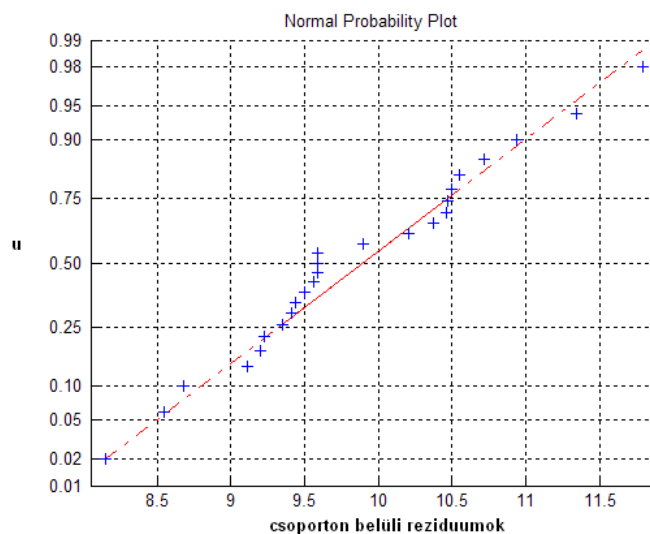
A kísérletek tervezésének általános értelemben vett célja minden esetben az, hogy a vizsgálat tárgyát képező objektumról közvetlenül vagy közvetve hasznosítható információt szerezzünk. A megismerés tárgya sokféle lehet: egy rendszer, egy folyamat, egy berendezés stb. Azonban, bármilyen objektummal álljunk is szemben, a kísérletek célszerű megtervezése, azok végrehajtása és kiértékelése nem egyszerű, hiszen olyan rendszereket tételezünk fel, melyek működése sokféle tényező (faktor) hatásának függvényeként értelmezhető [44].

A változók minőségi és mennyiségi jellegűek is lehetnek. Minőségi skálának nevezzük a névleges (nominal) és sorrendi (ordinal) skálát, mennyiségi skálának pedig az intervallum (interval) és az arányos (proportional) skálát. Ha a független változónk mennyiségi jellegű, a kísérleti adatok feldolgozására a varianciaanalízis és a regresszióanalízis egyaránt használható. Az eredmények értékelése során föl kell tételeznünk, hogy a függő változó normális eloszlású és állandó varianciával (σ_y^2) rendelkezik. Ha az adatok nem normális eloszlásúak, a kísérleti terv ugyan végrehajtható, de a hatások szignifikanciájának vizsgálata és hasonló statisztikai elemzések ekkor megalapozottan nem végezhetők t-próbákkal.

A reziduumok vizsgálata

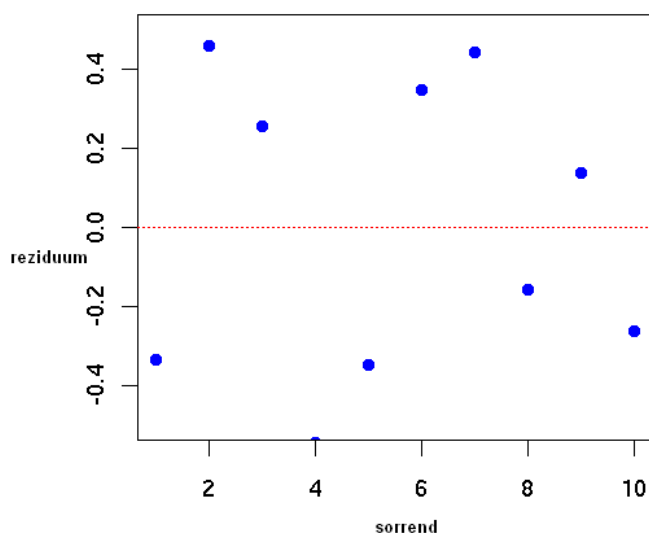
Azt, hogy az eloszlás normális eloszlásúnak tekinthető-e, úgy állapíthatjuk meg, hogy a mért és számított értékek különbségeire, az ún. reziduumokra Gauss ábrát készítünk, vagyis a vízszintes tengelyen lévő reziduumok függvényében ábrázoljuk a kumulált

relatív gyakoriságukhoz, mint valószínűséghez az u -eloszlás táblázatából kiolvasott u értékeket.



15. ábra: Gauss hálós ábra (normal probability plot)

Ellenőrizni kell azt is, hogy a reziduumok a kísérletek elvégzésének sorrendjében mutatnak-e rendszerességet, erre szolgál a 16. ábra. Az ábrán nem tapasztalunk rendszerességet.



16. ábra: A reziduumok a kísérletek elvégzésének sorrendjében

Az optimalizáló kísérlettervezés olyan speciális optimalizálási feladatnak tekinthető, amelyben az optimalizálandó függvény nem ismert. A független változóknak az optimális működés tartományát jellemző értékeit keressük. Az ismertető módszerek a

változókat egyszerre változtatják, így egy-egy kísérlet minden változó hatásáról nyújt információt. Ipari-technológiai és laboratóriumi problémáknál, a kísérlettervezés folyamatának minden lépésében a következő kísérletek optimális megtervezéséhez felhasználjuk az addig rendelkezésünkre álló ismereteket az objektumról. Minél több az előzetes ismeretünk, annál hatékonyabb a további kísérletezés.

A független változókat faktoroknak nevezzük, beállítási értékeit pedig szinteknek. Feltételezzük, hogy ezeket a szinteket pontosan be tudjuk állítani, ami azt jelenti, hogy a beállítási bizonytalanság elhanyagolható abban az intervallumban, amelyen az értékeket változtatjuk.

Mennyiségi faktorok vizsgálata esetén célszerű a terv centrumában is méréseket végezni, mert egyrészt, az ismétlés nélkül végrehajtott terv esetén a centrumban végzett mérések lehetőséget adnak a σ_y^2 variancia becslésére, másrészt ez az illesztett modell ellenőrzésére is szolgál. Az y függő változó mennyiségi faktoroktól való függése egy felület. E felület pontos és egész tartományra kiterjedő megismerését nem akarjuk és nincs is rá szükség. Információt kaphatunk viszont a felület kritikus pontjairól (minimum, vagy maximum), a függvény meredekségéről, érzékenységéről.

3. Kísérleti rész

3.1. Felhasznált oldószerek, vegyszerek, anyagok:

A felhasznált vegyszerek és oldószerek a Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, Alfa Aesar és Molar Chemicals termékei: racém 1-feniletanol (*rac-1a*) és 2-oktanol (*rac-1b*), nátrium-fluorid (NaF), polietilén-glikol 1000 (PEG), tetraetoxiszilán (TEOS), dimetil-dietoxiszilán (DMDEOS), fenil-trietoxiszilán (PTEOS), oktil-trietoxiszilán (OTEOS), 2-propanol (IPA) és vinil-acetát, nátrium-klorid (NaCl), trisz-(hidroximetil)-amino-metán (TRIS), nátrium-foszfát-monohidrát, dinátrium-foszfát-heptahidrát, Triton-X 100, Bovine Serum Albumin (BSA), BioRad Protein assay kit (Bradford reagents).

Oldószerek: n-hexán, diklórmétán, t-butil-metil-éter.

3.1.1. Biokatalizátorok

A rögzítéseket a következő enzimekkel végeztem:

- Lipáz AK (*Pseudomonas fluorescens* lipáz, Sigma–Aldrich Cat. No 534730).
- CaL B (*Candida antarctica* B lipáz, Sigma-Aldrich Cat. No L3170).

3.2. Szol-gél immobilizálás

A rögzítéshez bemértem 390 µl TRIS-HCl puffert (0,05M, pH:7,5), 200 µl izopropanolt és 200 µl PEG oldatot (4%) egy 20 ml-es mintatartó üvegbe, majd 5 percen keresztül rázógépen kevertettem (600 rpm) szobahőmérsékleten.

Ezután folyamatos kevertetés mellett hozzáadtam az enzimet (Lipáz AK: 50 mg, vagy folyékony CaL B:50 µl), a megfelelő szilán komponenseket (3. táblázat), majd a 100 µl NaF-oldatot (1M). A polimerizáció teljessé tételéhez az elegyet 24 órán keresztül rázógép segítségével szobahőmérsékleten homogenizáltam, miközben végbement a gélesedés.

A kész preparátumot üvegszűrőn 7 ml IPA-val, 5 ml desztillált vízzel, 5 ml IPA-val, végül 5 ml hexánnal mostam. Az így kapott preparátumot 24 órán keresztül szobahőmérsékleten szárítottam és tároltam.

3.3. Biokatalizátorok tesztelése

A biokatalizátorokat az aromás szekunder alkohol, racém 1-feniletanol (*rac-1a*), valamint az alifás racém 2-oktanol (*rac-1b*) kinetikus reszolválásában teszteltem. A reakciókat 4 ml-es légmentesen lezárt reakcióedényben végeztem, melybe 25 mg rögzített

biokatalizátort, 50 mg szubsztrátot (*rac-1a* vagy, *rac-1b*), 100 µl vinil-acetátot és 1 ml hexán:MTBE 2:1 arányú elegyét mértem be, majd temperált rázógépre helyeztem 30 °C-on (1200 rpm).

1, 2, 4 óra elteltével közvetlenül a reakcióelegyből 50 µl mintát vettem, amelyet DKM-nal 1 mg/ml töménységre hígítottam. Az így kapott mintákat királis állófázisú gázkromatográfiás módszerrel elemeztem.

3.4. Biokatalizátorok hőstabilitásának vizsgálata

A biokatalizátorokat (25 mg) szerves közegben (1 ml vízmentes toluol) 2 órán át hőstressznek vettem alá adott hőmérsékleteken (30, 50, 70, 90, 110°C). Hő közvetítő közegként olajfürdőt alkalmaztam, amelyet Heidolph MR 3001 fűthető mágneses keverővel és a hozzá tartozó Heidolph EKT 3001 típusú hőmérsékletszabályozó egységgel temperáltam a kívánt hőmérsékletűre. A közeg ellenőrzött visszahűlését követően (minden esetben szobahőmérséklet) a biokatalizátorokat *rac-1*- kinetikus reszolválásban vizsgáltam a 3.3. pontban leírtaknak megfelelően, de oldószerként toluolt alkalmaztam.

3.5. Biokatalizátorok visszaforgathatóságának vizsgálata

A biokatalizátorokat a 3.3. pontban leírtaknak megfelelően teszteltem, majd 2 óra elteltével a reakcióelegyből kiszűrtem (G4-es üvegszűrőn), majd n-hexánnal háromszor átmostam. 1 órás szárítás után (szobalevegő) a visszanyert biokatalizátrok pontos tömegét visszamértem, majd megismételtem a tesztreakciót a 3.3. pontban leírt komponensek arányainak pontos betartásával (biokatalizátor/*rac-1a*/vinilacetát/n-hexán:MTBE 2:1 = 1/2/4/40). Ily módon a visszaforgatást 3 ciklusban végeztem el.

3.6. Stabilitás vizsgálat felületaktív anyaggal szemben

50 mg enzimkészítményt 2,5 ml TRX 100-at tartalmazó (2 % V/V) foszfát-pufferben (0,1 M, pH= 7,5) 2 órán át rázattam szobahőmérsékleten, ezután a mintákat addig mostam vízzel, amíg nem képződött tovább hab, majd 5 ml IPA-val és 5 ml n-hexánnal mostam őket. A kiszáradásuk után a mintákat a 3.3.-as pontban leírtak szerint a *rac-1*-a kinetikus reszolválásában teszteltem. A vizes mosófolyadékba kioldódott fehérjék mennyiségét Spectronic Genesys 2 típusú UV-spektrofotométer segítségével vizsgáltam. A fehérjék mennyiségi meghatározására BioRad Protein Assay (Bradford-reagenst) használtam, amely egy trifenilmetán-alapú festéket (Coomassie Brilliant Blue G 250) tartalmaz. Ez a

festék a proteinhez kötődve abszorbancia-változást szenved, a barnás-vöröses oldat fehérje jelenlétében megkékül. Az abszorbancia változás arányos a megkötött fehérje koncentrációjával, így az oldat fehérjetartalma becsülhető.

3.7. Alkalmazott analitikai módszerek

GC:

A gázkromatográfiás méréseket Agilent 4890D készülékeken végeztem, Hydrodex- β -6-TBDM (25m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 mm film, t-butil-dimetilszililezett β -ciklodextrin; Macherey&Nagel), enantiomerszelektív királis állófázist tartalmazó kolonnával. Vivőgázként hidrogént használtam (fejnyomás 0,83 bar, lefúvatási arány 50 : 1). Az injektor és a FID detektor hőmérséklete: 250°C. Hőmérsékletprogram:

rac-1a: 120°C izoterm, 8 perc. Retenciós idők (tR): (S)-1-feniletacetát: 4,13 perc; (R)-1-feniletacetát: 4,65 perc; (R)-1-feniletanol: 6,10 perc; (S)-1-feniletanol: 6,44 perc.

rac-1b: 50-150°C felfűtési sebesség 10°C/min. Retenciós idők: racém oktanol: 6,73 perc; (S)-2-oktanol-acetát: 6,96 perc; (R)-2-oktanol-acetát: 7,51 perc.

A reakciók követéséhez a szükséges mintákat közvetlenül a reakcióelegyből vettem, majd diklórmétánnal hígítottam a megfelelő koncentrációra (1-2 mg mL⁻¹). A kromatogramok kiértékeléséhez referenciaként a tiszta alkohol és acetát retenciós időit használtam.

UV-VIS:

A fehérje mennyiségét Spectronic Genesys 2 típusú UV-spektrofotométer segítségével vizsgáltam. Hullámhossz: λ = 595 nm, T = 21 °C.

SEM:

L JSM JEO -5500LV SEM-EDS készülék: Pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) energiadiszperzív analízátorral (EDS/EDX/EDAX) és környezeti (ESEM) üzemmóddal, mely energiadiszperzív röntgen-analízátorral (energy dispersive spectroscopy – EDS, energy dispersive X-ray analysis – EDX/EDAX) is fel van szerelve.

4. Eredmények és értékelésük

A kutatócsoport már korábban is foglalkozott lipáz enzimek szol-gél rögzítésével. Vizsgálták a polimer mátrixot kialakító szilán prekursorok hatását az enzim biokatalitikus képességeire. Az eredmények azt mutatták, hogy a tetraetoxiszilán ($\text{Si}(\text{OEt})_4$, TEOS) és el nem hidrolizáló alkil/aril csoportokat tartalmazó származékainak (R-TEOS) kombinálásával a rögzített enzim aktivitása fokozható [4, 45, 46, 47, 48]. A korábban vizsgált számos organoszilán prekursor közül a fenil-trietoxiszilán (PTEOS), az oktil-trietoxiszilán (OTEOS) és a dimetil-dietoxiszilán (DMDEOS) tartalmú szol-gél rendszerek bizonyultak a legsikeresebbnek [4, 45]. Ezeket az eredményeket figyelembe véve munkám során az előbb említett prekursorokból felépített terner (három különböző prekursorból álló) szol-gél rendszerek szisztematikus finom hangolását vizsgáltam.

Munkám alapvető célja olyan, későbbiekben jól általánosítható szol-gél mátrix rendszerek kifejlesztése, amellyel a rögzített enzimes rendszer sajátosságai adott enzimszubsztrát pároshoz igazíthatóak. Az általánosítható módszer alkalmazásával tehát megállapítható egy adott enzim – szubsztrát pár esetén az ideális mátrix összetétel.

A terner szol-gél rendszer viselkedésének megismeréséhez, optimálásához kísérlettervezési modellt alkalmaztam. Az optimálandó objektum a szol-gél mátrixot kialakító prekursorok elegyösszetétele volt. A rendszer működése nagyon leegyszerűsítve úgy képzelhető el, mintha egy többváltozós matematikai függvény (ún. célfüggvény) lenne: pl.: $Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + \dots$, ahol Y az általunk meghatározott függő változó (pl. a biokatalitikus aktivitás), x_i független változók vagy faktorok, amelyekről Y értéke függ (pl. hőmérséklet, molarány). Amennyiben e matematikai modellt optimálásra kívánjuk felhasználni, a célfüggvény függő változójának maximumát keressük, melyhez a faktorok e szempontból optimális beállítási értékei (faktorok szintjei) tartoznak.

Annak érdekében, hogy megkapjuk a legjobb kísérlettervet, definiálni kell a faktorok számát és nevét, a függő változókat valamint a rendszer fizikai megvalósíthatóságának alsó és felső határait (Statistica program alkalmazásával). A kísérlet során alkalmazott faktorok a szol gél mátrix felépítésében résztvevő organoszilán prekursorok (TEOS, DMDEOS, OTEOS, PTEOS) molaránya volt, mivel ezektől várható a legnagyobb hatás a készítmény biokatalitikus tulajdonságaira. A függő változók pedig a biokatalitikus aktivitás és a szelektivitás értékei. A rendszer fizikai korlátait a gélképzés szempontjából domináns prekursor a TEOS mennyisége szabja meg. Korábbi eredmények alapján,

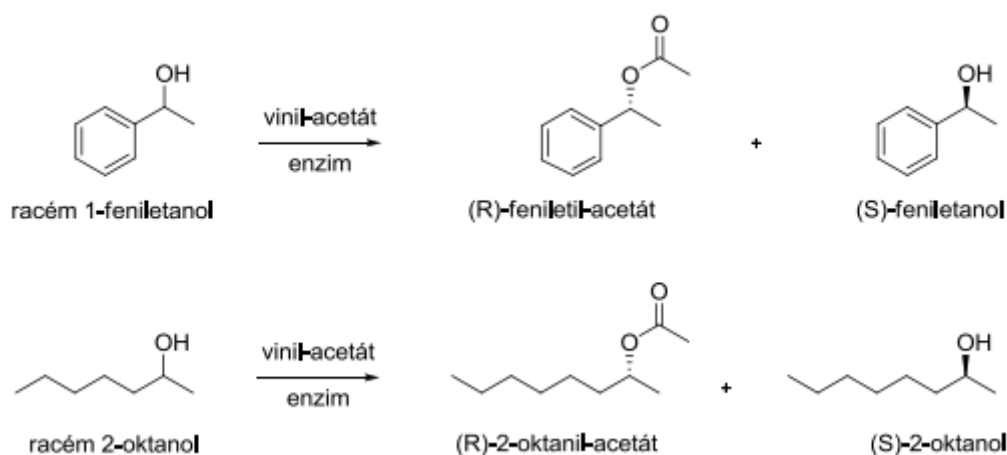
sikeres mátrix képződéshez a TEOS minimális mennyisége 12 n/n % az összes prekursor mennyiségre nézve. Ezt figyelembe véve a terner prekursor rendszer másik két komponens felső határa csak 88 n/n % lehet. A három faktor, a korlátok valamint a szoftver által választható lehetőségek miatt a polinom fokát 3-nak vettem, a pontosabb eredmény elérése céljából pedig a centrumot kétszer is vizsgáltam, így végül 14 kísérleti pontot kaptam. Ezeket a pontokat a következő táblázat mutatja be:

Kísérleti pont	TEOS [n/n]	B [n/n]	C [n/n]
AUGMENTED 1	1,000	0	0
AUGMENTED 2	0,120	0,880	0
AUGMENTED 3	0,120	0	0,880
AUGMENTED 4	0,413	0,587	0
AUGMENTED 5	0,413	0	0,587
AUGMENTED 6	0,120	0,293	0,587
AUGMENTED 7	0,707	0,293	0
AUGMENTED 8	0,707	0	0,293
AUGMENTED 9	0,120	0,587	0,293
AUGMENTED 10	0,413	0,293	0,293
AUGMENTED 11	0,707	0,147	0,147
AUGMENTED 12	0,267	0,587	0,147
AUGMENTED 13	0,267	0,147	0,587
AUGMENTED 14	0,413	0,293	0,293

2. táblázat: AUGMENTED kísérleti terv

Ahogy a 2. táblázatban is látható, a 14 pontos „AUGMENTED” kísérletterv esetén a molarányok összege mind a 14 pont szerint 1-et ad. A terv során a polimer mátrix prekursorok hármas elegyét a TEOS (A) mellett, a másik két (B és C) prekursorból alakítottuk ki. B és C komponensként egy modellbe három igen eltérő karakterű organoszilán, a PTEOS, OTEOS, DMDEOS közül kettőt kiválasztva végül három különböző terner rendszert (TEOS/DMDEOS/PTEOS, TEOS/DMDEOS/OTEOS és TEOS/PTEOS/OTEOS) állítottunk fel és vizsgáltuk a kísérletterv 14 pontján.

Az így kapott szol-gél rögzített lipázok képességeinek vizsgálatához, vagyis a kísérletterv különböző pontjainak összehasonlításához, az enzimkészítményeket kinetikus rezolválásokban teszteltem. Enzimatikusan átalakítandó modell vegyületként egy aromás és egy alifás racém szekunder alkoholt, a racém 1-feniletanolt (*rac-1a*) és a racém 2-oktanolt (*rac-1b*) alkalmaztam (17. ábra).



17. ábra: Az 1-feniletanol és a 2-oktanol kinetikus reszolválása

A tesztreakciókból meghatározott kiindulási anyag és termék koncentrációkból kiszámíthatóak a rendszer legfőbb biokatalitikus paraméterei, úgy mint a konverzió (c), az enantiomertisztaság (ee), az enantiomerszelektivitás (E), valamint a biokatalizátor aktivitás (UB) (Eredmények: Függelék).

4.1. Turner szol-gél rendszerek hatása a CaL B enzim biokatalitikus képességeire

A CaL B enzimet a fent ismertetett módon immobilizáltam különböző turner összetételű szol-gél mátrixokban. A TEOS/PTEOS/OTEOS, a TEOS/DMDEOS/OTEOS és a TEOS/DMDEOS/PTEOS mátrixokba zárt enzimmészítményeket az AUGMENTED kísérletterv mind a 14 pontjában sikeresen elkészítettem, majd ezek enzimatis aktivitását az aromás jellegű *rac*-1a és az alifás *rac*-1b szubsztrátokon vizsgáltam.

A komponensek kiválasztásánál azzal a kezdeti feltételezéssel éltünk, hogy a PTEOS tartalmú szol-gél mátrixba rögzített enzim nagyobb affinitással alakítja át a feniletanolt, míg az OTEOS tartalmú mátrixba rögzített enzim jobb a 2-oktanolhoz, tehát aromás az aromáshoz, alifás az alifáshoz.

4.1.1. CaL B enzim immobilizálása TEOS/OTEOS/PTEOS turner prekursor elegyből felépített szol-gél rendszerekben

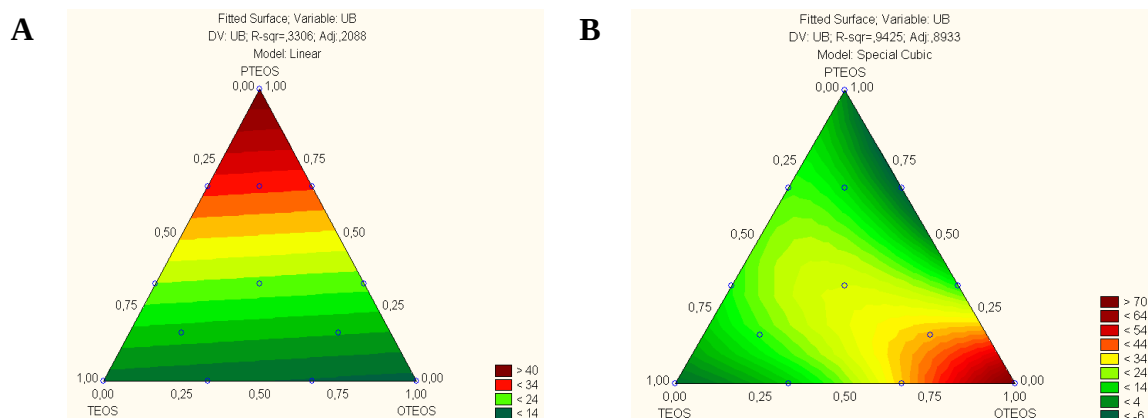
A kísérlettervezés során a rendszerre illesztett matematikai modellben a függő változóra számított (U_B) értékeket mindkét szubsztrát molekulára megadtam, majd a Statistica programmal meghatároztam a rendszer viselkedésének szignifikáns paramétereit (18. ábra, pirossal jelölve).

A	Factor	Coeff.	Std. Err.	t(11)	p	-95, % Cnf. Limt	+95, % Cnf. Limt
	(A)TEOS	14,95356	8,772069	1,704679	0,116299	-4,35363	34,26076
	(B)OTEOS	13,13818	8,772069	1,497729	0,162339	-6,16901	32,44538
	(C)PTEOS	41,93350	8,772069	4,780343	0,000571	22,62630	61,24069

B	Factor	Coeff.	Std. Err.	t(7)	p	-95, % Cnf. Limt	+95, % Cnf. Limt
	(A)TEOS	-1,715	6,0409	-0,28396	0,784657	-16,000	12,5691
	(B)PTEOS	2,308	6,0409	0,38213	0,713702	-11,976	16,5928
	(C)OTEOS	71,259	6,0409	11,79618	0,000007	56,975	85,5437
	AB	82,427	28,9285	2,84934	0,024712	14,022	150,8324
	AC	-50,556	28,9285	-1,74762	0,124024	-118,961	17,8492
	BC	-138,589	28,9285	-4,79073	0,001987	-206,994	-70,1837
	ABC	435,226	166,3154	2,61687	0,034566	41,952	828,4989

18. ábra: Szignifikáns paraméterek a TEOS/PTEOS/OTEOS terner szol-gél rendszerek biokatalitikus aktivitására aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

Az aromás *rac-1a* szubsztrát esetén, csak az aromás jellegű prekuzornak, a PTEOS-nak volt szignifikáns hatása, a prekuzorok közti kölcsönhatásnak azonban nem, így a modell lineárisra egyszerűsíthető (18. ábra, A). A másik, alifás szubsztrát esetében viszont nem élhetünk ezzel az egyszerűsítéssel, mivel ott a kölcsönhatásoknak is szignifikáns hatásuk van, így arra köbös modell illeszthető (18. ábra, B). Ennek ismeretében vizsgálható a faktorok (prekuzor összetétel) hatása a rögzített CaL B biokatalitikus aktivitására, mint függő változóra nézve.



19. ábra: TEOS/OTEOS/PTEOS terner szol-gél rendszerben rögzített CaL B biokatalitikus aktivitása aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

A háromszög diagramok csúcsai az egyes prekuzorok mennyiségét jelölik. Egyértelműen látszik, hogy ugyanazon komponensekből felépülő polimer háló esetén a CaL B enzim biokatalitikus aktivitására az aromás jellegű, *rac-1a* szubsztrát esetén a

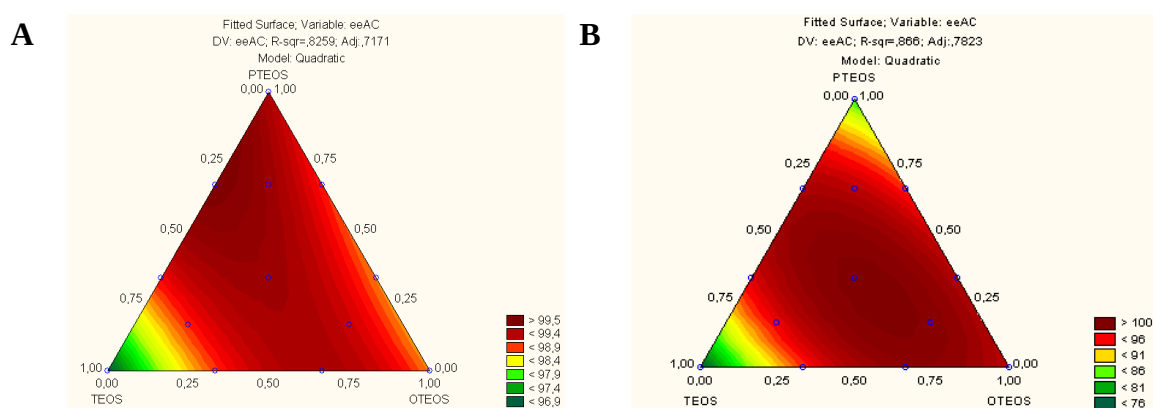
PTEOS mennyiségének van domináns hatása, míg az alifás, *rac-1b* szubsztráton vizsgálva az OTEOS mennyisége mutatja a legjelentősebb hatást (19. ábra).

Az enzimkatalizált folyamatok kulcsfontosságú jellemzője az aktivitás mellett a reakció során képződő termék enantiomertisztasága (ee_{AC}). Az U_B függőváltozóhoz hasonlóan, itt is meg kell állapítani a szignifikáns paramétereket (20. ábra). Mindkét szubsztrát esetében (20. ábra A és B) másodfokú modellt választottam, az egyes faktorok kölcsönhatásai miatt.

A	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(8)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	(A)TEOS	96,86424	0,390142	248,2796	0,000000	95,96457	97,7639
	(B)OTEOS	98,67164	0,390142	252,9123	0,000000	97,77197	99,5713
	(C)PTEOS	99,40299	0,390142	254,7869	0,000000	98,50332	100,3027
	AB	6,25993	1,689385	3,7054	0,005995	2,36420	10,1557
	AC	5,94714	1,689385	3,5203	0,007842	2,05141	9,8429
	BC	-1,03346	1,689385	-0,6117	0,557694	-4,92919	2,8623

B	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(8)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	(A)TEOS	75,84933	3,50052	21,66801	0,000000	67,7771	83,9215
	(B)OTEOS	98,07798	3,50052	28,01810	0,000000	90,0058	106,1502
	(C)PTEOS	84,51182	3,50052	24,14264	0,000000	76,4396	92,5840
	AB	50,18366	15,15790	3,31073	0,010687	15,2295	85,1379
	AC	81,26413	15,15790	5,36117	0,000677	46,3099	116,2183
	BC	23,73021	15,15790	1,56553	0,156090	-11,2240	58,6844

20. ábra: Szignifikáns paraméterek a TEOS/PTEOS/OTEOS terner szol-gél rendszerekben aromás (A: *rac-2a*) és alifás (B: *rac-2b*) termékek enantiomertisztaságára nézve



21. ábra: TEOS/OTEOS/PTEOS terner szol-gél rendszerben rögzített CaL B enantiomertisztasága aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

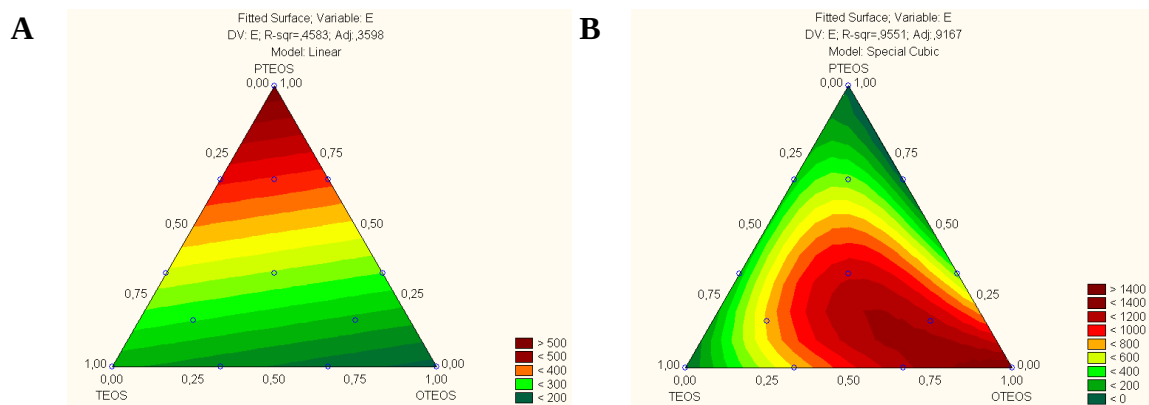
A képződő termék enantiomertisztasága esetén is megfigyelhető, hogy az aromás szubsztrátnál a felület csúcspontja a PTEOS felé tolódik (21. ábra, A), míg az alifás

szubsztrátnál inkább az alifás jelleg (OTEOS) felé (21. ábra, B). Az enzim katalízis során egy adott szubsztrátra vonatkoztatott szelektivitás, nagyban függ az enzim természetétől, így termék enantiomertisztaságának alakulásban, az enzimet körülvevő mátrix jellege, nem érvényesülhet olyan mértékben, mint azt katalitikus aktivitásnál mutatta. Egy rögzített enzim rendszerénél a diffúziós körülményeknek döntő szerep jut, melyet a hordozó anyag fizikai-kémiai karaktere igen erősen befolyásolhat. Ezért az *ee* értékek nem tértek el egymástól számottevően, az egyes kísérleti összetételek egy szűk tartományban fejthetik ki hatásukat, így ez esetben nem nyilvánult meg akkora mértékben a várt hatás.

Mivel a reakció során képződő termék enantiomertisztaságát befolyásolja a konverzió, az nem ad teljes körű képet az rendszer enantiomerszelektivitására nézve. Ennek oka, hogy alacsonyabb konverzióknál, mikor a reakció sebesség még a lineáris tartományba esik, az enzim valóban a preferált enantiomert maximális sebességgel (az általam vizsgált esetekben az *(R)*-acetát) alakítja át, ám a reakció előrehaladtával, a reakciósebesség csökken, így a termék másik enantiomer párja (*(S)*-acetát) mennyisége arányaiban megnő a reakció elegyben. Ennek eredményeképp magasabb konverzió esetén, a kívánt termék gyengébb enantiomertisztaságát láthatjuk, amely valójában nem az enzim katalitikus tulajdonságától függ, hanem a reakció kinetikájától. Egy a konverziótól matematikailag is függő paraméter, az enantiomerszelektivitás (*E*) vizsgálatával már valósabb képet kaphatunk a biokatalizált folyamat enantiomerszelektív jellegéről.

A	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(11)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	(A)TEOS	244,8497	72,34447	3,384498	0,006094	85,6206	404,0788
	(B)OTEOS	191,3506	72,34447	2,644993	0,022789	32,1215	350,5797
	(C)PTEOS	516,0447	72,34447	7,133160	0,000019	356,8156	675,2738
B	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(7)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	(A)TEOS	-2,45	136,214	-0,01800	0,986145	-324,55	319,64
	(B)OTEOS	1400,25	136,214	10,27972	0,000018	1078,15	1722,34
	(C)PTEOS	-28,28	136,214	-0,20762	0,841434	-350,38	293,81
	AB	1062,06	652,303	1,62817	0,147513	-480,39	2604,51
	AC	1169,86	652,303	1,79343	0,115995	-372,59	2712,31
	BC	-2191,06	652,303	-3,35896	0,012102	-3733,51	-648,61
	ABC	16726,21	3750,207	4,46008	0,002936	7858,38	25594,04

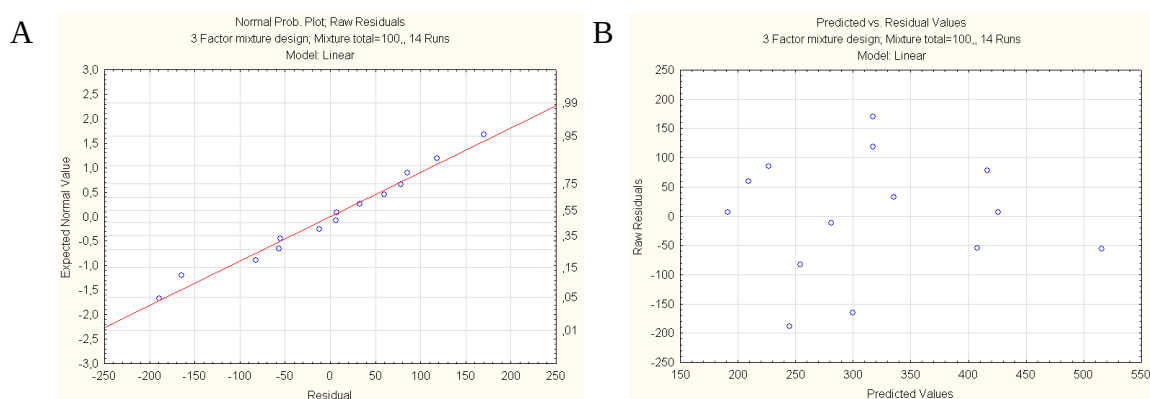
22. ábra: Szignifikáns paraméterek a TEOS/PTEOS/OTEOS terner szol-gél rendszerek enantioszelektivitására aromás (A: *rac-2a*) és alifás (B: *rac-2b*) szubsztrátokon



23. ábra: TEOS/OTEOS/PTEOS terner szol-gél rendszerben rögzített CaL B enantiomerszelektivitása aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztátokon

Az enantiomerszelektivitás, hasonlóan a biokatalitikus aktivitáshoz, már látványosan függ a terner rendszer összetételétől. Az eddig tapasztaltakat követve, az aromás prekursor nagyobb mennyisége egyértelműen kedvező az 1-feniletanol átalakítása során, míg ugyanezt a rendszert a 2-oktanollal vizsgálva, az optimum orientációja megfordul, és az alifás prekursor felé tolódik.

Kísérletek tervezésekor alapvető követelmény az alkalmazott modell eloszlásának és reziduumának vizsgálata, amely során az általam vizsgált változók közül az enantiomerszelektivitást (*E*) választottam, mivel az a konverziótól és az enantiomertisztaságtól is függ, így „rejtve” magában hordozza a másik két változót is.



24. ábra: Az enantiomerszelektivitás eloszlás függvénye - Gauss hálós ábra (A) és reziduuma (B)

Látható, hogy a pontok alapvetően jól illeszkednek az egyenesre, tehát az eloszlás normál eloszlásnak tekinthető (24. ábra, A). A reziduumok pedig a kísérletek elvégzésének

sorrendjében nem mutatnak rendszerességet, tehát a modell alkalmas a rendszer viselkedésének statisztikai elemzésére (24. ábra, B).

A CaL B enzim szol-gélben történő rögzítését egy igen eltérő sajátságú, kétszeresen szubsztituált szilán prekuzort tartalmazó (DMDEOS) terner rendszerben is vizsgáltuk. A két metil csoportot tartalmazó prekuzor várhatóan nem befolyásolja számottevően a mátrix sztérikus jellegét olyan mértékben, mint a nagyobb kiterjedésű aromás gyűrű a PTEOS esetében, valamint a hosszú alifás lánc az OTEOS alkalmazásakor. A kialakuló polimer háló szorosságára azonban jelentős hatással lehet, hiszen csak két -OEt csoportja tud hidrolizálni, majd kötést kialakítani a mátrixban, amely egy feltehetően lazább, átjárhatóbb szerkezetet eredményez.

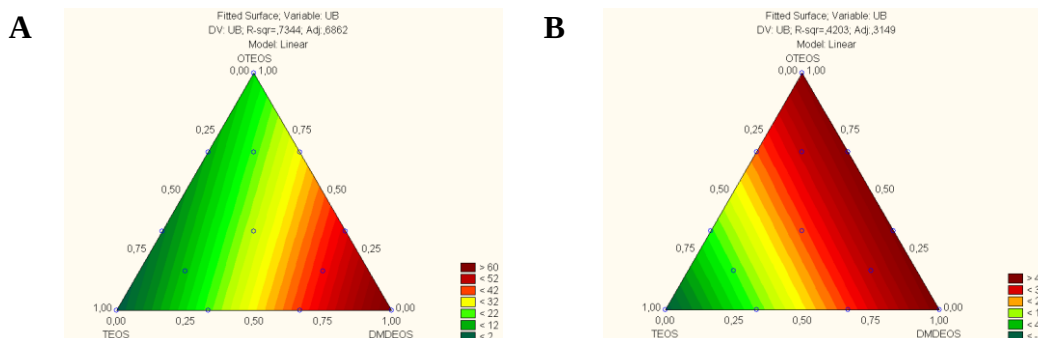
Mivel a DMDEOS prekuzor nem dominál a mátrix aromás/alifás jellegének alakulásában, kvázi inert prekuzorként viselkedik a rendszerben, ám jótékony hatással lehet, így külön külön az oktil és fenil szubsztituált prekuzorral kombinálva vizsgáltuk a fent leírt módon a kísérletterv 14 pontjában. A három terner rendszert összevetve érdekesnek bizonyulhat annak a feltárása is, hogy TEOS/PTEOS/OTEOS terner elegyben egyidejűleg fellépő aromás/alifás jelleg alakulása és az esetleges szinergizmusok hatása mennyiben tér el attól, ha külön terner rendszerekben alkalmazzuk őket.

4.1.2. CaL B immobilizálása TEOS/DMDEOS/OTEOS terner prekuzor elegyből felépített szol-gél rendszerekben

Ennél a prekuzor rendszernél is a korábbi terner elegynél alkalmazott módon jártam el. Az U_B , mint változóra vizsgáltam az egyes faktorok hatását, amelyből kiderült, hogy mindkét szubsztrát esetében is linearizálható a modell, mivel a faktorok hatása egymástól elkülönülve érvényesül, nincs köztük szignifikáns kölcsönhatás (25. ábra).

A	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(11)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	(A)TEOS	0,05351	7,536674	0,007100	0,994463	-16,5346	16,64162
	(B)DMDEOS	62,98672	7,536674	8,357363	0,000004	46,3986	79,57483
	(C)OTEOS	15,54101	7,536674	2,062052	0,063640	-1,0471	32,12912
B	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(11)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	(A)TEOS	-7,31021	13,36935	-0,546789	0,595442	-36,7359	22,11553
	(B)DMDEOS	45,77366	13,36935	3,423777	0,005685	16,3479	75,19940
	(C)OTEOS	42,62858	13,36935	3,188531	0,008629	13,2028	72,05432

25. ábra: Szignifikáns paraméterek a TEOS/DMDEOS/OTEOS terner szol-gél rendszerek biokatalitikus aktivitására aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon



26. ábra: TEOS/DMDEOS/OTEOS terner szol-gél rendszerben rögzített CaL B biokatalitikus aktivitása aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

A terner elegy összetételének hatása az aromás 1-feniletanol esetén a DMDEOS növekedő mennyisége felé halad. (26. ábra, A). Az alifás 2-oktanol (26. ábra, B) reszolválása során a tendencia nem ennyire határozott, itt már az OTEOS jelenlétének is fontos szerepe van. Az aromás szubsztráttal történő reakció során a legkevésbé alifás karakter tűnik az optimálisnak, így a szubsztrát hozzáférhetőségének szempontjából egyértelműen a metil csoportok jelenléte a kedvezőbb az oktil láncokéhoz képest. Az alifás láncú 2-oktanol esetében egy alifás prekursor lánc és hozzá viszonyítva alifás láncnak már nem igazán mondható metil csoportok versenyeznek. A jó biokatalizátor aktivitás eléréséhez szükséges optimális összetételnél az OTEOS is jelentős szereppel rendelkezik a DMDEOS mellett, ahogy ezt az elején feltételeztük.

Az enantiomertisztaságok esetében elmondható, hogy az 1-feniletanollal végzett acilezésnél mindhárom szol-gél alkotónak szignifikáns hatása van, a modell lineáris (27. ábra, A). A 2-oktannal végzett kinetikus reszolválás esetében a komponensek (AC) kölcsönhatásának is szignifikáns hatása van, így a modell másodfokú (27. ábra, B).

A

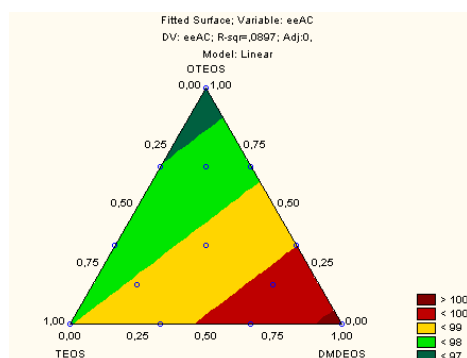
Factor	Coeff.	Std.Err.	t(11)	p	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt
(A)TEOS	97,9781	2,257742	43,39650	0,000000	93,00885	102,9474
(B)DMDEOS	100,2208	2,257742	44,38983	0,000000	95,25153	105,1900
(C)PTEOS	96,5407	2,257742	42,75985	0,000000	91,57146	101,5100

B

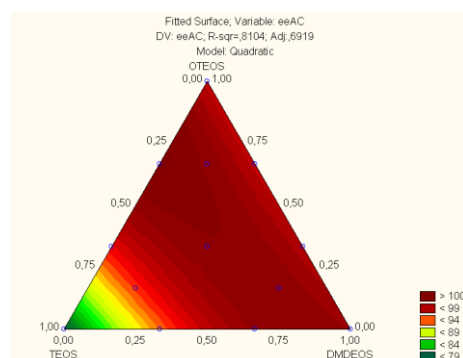
Factor	Coeff.	Std.Err.	t(8)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
(A)TEOS	78,44851	3,39368	23,11605	0,000000	70,6227	86,2743
(B)DMDEOS	99,84780	3,39368	29,42169	0,000000	92,0220	107,6736
(C)OTEOS	97,53115	3,39368	28,73905	0,000000	89,7053	105,3570
AB	33,75157	14,69526	2,29677	0,050726	-0,1358	67,6389
AC	49,56348	14,69526	3,37275	0,009746	15,6761	83,4508
BC	-3,37335	14,69526	-0,22955	0,824199	-37,2607	30,5140

27. ábra: Szignifikáns paraméterek a TEOS/DMDEOS/OTEOS terner szol-gél rendszerek enantiomertisztaságára aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

A



B



28. ábra: TEOS/DMDEOS/OTEOS terner szol-gél rendszerben rögzített CaL B enantiomertisztasága aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

A TEOS/DMDEOS/OTEOS szol-gél rendszerben rögzített CaL B enantiomertisztaságára nézve mindkét alkohol esetén lineárisra egyszerűsíthető a modell, hiszen a faktorok kölcsönhatása nem szignifikáns (29. ábra, A, B).

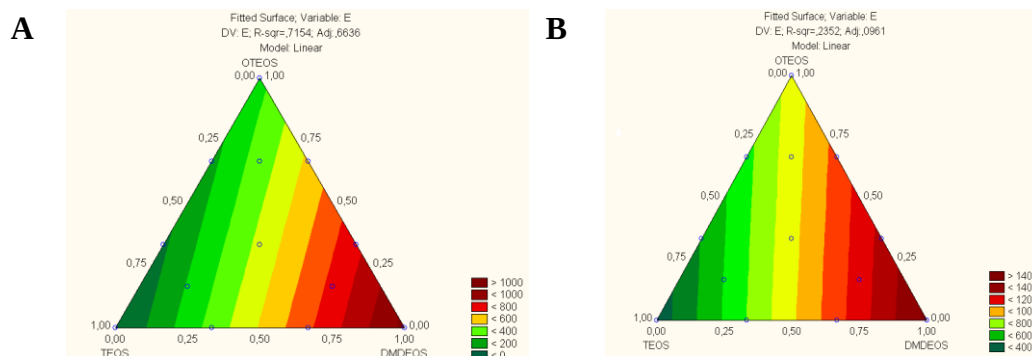
A

Factor	Coeff.	Std.Err.	t(11)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
(A)TEOS	-10,076	129,5749	-0,077763	0,939413	-295,269	275,116
(B)DMDEOS	1028,183	129,5749	7,935043	0,000007	742,990	1313,375
(C)OTEOS	268,227	129,5749	2,070057	0,062767	-16,965	553,420

B

Factor	Coeff.	Std.Err.	t(11)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
(A)TEOS	339,408	375,2759	0,904423	0,385151	-486,569	1165,385
(B)DMDEOS	1427,099	375,2759	3,802801	0,002929	601,123	2253,076
(C)OTEOS	839,387	375,2759	2,236720	0,046970	13,411	1665,364

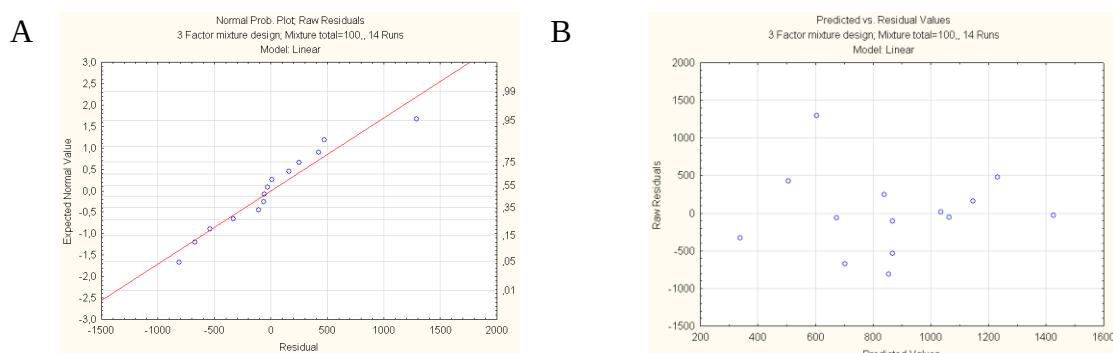
29. ábra: Szignifikáns paraméterek a TEOS/DMDEOS/OTEOS terner szol-gél rendszerek enantiomerszelektivitására aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon



30. ábra: TEOS/DMDEOS/OTEOS terner szol-gél rendszerben rögzített CaL B enantiomerszelektivitása aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

Az enantiomerszelektivitás alakulása a biokatalizátorok aktivitásának jellegével teljesen azonos, amely az ott megállapított okokat támasztja alá.

A terner rendszerre épített kísérletterv statisztikai próbája szintén normális eloszlást mutat és a reziduumok ingadozása is véletlenszerű, tehát a modell alkalmasnak bizonyul a rendszer jellemzésére (31. ábra, A, B).



31. ábra: Az enantiomerszelektivitás eloszlás függvénye - Gauss hálós ábra (A) és reziduuma (B)

4.1.3. CaL B immobilizálása TEOS/DMDEOS/PTEOS terner prekursor elegyből felépített szol-gél rendszerekben

Az előző pontban bemutatott terner szol-gél prekursor elegyben az OTEOS komponenst PTEOS-ra cseréltem, majd a fent leírtaknak megfelelően vizsgáltam

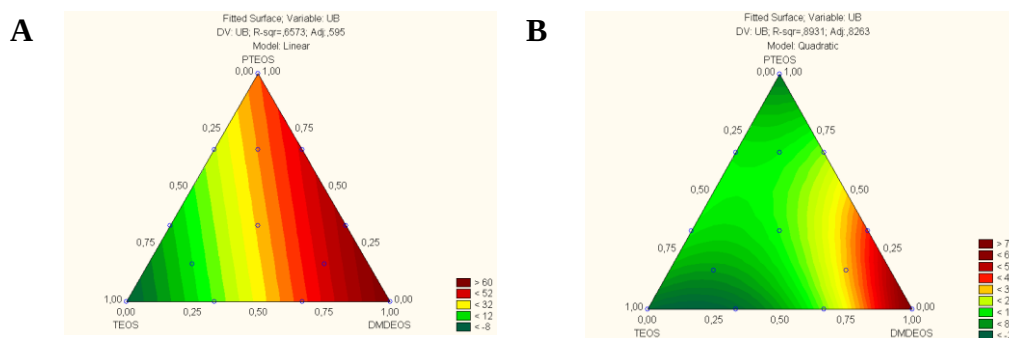
Elsőként az aktivitás értékek szignifikáns paramétereit határoztam meg az alkoholok kinetikus reszolválásából kapott eredmények alapján (32. ábra, A és B). Látható, hogy a *rac-1a* szubsztrátnál nem lép fel a fajok közötti kölcsönhatás, míg a *rac-1b* esetében A

és B faktorok között igen, így az előbbinél lineáris, az utóbbinál pedig másodfokú a modell.

A	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(11)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	(A)TEOS	-9,18551	10,81186	-0,849577	0,413669	-32,9823	14,61124
	(B)DMDEOS	68,27471	10,81186	6,314797	0,000057	44,4780	92,07145
	(C)PTEOS	39,72441	10,81186	3,674151	0,003663	15,9277	63,52115

B	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(8)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	(A)TEOS	0,258	7,70597	0,03352	0,974079	-17,512	18,0283
	(B)DMDEOS	70,262	7,70597	9,11786	0,000017	52,492	88,0320
	(C)PTEOS	2,619	7,70597	0,33991	0,742673	-15,151	20,3894
	AB	-104,353	33,36826	-3,12731	0,014072	-181,300	-27,4057
	AC	70,690	33,36826	2,11848	0,066983	-6,257	147,6374
	BC	-3,604	33,36826	-0,10801	0,916646	-80,552	73,3432

32. ábra: Szignifikáns paraméterek a TEOS/DMDEOS/PTEOS terner szol-gél rendszerek biokatalitikus aktivitására aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon



33. ábra: TEOS/DMDEOS/PTEOS terner szol-gél rendszerben rögzített CaL B biokatalitikus aktivitása aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

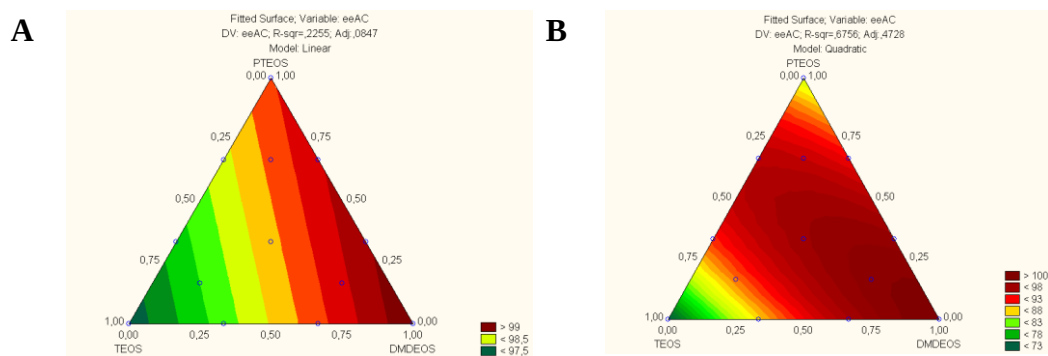
A háromszög diagramok szépen mutatják, hogy a legmagasabb biokatalizátor aktivitás eléréséhez 1-feniletanol esetén a PTEOS jelentősen hozzájárul (33. ábra, A), míg a 2-oktanol átalakításánál az optimális prekursor összetétel a DMDEOS maximuma felé tolódik. Ez a terner rendszer OTEOS tartalmú párjához hasonló viselkedést mutat, sejteni engedi a szubsztrát és a szol-gél polimer mátrix rokon karakterének fontosságát.

Az enantiomertisztaságra mind a három faktor szignifikánsan hat mind az aromás, mind az alifás acetátok képződése során, ám az oktil-acetát optikai tisztaságát a faktorok közti kölcsönhatás is meghatározza, így arra négyzetes modell illeszthető (34. ábra, A és B).

A		Coeff.	Std.Err.	t(11)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	Factor						
	(A)TEOS	97,33180	0,861865	112,9316	0,000000	95,43485	99,2288
	(B)DMDEOS	99,70886	0,861865	115,6897	0,000000	97,81191	101,6058
	(C)PTEOS	98,97129	0,861865	114,8339	0,000000	97,07434	100,8682

B		Coeff.	Std.Err.	t(8)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	Factor						
	(A)TEOS	72,2604	6,14477	11,75965	0,000003	58,0905	86,4302
	(B)DMDEOS	100,9976	6,14477	16,43634	0,000000	86,8277	115,1674
	(C)PTEOS	84,6348	6,14477	13,77347	0,000001	70,4649	98,8047
	AB	24,8585	26,60799	0,93425	0,377512	-36,4996	86,2167
	AC	68,6587	26,60799	2,58038	0,032597	7,3005	130,0168
	BC	13,0272	26,60799	0,48960	0,637562	-48,3310	74,3853

34. ábra: Szignifikáns paraméterek a TEOS/DMDEOS/PTEOS terner szol-gél rendszerek enantiomertisztaságára aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon



35. ábra: TEOS/DMDEOS/PTEOS terner szol-gél rendszerben rögzített CaL B enantiomertisztasága aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

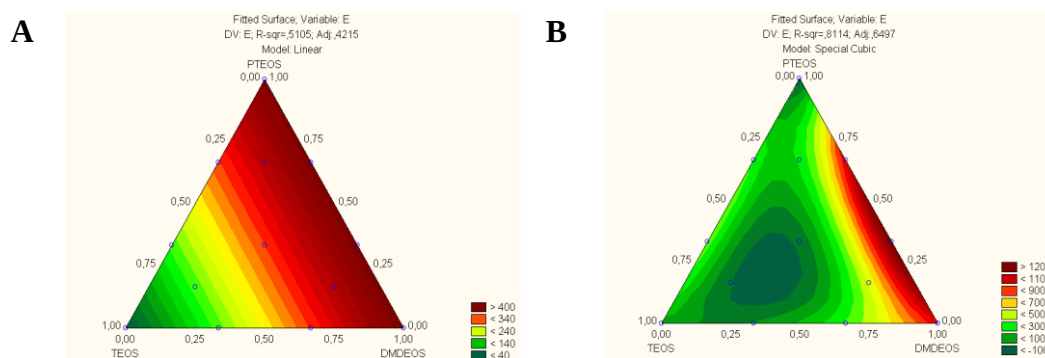
A 35. ábrán látható, hogy a termék magasabb enantiomertisztaságban történő előállításához a PTEOS és DMDEOS jelenlétének dominálnia kell. Összevetve az aromás és alifás alkoholokat, elmondható, hogy a PTEOS szerepe jelentősebb az aromás szubsztrátnál, mint az alifásénál, ahol egyértelműen a DMDEOS irányában a legtisztább a termék.

A CaL B enzimkészítmények enantiomerszelektivitást tekintve, az 1-feniletanol esetén ismét lineárisra egyszerűsíthető a modell (36. ábra, A), a 2-oktanol esetében pedig egy ABC kölcsönhatás is megfigyelhető (36. ábra, B), ami miatt köbös az illesztés.

A	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(11)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	(A)TEOS	37,5592	98,10518	0,382846	0,709128	-178,369	253,4873
B	(B)DMDEOS	495,9748	98,10518	5,055541	0,000369	280,047	711,9029
	(C)PTEOS	487,0151	98,10518	4,964214	0,000426	271,087	702,9431

B	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(7)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	(A)TEOS	68,0	291,778	0,23300	0,822426	-622,0	757,93
	(B)DMDEOS	978,4	291,778	3,35309	0,012199	288,4	1668,30
	(C)PTEOS	-161,3	291,778	-0,55268	0,597677	-851,2	528,68
	AB	-1635,1	1397,265	-1,17023	0,280202	-4939,1	1668,88
	AC	1667,7	1397,265	1,19352	0,271543	-1636,3	4971,67
	BC	3580,8	1397,265	2,56273	0,037402	276,8	6884,82
	ABC	-20625,0	8033,128	-2,56749	0,037143	-39620,3	-1629,66

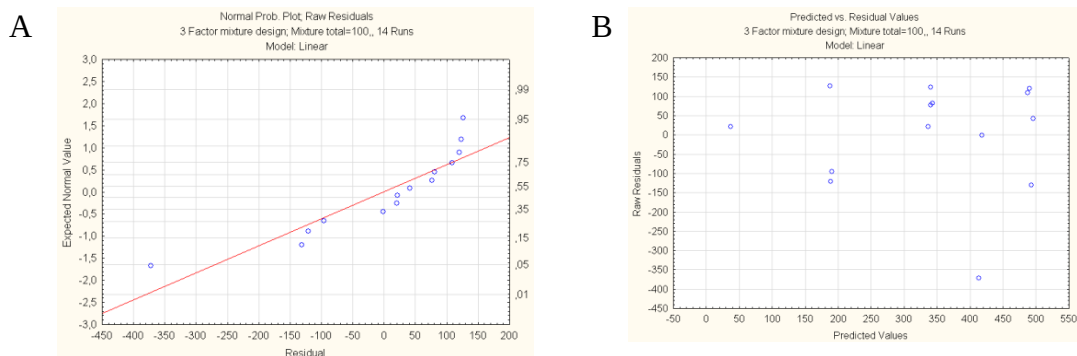
36. ábra: Szignifikáns paraméterek a TEOS/DMDEOS/PTEOS terner szol-gél rendszerek enantiomerszelektivitására aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon



37. ábra: TEOS/DMDEOS/PTEOS terner szol-gél rendszerben rögzített CaL B enantiomerszelektivitása aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

A kapott felületek azt mutatják, hogy a *rac-1a* esetén a PTEOS prekursor szignifikáns hatással bír (37. ábra, A). A *rac-1b* esetében hatása már nem ennyire számottevő, itt a DMDEOS hatása dominál (37. ábra, B). Érdekes viselkedés továbbá, hogy míg az 1-feniletanolnál az optimális összetétel egy viszonylag nagy tartományt lefed, addig a 2-oktanol esetében csak egy rendkívül szűk régióknak van szignifikáns szerepe az enantiomertisztaság alakulásában, ami azt engedi sejteni, hogy ez a terner – szubsztrát kapcsolat sokkal érzékenyebben reagál a mátrix összetételére.

Az enantiomerszelektivitás eloszlása nem követi olyan szorosan a normál eloszlást, mint az eddigi esetekben, de alapvetően elfogadható. A mérések reziduuma a nulla körül ingadozik, tehát a modell ismét alkalmasnak bizonyult (38. ábra).



38. ábra: Az enantiomerszelektivitás eloszlás függvénye - Gauss hálós ábra (A) és reziduma (B)

4.1.4. Különböző képpen rögzített CaL B enzimkészítmények összehasonlítása

Az kísérlettervezéssel kifejlesztett szol-gél rögzített CaL B enzimeket összehasonlítottam az enzim különböző rögzítési változataival. A tesztek során az AUGMENTED kísérleti modell három pontját, a szimpla TEOS mátrixot (A-1) az általam megállapított legjobb biner (A-2) és terner (A-6) rendszereket választottam ki és hasonlítottam össze egy, a kutatócsoport által fejlesztett szilikagélen adszorbeált (250-P) és két, népszerű és sikeresnek mondható, kereskedelmi CaL B enzimkészítménnyel (N-435 és CV-T2).

Az eredményekből egyfelől látszik, hogy a szol-gélbe zárás során kialakított mátrix összetétele nagymértékben hozzájárul az enzim biokatalitikus képességeihez, hiszen a TEOS prekuzort biner vagy terner rendszerben szubsztituált változataival kombinálva jelentős javulást okozott az enzimatiszus tulajdonságokban. Oly mértékig fokozható a bennük rögzített CaL B aktivitása, valamint szelektivitása, hogy teljesen összemérhetővé válik a ma kapható „sztár” készítményekével, sőt a kovalensen kötött készítményhez képest jóval aktívabbnak bizonyult az AUGMENTED -6 terner rendszer. Így a CaL B lipáz esetében elmondható, hogy a kísérletterv alkalmasnak bizonyult egy optimum megállapítására, amely egy igazán versenyképes enzimkészítményt eredményezett.

4.2. Terner szol-gél rendszerek hatása a Lipáz AK enzim biokatalitikus képességeire

A CaL B enzim rögzítése során alkalmazott szisztematikus kísérlettervet egy másik enzimre, a Lipáz AK szol-gélbe zárására is elvégeztem annak érdekében, hogy az eddig tapasztalt összefüggések, a rendszer viselkedése függ-e a benne rögzített enzim tulajdonságaitól.

4.2.1. Lipáz AK immobilizálása TEOS/DMDEOS/PTEOS terner prekursor elegyből felépített szol-gél rendszerekben

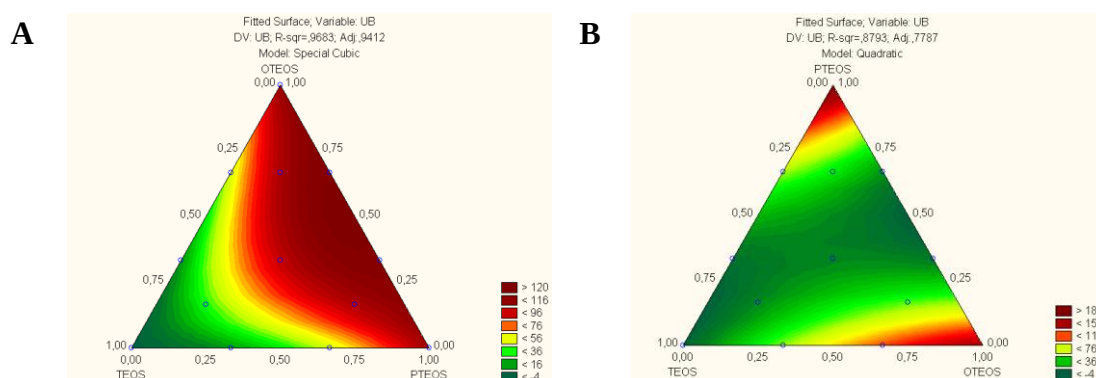
A biokatalizátor aktivitásra, mint függő változóra megállapítottam a szignifikáns faktorokat mindkét szubsztrát molekula esetén (39. ábra, A és B).

A	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(7)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	(A)TEOS	-5,329	10,0852	-0,52845	0,613522	-29,177	18,518
	(B)PTEOS	105,505	10,0852	10,46146	0,000016	81,658	129,353
	(C)OTEOS	108,321	10,0852	10,74068	0,000013	84,474	132,169
	AB	-83,917	48,2958	-1,73756	0,125856	-198,118	30,285
	AC	-92,277	48,2958	-1,91067	0,097661	-206,479	21,924
	BC	55,336	48,2958	1,14578	0,289542	-58,865	169,538
	ABC	1071,365	277,6609	3,85854	0,006223	414,802	1727,929

B	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(7)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	(A)TEOS	0,2130	5,7366	0,03714	0,971412	-13,352	13,7779
	(B)PTEOS	50,6516	5,7366	8,82957	0,000048	37,087	64,2165
	(C)OTEOS	41,1316	5,7366	7,17004	0,000182	27,567	54,6964
	AB	-86,4239	27,4713	-3,14597	0,016243	-151,383	-21,4645
	AC	-42,1321	27,4713	-1,53367	0,168979	-107,091	22,8273
	BC	12,6979	27,4713	0,46222	0,657944	-52,261	77,6573
	ABC	529,5817	157,9376	3,35311	0,012199	156,119	903,0448

39. ábra: Szignifikáns paraméterek a TEOS/PTEOS/OTEOS terner szol-gél rendszerek biokatalitikus aktivitására aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

Az aromás *rac-1a* szubsztrát esetén B és C faktorok külön, valamint ABC faktorok együttes kölcsönhatása is szignifikáns, így köbös modellt alkalmaztam (39. ábra, A). Hasonló ehhez a *rac-1b* szubsztrát esete, ahol még az AB kölcsönhatása is szignifikáns (39. ábra, B), így arra négyzetes modell volt illeszthető.



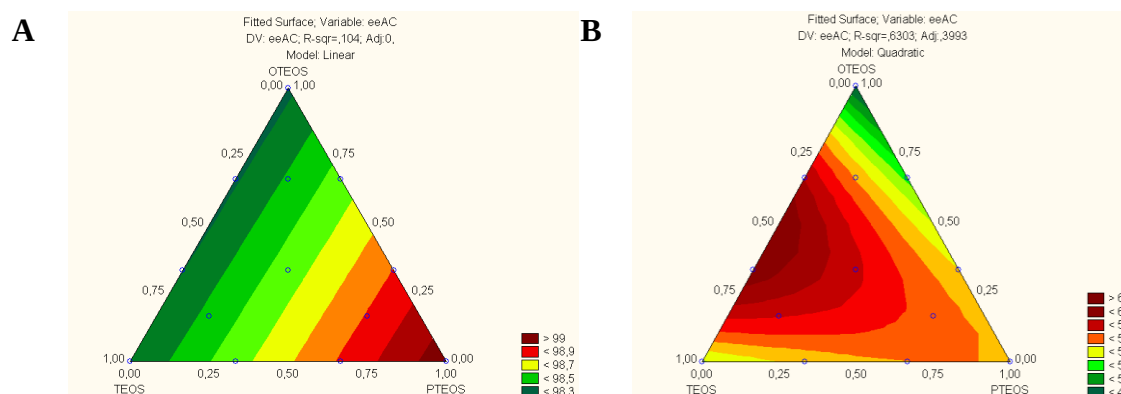
40. ábra: TEOS/OTEOS/PTEOS terner szol-gél rendszerben rögzített AK biokatalitikus aktivitása aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

A 40. ábrán látszik, hogy ugyanazon komponensekből felépülő polimer háló esetén az AK lipáz biokatalitikus aktivitása az aromás jellegű *rac-1a* szubsztráton mutatott aktivitásában a PTEOS és OTEOS mennyiségének egyaránt domináns hatása van, míg az alifás *rac-1b* szubsztráton vizsgálva szintén megjelenik ez a kettőség, de hatásuk jóval szűkebb tartományban érvényesül.

Az aromás alkohol esetében a három faktor külön-külön szignifikáns a termék enantiomertisztaságának alakulásában, kölcsönhatások nem lépnek fel, így linearizálható (41. ábra, A). Az alifás alkoholnál viszont már az A és C faktorok kölcsönhatását is figyelembe kell venni, ezért csak köbös modell választható (41. ábra, B).

A	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(11)	p	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt
	(A)TEOS	98,30596	0,502034	195,8152	0,000000	97,20099	99,4109
B	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(8)	p	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt
	(A)TEOS	52,84144	2,64206	20,00012	0,000000	46,7488	58,93403
	(B)PTEOS	54,89658	2,64206	20,77798	0,000000	48,8040	60,98917
	(C)OTEOS	47,82054	2,64206	18,09974	0,000000	41,7280	53,91314
	AB	3,39922	11,44059	0,29712	0,773944	-22,9828	29,78127
	AC	38,20144	11,44059	3,33911	0,010245	11,8194	64,58348
	BC	6,72081	11,44059	0,58745	0,573102	-19,6612	33,10286

41. ábra: Szignifikáns paraméterek a TEOS/PTEOS/OTEOS terner szol-gél rendszerekben aromás (A: *rac-2a*) és alifás (B: *rac-2b*) termékek enantiomertisztaságára nézve



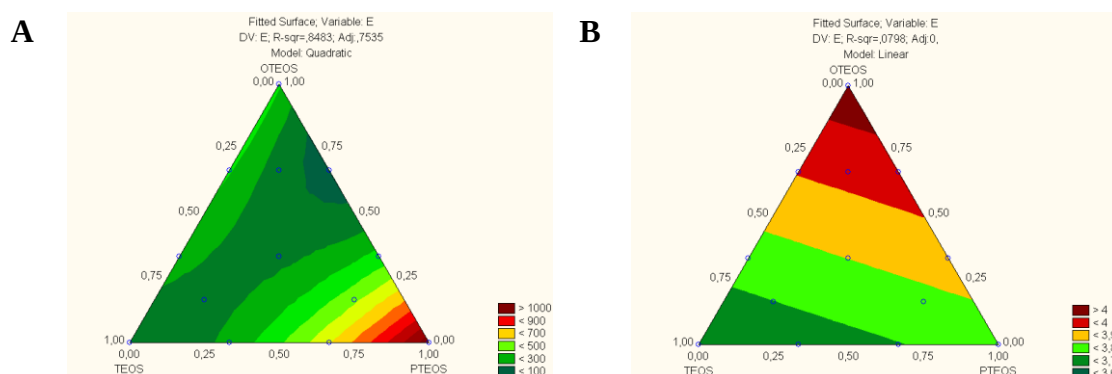
42. ábra: TEOS/OTEOS/PTEOS terner szol-gél rendszerben rögzített AK enantiomertisztasága aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

Érdekesen alakul az enantiomertisztaság a két szubsztrát esetében. Ugyanazon kísérleti kompozíciót alkalmazva, az aromás alkohol reszolválásánál a fenil-szubsztituált

organoszilán dominanciája egyértelműen növeli az ee_{Ac} értékét (42. ábra, A). Az alifás alkohol esetében azonban az optimum nem mutat ilyen szigorú irányba, itt inkább a TEOS/OTEOS élen húzódik a legerősebb hatás vonala, tehát a TEOS és az OTEOS finomhangolásával szabályozható a termék enantiomertisztasága (42. ábra, B).

A	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(8)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	(A)TEOS	102,65	139,5077	0,73581	0,482860	-219,05	424,36
	(B)PTEOS	1170,38	139,5077	8,38933	0,000031	848,67	1492,08
	(C)OTEOS	316,04	139,5077	2,26536	0,053275	-5,67	637,74
	AB	-1010,95	604,0942	-1,67350	0,132765	-2403,99	382,09
	AC	302,33	604,0942	0,50046	0,630224	-1090,72	1695,37
	BC	-2470,86	604,0942	-4,09019	0,003485	-3863,91	-1077,82
B	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(11)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	(A)TEOS	3,596782	0,307266	11,70576	0,000000	2,920494	4,273070
	(B)PTEOS	3,745609	0,307266	12,19011	0,000000	3,069321	4,421897
	(C)OTEOS	4,060375	0,307266	13,21452	0,000000	3,384086	4,736663

43. ábra: Szignifikáns paraméterek a TEOS/PTEOS/OTEOS terner szol-gél rendszerek enantioszelektivitására aromás (A: *rac-2a*) és alifás (B: *rac-2b*) szubsztrátokon

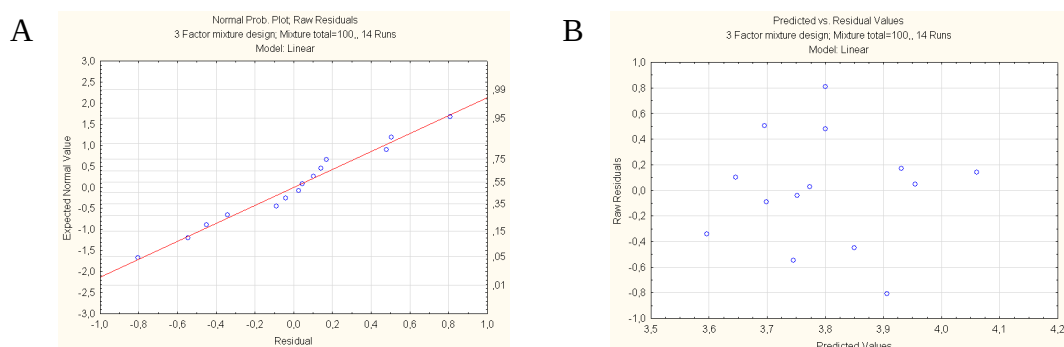


44. ábra: TEOS/OTEOS/PTEOS terner szol-gél rendszerben rögzített AK enantiomerszelektivitása aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

Az AK lipázzal elérhető enantiomerszelektivitás hasonlóan a biokatalitikus aktivitáshoz, már látványosan függ a terner rendszer összetételétől. Az eddig tapasztaltaknak megfelelően az aromás prekursor dominanciája egyértelműen kedvező az 1-feniletanol átalakítása során (44. ábra, A), míg ugyanezt a rendszert a 2-oktanolon vizsgálva, az optimum orientációja irányt vált, és az alifás oktil láncú prekursor felé tolódik (44. ábra, B).

A vizsgált változók enantiomerszelektivitás (E) eloszlásán látható, hogy a pontok alapvetően jól illeszkednek az egyenesre, tehát az eloszlás normál eloszlásnak tekinthető (45. ábra, A). A reziduumok pedig a kísérletek elvégzésének sorrendjében nem mutatnak

rendszerességet, a nulla körül véletlen ingadozást mutatnak, tehát a modell ezúttal is alkalmas a rendszer viselkedéseinek statisztikai elemzésére (45. ábra, B).



45. ábra: Az enantiomerszelektivitás eloszlás függvénye - Gauss hálós ábra (A) és reziduuma (B)

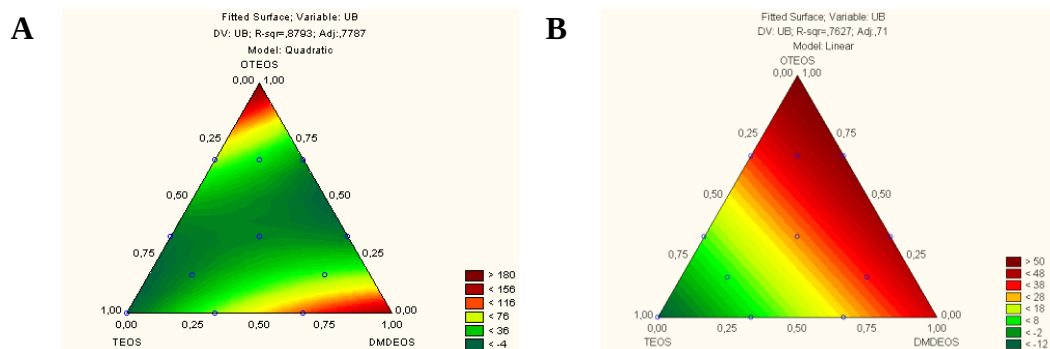
4.2.2. Lipáz AK immobilizálása TEOS/DMDEOS/OTEOS terner prekursor elegyből felépített szol-gél rendszerekben

A TEOS/DMDEOS/OTEOS rendszerben rögzített Lipáz AK biokatalitikus aktivitását vizsgálva, az aromás szubsztrát esetén a B és C faktoroknak külön-külön és együttesen is szignifikáns a hatása, így másodfokú modellt alkalmaztam (46. ábra, A). A 2-oktanollal végzett kísérletek során B és C kölcsönhatása nem lép fel, külön-külön szignifikáns faktorok, így lineáris modellt választottam (46. ábra, B).

A	Factor					
	Coeff.	Std.Err.	t(6)	p	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt
(A)TEOS	-2,453	16,0781	-0,15257	0,883738	-41,79	36,889
(B)DMDEOS	153,638	40,2599	3,81617	0,008800	55,13	252,151
(C)OTEOS	180,793	40,2599	4,49066	0,004145	82,28	279,306
AB	60,139	105,1940	0,57170	0,588288	-197,26	317,539
AC	-242,692	105,1940	-2,30709	0,060509	-500,09	14,708
BC	-689,048	144,5567	-4,76663	0,003105	-1042,77	-335,330

B	Factor					
	Coeff.	Std.Err.	t(9)	p	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt
(A)TEOS	-12,0258	7,98422	-1,50619	0,166283	-30,0873	6,03580
(B)DMDEOS	42,7645	10,49333	4,07540	0,002777	19,0270	66,50208
(C)OTEOS	58,3262	10,49333	5,55840	0,000353	34,5886	82,06371

46. ábra: Szignifikáns paraméterek a TEOS/DMDEOS/OTEOS terner szol-gél rendszerek biokatalitikus aktivitása aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon



47. ábra: TEOS/DMDEOS/OTEOS terner szol-gél rendszerben rögzített AK biokatalitikus aktivitása aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

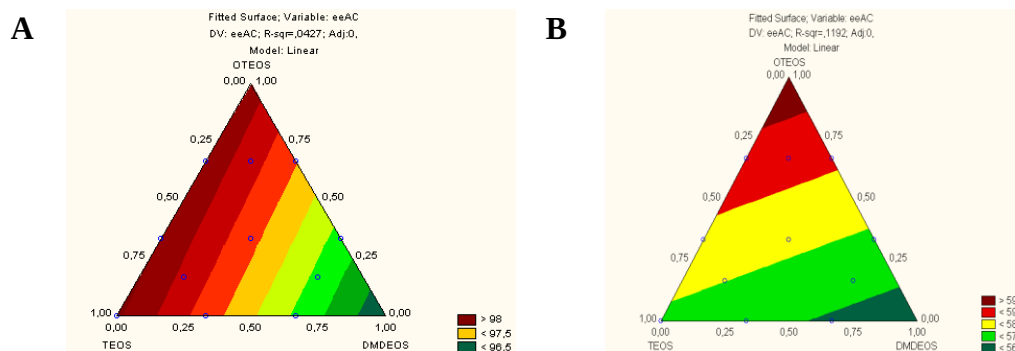
Az AK lipázt körül záró polimer háló OTEOS és DMDEOS tartalma a sarokpontokban meghatározó paraméter az aromás szubsztráttal elért biokatalitikus aktivitásra nézve (47. ábra, A). A 2-oktanol esetében az OTEOS tartalom egyértelműen meghatározza az aktivitás értékeket és bár alapvetően az OTEOS/DMDEOS régiójában található az ideális rendszer, az optimum inkább az OTEOS irányába torlódik (47. ábra, B). Noha mindkét szubsztráton az OTEOS és DMDEOS szignifikanciája egyértelmű, az alifás jellegű 2-oktanol esetében jóval nagyobb mértékben megnyilvánul, míg az aromás alkoholnál egy nagyon szűk tartományban mozog.

Az enantiomertisztaságok esetében elmondható, hogy az 1-feniletanollal és a 2-oktanolal végzett acilezésnél mindhárom szol-gél alkotónak szignifikáns hatása van, kölcsönhatások nem mutatkoznak, a modellek lineárisak (48. ábra, A és B).

A	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(9)	p	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt
	(A)TEOS	98,28218	1,758713	55,88301	0,000000	94,30369	102,2607
	(B)OTEOS	96,29624	2,311402	41,66140	0,000000	91,06749	101,5250
	(C)PTEOS	98,13798	2,311402	42,45821	0,000000	92,90922	103,3667

B	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(9)	p	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt
	(A)TEOS	56,77753	1,775672	31,97523	0,000000	52,76068	60,79438
	(B)DMDEOS	55,41595	2,333690	23,74606	0,000000	50,13678	60,69513
	(C)OTEOS	59,59274	2,333690	25,53584	0,000000	54,31357	64,87191

48. ábra: Szignifikáns paraméterek a TEOS/DMDEOS/OTEOS terner szol-gél rendszerek enantiomertisztaságára aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon



49. ábra: TEOS/DMDEOS/OTEOS terner szol-gél rendszerben rögzített AK enantiomertisztasága aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

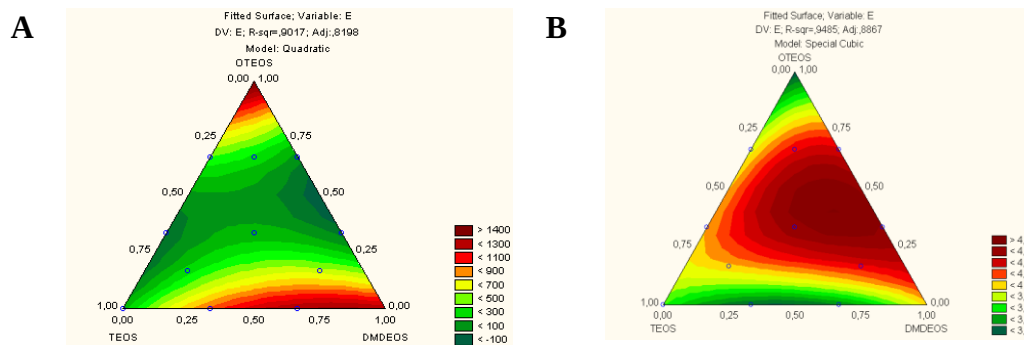
Az enantiomertisztaság az 1-feniletanol esetében a legkisebb mértékben a DMDEOS mennyiségétől függ, az optimum az OTEOS és TEOS régiójában húzódik (49. ábra, A). A 2-oktanollal megvalósított tesztekben pedig kiderül, hogy a keletkező termék tisztaságának egyértelműen a dús OTEOS tartalom kedvez (49. ábra, B).

A TEOS/DMDEOS/OTEOS szol-gél rendszerben rögzített AK enantiomerszelektivitása 1-feniletanol esetén a B, C faktorok egyedi hatásától, valamint az AC és BC kölcsönhatásoktól függ, így az illesztett modell másodfokú (50. ábra, A). A 2-oktanol esetében pedig A, B és C faktorok egyenként és egymással kölcsönhatásban is szignifikánsak, ezáltal a köbös illesztés indokolt (50. ábra, B).

A						
Factor	Coeff.	Std.Err.	t(6)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
(A)TEOS	160,84	169,514	0,94881	0,379352	-253,9	575,62
(B)DMDEOS	1264,52	424,465	2,97908	0,024666	225,9	2303,14
(C)OTEOS	1562,08	424,465	3,68011	0,010329	523,4	2600,71
AB	1798,21	1109,075	1,62136	0,156067	-915,6	4512,02
AC	-3177,12	1109,075	-2,86466	0,028626	-5890,9	-463,31
BC	-6366,99	1524,082	-4,17759	0,005829	-10096,3	-2637,70

B						
Factor	Coeff.	Std.Err.	t(5)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
(A)TEOS	3,61303	0,165241	21,86521	0,000004	3,18827	4,03780
(B)DMDEOS	3,93360	0,476194	8,26050	0,000424	2,70950	5,15770
(C)OTEOS	3,10908	0,476194	6,52901	0,001261	1,88498	4,33318
AB	-2,36406	1,362857	-1,73464	0,143332	-5,86739	1,13927
AC	2,52561	1,362857	1,85317	0,123046	-0,97773	6,02894
BC	4,24636	2,015456	2,10690	0,088972	-0,93454	9,42725
ABC	14,51318	5,549589	2,61518	0,047372	0,24751	28,77886

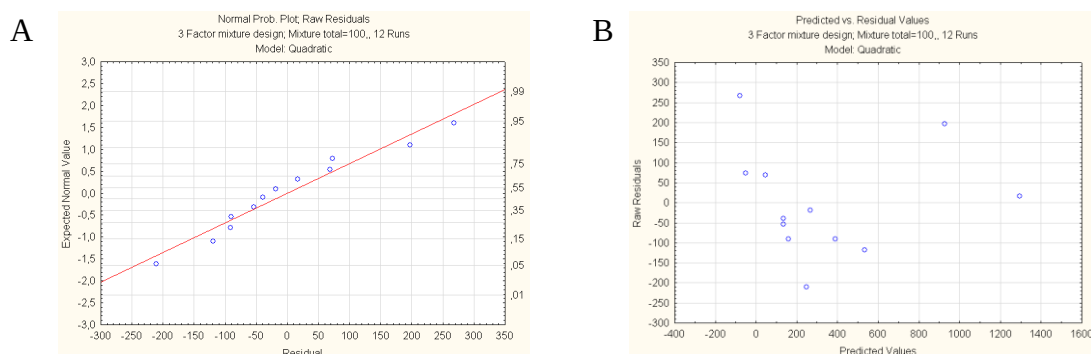
50. ábra: Szignifikáns paraméterek a TEOS/DMDEOS/OTEOS terner szol-gél rendszerek enantiomerszelektivitása aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon



51. ábra: TEOS/DMDEOS/OTEOS terner szol-gél rendszerben rögzített AK enantiomerszelektivitása aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

Az enantiomerszelektivitás alakulása a biokatalizátorok aktivitásának jellegével teljesen azonos, amely az ott megállapított okokat támasztja alá, valamint ugyanez az összefüggés állt fenn a CaL B enzim esetében is (51. ábra, A és B).

A TEOS/DMDEOS/OTEOS terner rendszerre épített kísérletterven végzett szükséges statisztikai próba szintén normális eloszlást mutat és a reziduumok ingadozása is véletlenszerű, tehát a modell alkalmasnak bizonyul a rendszer jellemzésére (52. ábra, A, B).



52. ábra: Az enantiomerszelektivitás eloszlás függvénye - Gauss hálós ábra (A) és reziduuma (B)

4.2.3. Lipáz AK immobilizálása TEOS/DMDEOS/PTEOS terner prekursor elegyből felépített szol-gél rendszerekben

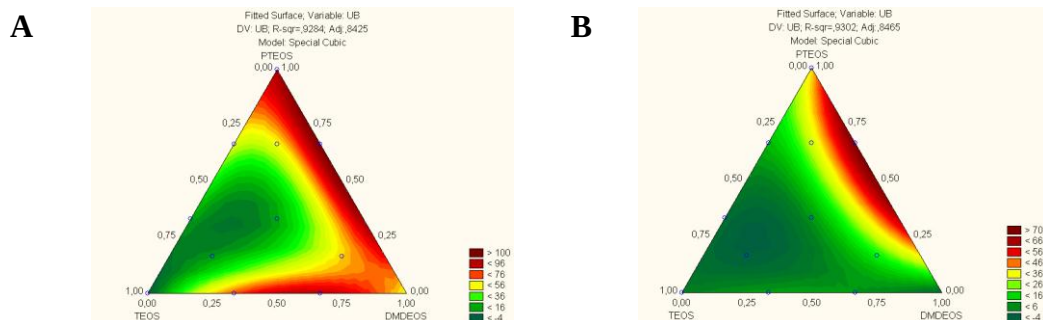
A Lipáz AK rögzítése során az előző pontban bemutatott terner szol-gél prekursor elegyben az OTEOS komponenst PTEOS-ra cseréltem, majd a fent leírtaknak megfelelően vizsgáltam.

Elsőként a biokatalitikus aktivitást markánsan befolyásoló faktorokat határoztam meg az alkoholok kinetikus reszolválásából kapott eredmények alapján (53. ábra, A és B). Látható, hogy a *rac-1a* szubsztrátnál a C faktor szignifikáns, valamint fellép az ABC faktorok közti kölcsönhatás. A *rac-1b* esetében ezek mellett még B és C kölcsönhatása is szignifikáns, így mindkét esetben köbös modell illeszthető.

A						
Factor	Coeff.	Std.Err.	t(5)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
(A)TEOS	-5,83	15,7572	-0,36990	0,726608	-46,33	34,677
(B)DMDEOS	52,90	46,1858	1,14537	0,303901	-65,82	171,624
(C)PTEOS	98,20	15,8529	6,19444	0,001600	57,45	138,951
AB	265,32	132,7552	1,99856	0,102128	-75,94	606,577
AC	-68,48	74,1909	-0,92302	0,398352	-259,19	122,234
BC	152,80	121,5847	1,25672	0,264369	-159,75	465,341
ABC	-1985,38	472,5565	-4,20137	0,008478	-3200,13	-770,639

B						
Factor	Coeff.	Std.Err.	t(5)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
(A)TEOS	2,362	8,6029	0,27452	0,794665	-19,75	24,4760
(B)DMDEOS	-1,500	25,2158	-0,05950	0,954857	-66,32	63,3189
(C)PTEOS	37,994	8,6551	4,38977	0,007089	15,75	60,2424
AB	28,051	72,4795	0,38702	0,714664	-158,26	214,3656
AC	-67,355	40,5055	-1,66286	0,157227	-171,48	36,7676
BC	227,043	66,3808	3,42031	0,018832	56,41	397,6806
ABC	-738,765	257,9986	-2,86345	0,035264	-1401,97	-75,5590

53.ábra: Szignifikáns paraméterek a TEOS/DMDEOS/PTEOS terner szol-gél rendszerek biokatalitikus aktivitására aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon



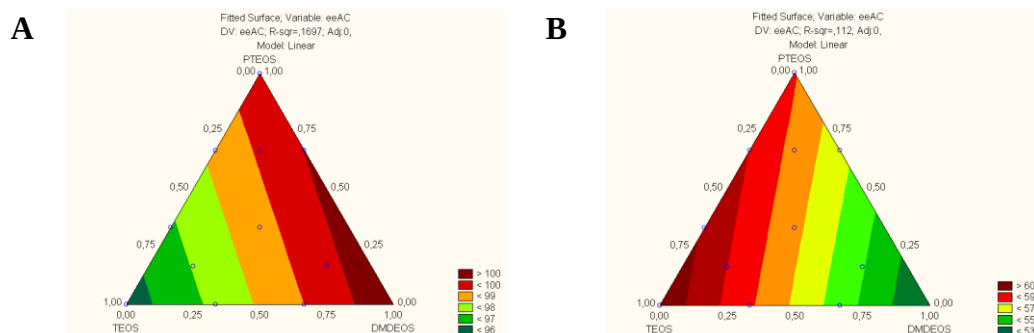
54. ábra: TEOS/DMDEOS/PTEOS terner szol-gél rendszerben rögzített CaL B biokatalitikus aktivitása aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

A háromszög diagramok alapján látható, hogy biokatalizátor aktivitás optimuma meglehetősen a PTEOS maximális mennyisége felé tolódik és alapvetően a PTEOS/DMDEOS éle mentén (54. ábra, A). A 2-oktanol átalakításánál az optimális prekursor összetétel ehhez képest a DMDEOS irányába tolódva, szinte teljesen szimmetrikusan a PTEOS/DMDEOS élen helyezkedik el (54. ábra, B). Ez azt sugallja, hogy ebben az esetben a rendszer optimálhatósága szinte csak a két szubsztituált prekursor összetételére korlátozódik, alifás alkohol esetében egy kifejezetten szűk tartományon belül.

A termék acetátok enantiomertisztaságra mind a három faktor egymástól függetlenül szignifikánsan hat mind az aromás, mind az alifás acetátok képződése során, a faktorok között kölcsönhatás nem áll fenn (55. ábra A és B). Mindkét esetben lineáris modellt alkalmaztam.

A	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(9)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	(A)TEOS	95,4765	2,304088	41,43787	0,000000	90,26428	100,6887
	(B)DMDEOS	100,7704	3,325804	30,29956	0,000000	93,24692	108,2939
	(C)PTEOS	99,6540	2,231810	44,65167	0,000000	94,60534	104,7028
B	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(9)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	(A)TEOS	60,75295	3,591816	16,91427	0,000000	52,62770	68,87821
	(B)DMDEOS	52,90044	5,184559	10,20346	0,000003	41,17215	64,62873
	(C)PTEOS	58,09470	3,479144	16,69799	0,000000	50,22433	65,96507

55. ábra: Szignifikáns paraméterek a TEOS/DMDEOS/PTEOS terner szol-gél rendszerek enantiomertisztaságára aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon



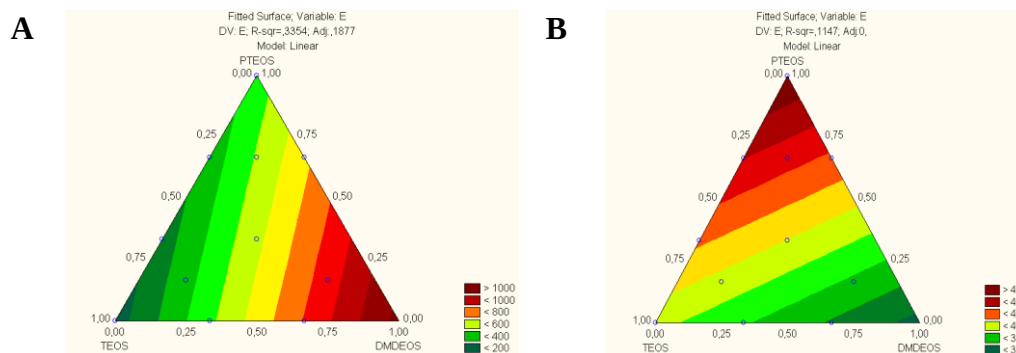
56. ábra: TEOS/DMDEOS/PTEOS terner szol-gél rendszerben rögzített AK enantiomertisztasága aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon

Az 56. ábrán látható, hogy a terner rendszer a vizsgált két szubsztráton teljesen ellentétesen viselkedik. A termék magasabb enantiomertisztaságban történő előállításához a PTEOS és DMDEOS jelenlétének fontos szerepe van, sőt a DMDEOS prekursorának kell dominálnia az 1-feniletanol esetében. A 2-oktanol átalakítása során ezzel szemben teljesen ellentétesen a PTEOS/TEOS arány a szignifikáns, a DMDEOS pedig a legkevésbé meghatározó rendszeralkotó.

A Lipáz AK szol-gél készítmények enantiomerszelektivitást tekintve az 1-feniletanol esetén ismét lineárisra egyszerűsíthető a modell (57. ábra, A), hiszen egyedül a B faktor szignifikáns. A 2-oktanol esetében pedig az A, B és C faktorkok külön szignifikánsak, kölcsönhatás nélkül, így mindkét modell lineáris.

A	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(9)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	(A)TEOS	152,209	224,6056	0,677674	0,515020	-355,884	660,302
	(B)DMDEOS	1132,770	324,2039	3,494005	0,006787	399,370	1866,170
	(C)PTEOS	444,894	217,5599	2,044925	0,071196	-47,261	937,048
B	Factor	Coeff.	Std.Err.	t(9)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
	(A)TEOS	3,934515	0,490111	8,027799	0,000022	2,825806	5,043223
	(B)DMDEOS	3,565109	0,707444	5,039420	0,000700	1,964759	5,165460
	(C)PTEOS	4,487069	0,474737	9,451697	0,000006	3,413140	5,560998

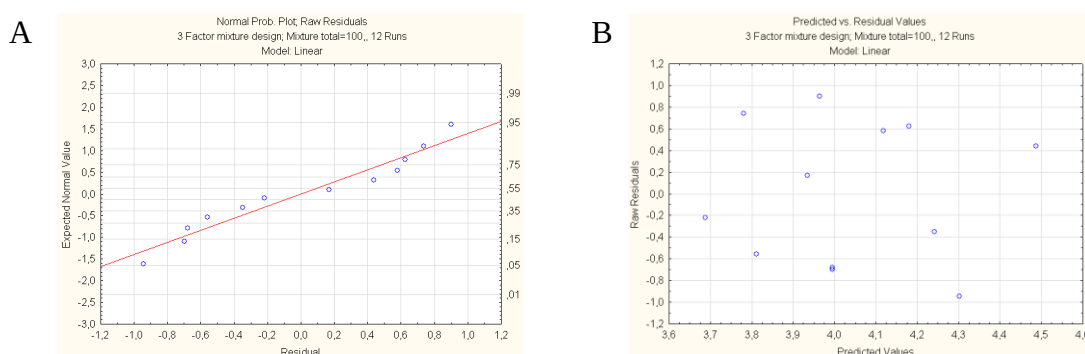
57. ábra: Szignifikáns paraméterek a TEOS/DMDEOS/PTEOS terner szol-gél rendszerek enantiomer szelektivitására, aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztrátokon



58. ábra: TEOS/DMDEOS/PTEOS terner szol-gél rendszerben rögzített AK enantiomerszelektivitása aromás (A: *rac-1a*) és alifás (B: *rac-1b*) szubsztátokon

A kapott felületek azt mutatják, hogy a *rac-1a* esetén a DMDEOS prekursor szignifikáns hatással bír (58. ábra, A). A *rac-1b* esetében a hatása már szinte egyáltalán nem számottevő, itt a PTEOS hatása dominál (58. ábra, B).

Az enantiomerszelektivitás eloszlás igazodik a normál eloszláshoz, a mérések reziduuma a nulla körül ingadozik, tehát a modell ismét alkalmasnak bizonyult (59. ábra, A és B).



59. ábra: Az enantiomerszelektivitás eloszlás függvénye - Gauss hálós ábra (A) és reziduuma (B)

4.3. Hőstabilitás vizsgálatok szerves közegben

A különbözőképpen immobilizált Lipáz AK és CaL B készítményeket hőstressznek tettem ki szerves közegben (absz. toluol), azt vizsgálva, hogy a rögzítési mód milyen hatással lehet az enzim hőstabilitására. A hőmérsékletnek nagy hatása lehet az fehérje molekula szerkezetére, az aktív centrum állapotára, ezáltal nagymértékben befolyásolhatja az enzim katalitikus képességeit, valamint hatással bírhat az enzimkészítmény tárolási körülményeire, szállíthatóságára, amely sok esetben komoly gazdasági szempont lehet.

A vizsgálatok során az enzimmészítményeket 2 órán át tartottam a megfelelő hőmérsékleten (30, 50, 70, 90, 110 °C), majd enzimatiskus képességeiket a 3.3. pontban leírtaknak megfelelően vizsgáltam.

A Lipáz AK hőstabilitásának vizsgálata során a rögzítetlen Lipáz AK enzim port és négy különböző rögzített AK készítményt hasonlítottam össze: kétféle kereskedelmi forgalomban kapható szol-gél készítményt (Szol-Gél-K1 és Szol-Gél-K2), egy szilikagélre egyszerű adszorpcióval rögzített készítményt (Adszorbeált), valamint az általam készített szol-gél AK készítményt (Szol-Gél A10-P –TEOS/DMDEOS/PTEOS: 0,413/0,293/0,293). Az enzim készítmények kezdeti aktivitás értékeit mutatja be a 3. táblázat.

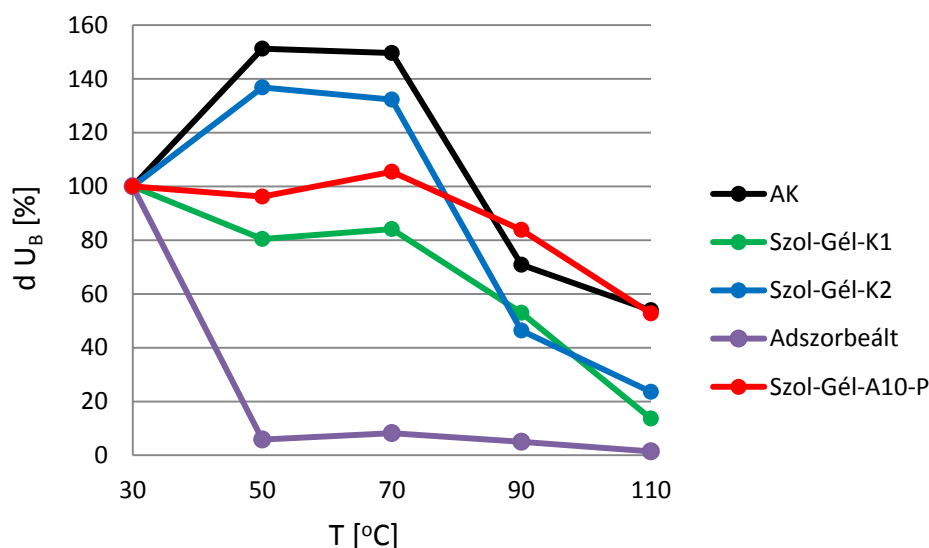
3. táblázat: Lipáz AK enzimmészítmények kezdeti biokatalizátor aktivitása (toluolban 2 órán át 30°C-on)

Különböző Lipáz AK enzimmészítmények		Kezdeti aktivitás U_B [U/g]
AK	rögzítetlen enzim por	55,1
Szol-Gél-K1	kereskedelmi készítmény szol-gélben rögzített	39,7
Szol-Gél-K2	kereskedelmi készítmény, szol-gélben és habkőön rögzített	2,0
Adszorbeált	szilikagélen adszorbeált	61,9
Szol-Gél-A10-P	saját, A10-P típusú szol-gélben rögzített	131,8

A kezdeti biokatalizátor aktivitás értékek közül a saját A10-P típusú (TEOS/DMDEOS/PTEOS 0,413/0,293/0,293) szol-gél rendszerben rögzített Lipáz AK, amely fajlagosan 10 % enzimet tartalmaz, messze kiemelkedik, több mint kétszerese a szabad AK por aktivitásának. Ezzel szemben a kereskedelmi készítmények gyengébb aktivitást mutattak. Ugyan a kereskedelmi forgalomban kapható katalizátorokról nem áll rendelkezésre kielégítő mennyiségű információ, de a K1-es és a K2-es típusú szol-gél rendszerek között alapvető különbség, hogy a K2-es feltehetően habkőre történő rögzítés és szol-gélbe zárás kombinálásával előállított készítmény, míg a K1 csak egyedül szol-gél rendszerben rögzített Lipáz AK. Enzimek habkőn történő egyszerű adszorpciója az irodalomban ismert [49]. A habkő üreges szerkezetű vulkanikus eredetű Trachit módosulat, (összetétele körülbelül: 75% SiO₂, 15 % Al₂O₃, 8 % Na₂O-K₂O, 2% Fe₂O₃) jellemzően 50-150 µm pórusmérettel rendelkezik, amely túl nagy lehet lipázok hatékony adszorpciójára, ám a 40-80 µm szemcseméretű szol-gél részecskéket hatékonyan rögzítheti [50]. A K2-es készítmény esetében az enzim feltehetően közvetlenül a szol-gél

mátrixban rögzült, majd a habkő üregeibe lett zárva, amely a szubsztrát diffúziójának komoly gátat jelenthet. Ezzel magyarázható, a többi szol-gél rendszerhez hasonló viselkedése, és igen alacsony abszolút aktivitása.

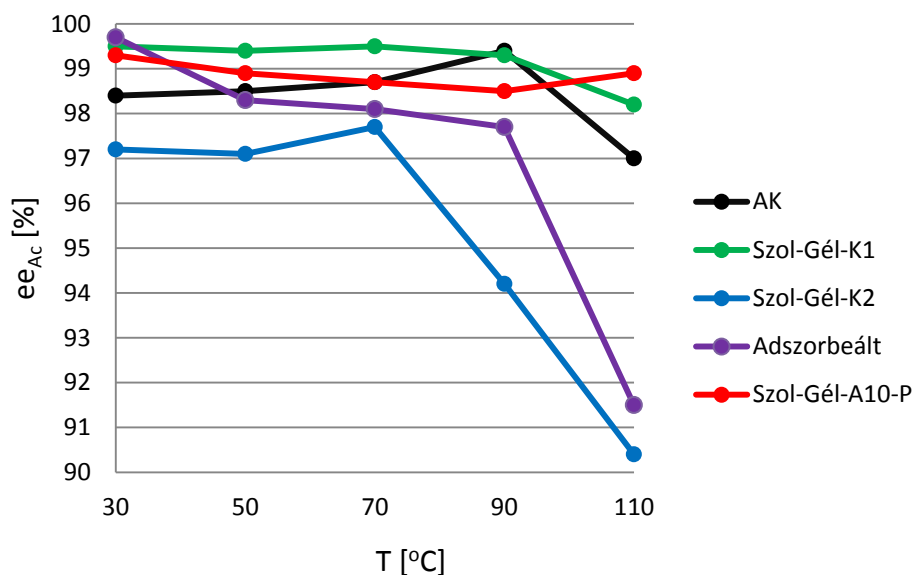
A hőmérséklet hatása a Lipáz AK enzimkészítményekre



60. ábra: Lipáz AK biokatalizátorok aktivitásának változása a hőmérséklet függvényében

A 60. ábrán látható, hogy 70 °C-on mindegyik biokatalizátor kisebb-nagyobb mértékben aktivitásnövekedést mutat, ám ez csak a rögzítetlen enzim por és a K2 típusú kereskedelmi szol-gél rögzített AK esetében számottevő, hőstabilitásuk jellege közel megegyező. Az általam előállított szol-gél (A10-P) rögzített AK és a K1-es típusú kereskedelmi szol-gél enzim viselkedése ugyancsak hasonlóságot mutat. Az adszorpcióval előállított készítmény azonban a többitől eltérő sajátságú, aktivitásának nagy részét már 50 °C-on elveszíti. A már szélsőséges körülménynek mondható 90 °C-on az A10-P szol-gél rögzített lipáz egyedülállóan még mindig őrzi aktivitásának több mint 80%-át, míg a hasonló kereskedelmi szol-gél lipázok már elvesztették biokatalitikus aktivitásuk felét. Magasabb hőmérsékleteken is jó aktivitással bír a szabad, rögzítetlen enzim por, amely nagy mennyiségben tartalmaz stabilitást növelő adalékokat, melyeknek köszönhetően a nagyobb termikus igénybevételeknek is ellenállt. A Lipáz AK különböző formáinak hőstresszben mutatott viselkedését összevetve látható, hogy a szabad enzim por és a szol-gél rögzített rendszerek alapvetően hasonló hőmérsékletfüggést mutattak, míg az adszorpcióval rögzített AK ettől eltérő. Ennek oka lehet, hogy az AK enzim por adszorpciója során a hordozón szelektíven az aktív enzim rögzül, mintegy kiszűrve a

stabilitást növelő komponenseket az enzim mellől, míg a szol-gélbe záraskor az adalék anyagok nagyobb mennyiségben maradhatnak bent a lipázzal együtt.



61. ábra: Lipáz AK biokatalizátorok enantiomerszelektivitásának változása a hőmérséklet függvényében

Az aktivitás mellett a másik fontos jellemzője az enzim katalizált reakcióknak az enzim entiomerszelektivitása. A 61. ábrán a termék enantiomertisztaságának változása látható, amelyből elmondható, hogy a K1 és a saját A10-P szol-gél rendszerek képesek a bennük immobilizált enzim szelektivitását a legnagyobb mértékben konzerválni. Az adszorpciós és a K2 típusú készítmények szelektivitása 70 °C után jelentősen romlik. Az aktivitás hőfok függésének jellegéhez hasonló képet mutatnak a különböző képpen rögzített AK készítmények, mivel a szabad lipáz por, a K1 típusú és a saját A10-P típusú szol-gél rögzítés egymáshoz viszonyítva rokon módon befolyásolták az enantiomerszelektivitás alakulását.

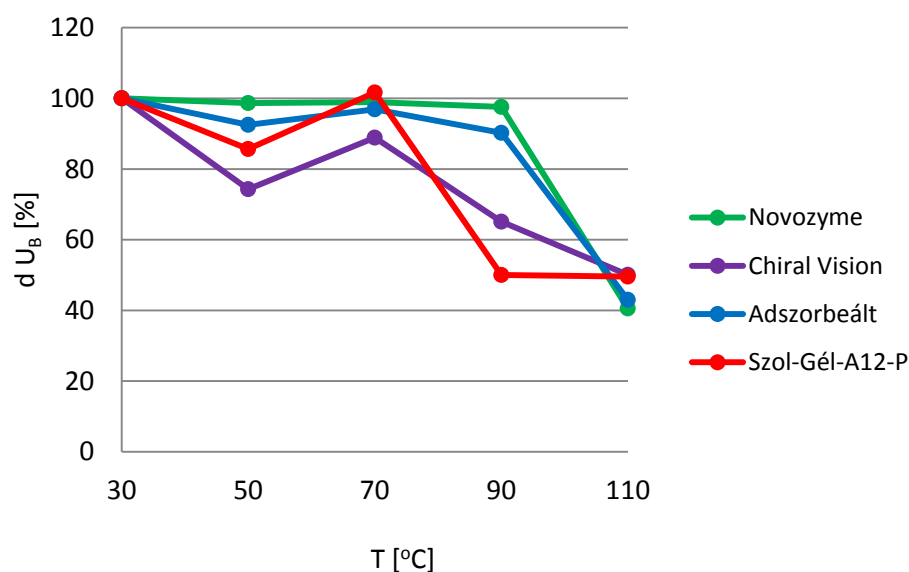
Hőmérséklet hatása CaL B enzimkészítményekre

A CaL B hőstabilitásának vizsgálata során négy különböző módon rögzített CaL B készítményt hasonlítottam össze: kétféle kereskedelmi forgalomban kapható készítményt (Novozyme és Chiral Vision), egy szilikagélre egyszerű adszorpcióval rögzített készítményt (Adszorbeált), valamint az általam készített szol-gél AK készítményt (Szol-Gél A12-P – TEOS/DMDEOS/PTEOS: 0,267/0,587/0,147). Mivel a CaL B enzim szabad, rögzítetlen formája folyékony állapotú, nem szerepel a heterogén fázisú kinetikus

reszolválásokban történő vizsgálatok során. Az enzim katalizátorok kezdeti aktivitás értékeiből látható, hogy a kereskedelmi enzim készítmények közül a Novozyme nagyfokú aktivitással bír, melyet az általam előállított szol-gél biokatalizátor képes megközelíteni, a másik kereskedelmi készítmény, a Chiral Vision aktivitását pedig messze felülmúlja (4. táblázat).

Különböző CaL B enzimműszítmények		Kezdeti aktivitás U_B [U/g]
Novozyme	kereskedelmi készítmény, akril polimeren rögzítve	140,6
Chiral Vision	kereskedelmi készítmény, kovalensen rögzítve	82,0
Adszorbeált	szilikagélen adszorbeált	125,5
Szol-Gél-A12-P	saját, A12-P típusú szol-gélben rögzített	127,1

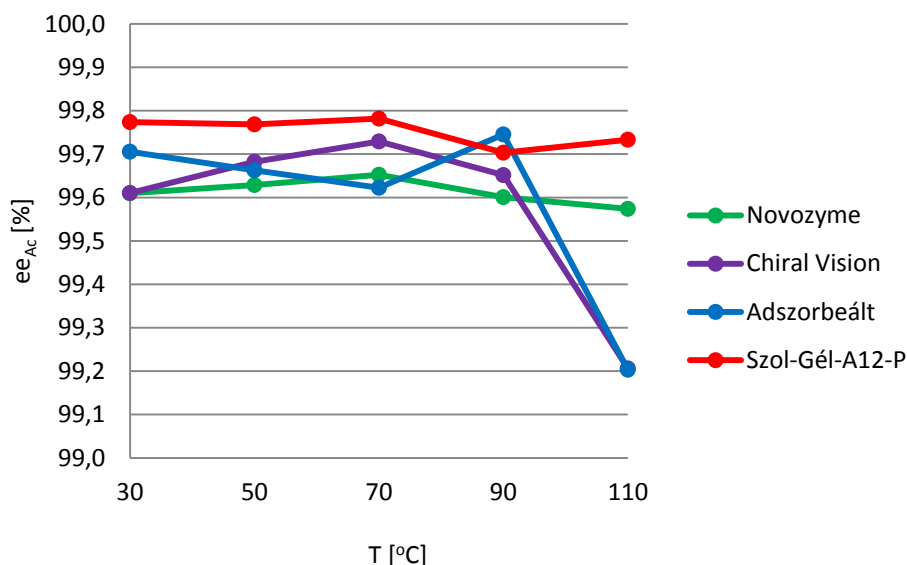
4. táblázat: CaL B enzimműszítmények kezdeti biokatalizátor aktivitása (toluolban 2 órán át 30°C-on)



62. ábra: CaL B biokatalizátorok aktivitásának változása a hőmérséklet függvényében

A biokatalizátor aktivitásának változása a hőstressznek kitett CaL B készítmények közül a kereskedelmi Novozyme esetében egészen 90 °C-ig nagyon csekély mértékű, majd 110 °C-nál egy éles letörés figyelhető meg. A másik három rögzített CaL B ettől eltérő módon, 50 °C-nál egy kisebb aktivitás csökkenést, majd 70 °C-nál növekedést mutattak. Ezt követően a rögzített rendszerek eltérő viselkedésűek, de 110 °C-on közel azonos mértékben őrzik meg aktivitásukat. Bár a Lipáz AK és CaL B készítmények alapvetően eltérő tulajdonságú rendszerek, a két saját szol-gél rögzített lipázt (AK esetében: Szol-Gél-A10-P, CaL B esetében: Szol-Gél-A12-P) tekintve, hasonló jelleggel reagáltak a

termikus igénybevételre; 70 °C-on aktivitás növekedését mutattak, majd 110 °C-on kezdeti aktivitásuk hozzávetőleg felét megőrizték.



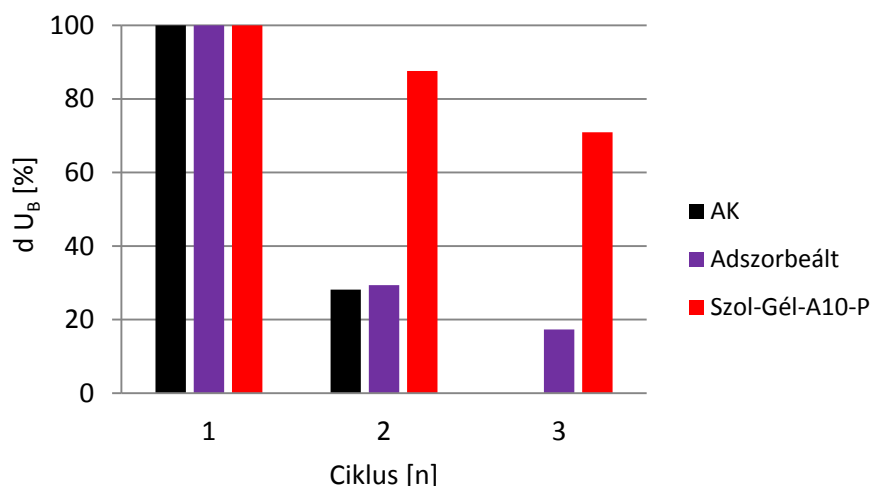
63. ábra: CaL B biokatalizátorok enantiomerszelektivitásának változása a hőmérséklet függvényében

A különböző CaL B enzim készítmények szelektivitása a hőmérséklet hatására a saját szol-gél mátrixban rögzített esetben (Szol-Gél-A12-P) változik a legkevésbé, a legmagasabb hőmérsékleten, 110 °C-on is kimagasló enantiomerszelektivitással rendelkezik, míg az adszorpcióval rögzített és a kovalensen rögzített (Chiral Vision) készítmények szelektivitása már jelentősen romlik (63. ábra).

4.4. Biokatalizátorok visszaforgathatóságának vizsgálata

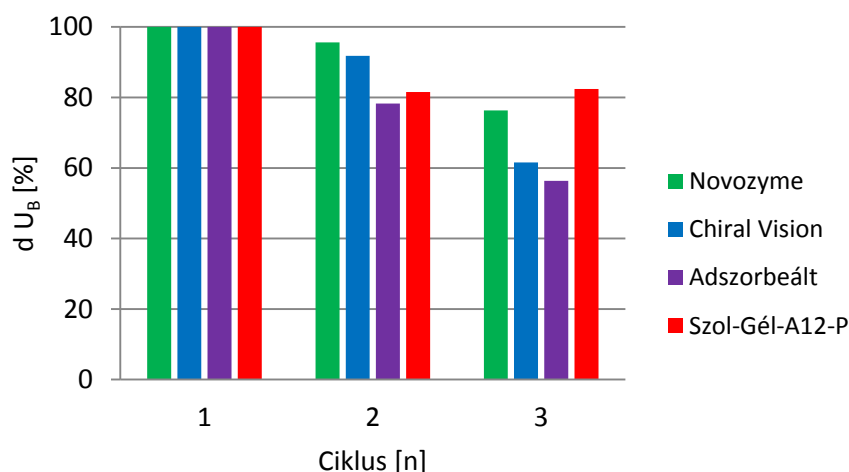
Az enzim rögzítés egyik legfőbb célja az értékes enzim reakcióelegyből történő visszanyerhetősége, amely jóval gazdaságosabb eljárásokat tesz lehetővé. Nagyon fontos szempontok a visszanyerhető biokatalizátor mennyisége, valamint enzim aktivitásnak és szelektitásnak változása az egyes ciklusok után, melyeket az enzim sajátosságai mellett, a rögzítés módja is nagymértékben befolyásolhat.

Különböző képpen rögzített Lipáz AK és CaL B enzimeket a racém 1-feniletanol 3.3. pontban leírt kinetikus rezolválásában vizsgáltam.



64. ábra: Lipáz AK biokatalizátorok visszaforgatósága

A Lipáz AK enzimkészítmények reakció elegyből történő visszanyerése során a szabad, rögzítetlen AK enzim por (AK) már a második felhasználás után szűrhetetlennek bizonyult. A szilikagélen adszorbeált és a saját szol-gél rögzített készítmény jóval könnyebben visszanyerhetőek voltak, ám aktivitását egyértelműen a szol-gél mátrixban rögzített AK őrizte meg a legnagyobb mértékben. Ennek oka, hogy az adszorbeált enzim könnyebben kijöhet a hordozó pórusaiból, ennek köszönhetően hasonlóan viselkedik, mint a rögzítetlen, szabad enzim, míg a szol-gélbe zárt enzimet a polimer mátrix sikerebben visszatartja, így az nagyobb stabilitást mutat.



65. ábra: CaL B biokatalizátorok visszaforgatósága

A különböző rögzített CaL B katalizátorok közül ez esetben is a szol-gél rögzített készítmény bizonyult a legstabilabbnak a visszaforgatási próbák során. A második

ciklusban az akril hordozón rögzített (Novozyme) és a kovalensen rögzített (Chiral Vision eredményesebben) tartják aktivitásukat, de a harmadik felhasználás után a szol-gél mátrix már nagyobb védelmet biztosít még az erősnek mondható kovalens erővel rögzített enzimmészítménynél is.

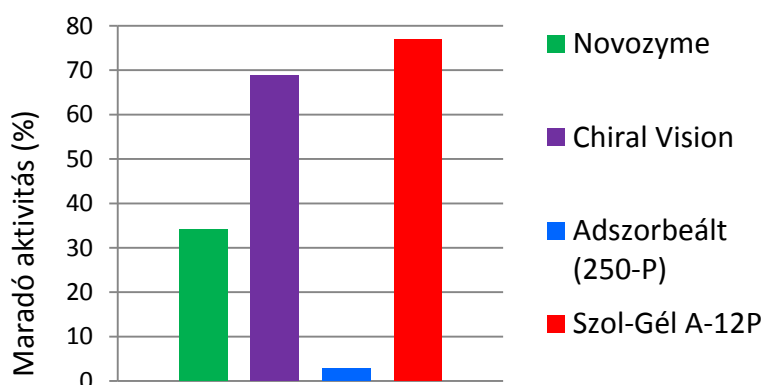
4.5. Stabilitás vizsgálat felületaktív anyaggal szemben

Az enzimmészítmények felületaktív anyaggal való kezelése igen agresszív igénybevételt jelent, amely során a fizikailag adszorbeált enzim szinte teljes mértékben eltávolítható a hordozóról.

A felületaktív anyaggal szembeni stabilitás vizsgálatok során célom volt ugyanazon enzim (CaL B) különböző rögzített formáinak összehasonlítása. Ezáltal vizsgáltam két kereskedelmi enzimmészítményt, a szilikagélen adszorbeált CaL B-t, valamint egy saját fejlesztésű szol-gél rögzítést.

Felületaktív anyaggal való kezelésnek alávetett enzimmészítmények	
Novozyme (435)	kereskedelmi készítmény, akril polimeren rögzítve
Chiral Vision (T2)	kereskedelmi készítmény, kovalensen rögzítve
Adszorbeált (250P)	szilikagélen adszorbeált
Szol-Gél A12-P	saját, AUGMENTED 12 TEOS/DEMDEOS/PTEOS típusú szol-gélben rögzített

5. Táblázat: Felületaktív anyaggal való kezelésnek alávetett enzimmészítmények



66. ábra: A TRX-100 kezelés hatása a biokatalizátorok aktivitására

A diagramon látható, hogy a TRX-100-zal való agresszív kezelésnek legkevésbé a G250-P típusú szilikagélen adszorbeált CaL B enzimmészítmény állt ellen, maradó aktivitása 2,7 %. Körülbelül a 35%-ára csökkent az aktivitás a szintén adszorpcióval előállított, Novozyme kereskedelmi készítmény esetében. A Chiral Vision által fejlesztett rögzített

CaL B, a stabil kovalens kötéseknek köszönhetően hatékonyabban immobilizálja az enzimet, így 68 %-ban képes volt a biokatalitikus aktivitását megőrizni. Az általam fejlesztett szol-gél rögzített CaL B (A12-P) is veszített ugyan a biokatalitikus aktivitásából, de kimagasló módon az aktivitásának 77 %-át megőrizte. A pusztán fizikai kölcsönhatások révén megvalósuló enzimrögzítések közül a szol-gélbe zárás egyértelműen stabilabbnak bizonyult, a szintén fizikai módszerek közé tartozó adszorpciós rögzítésénél. A szol-gél mátrix egyedülálló módon, képes volt még a kifejezetten erős kovalensen rögzített enzimmészítmények stabilitását is felülmúlni az agresszív, TRX-100 detergenses kezelések során.

A felületaktív anyaggal történő kezelés után a vizes mosással és szűréssel távolítottam el a feltételezhetően kioldódott enzimet a szilárd hordozótól. A kapott szűrlet fehérje tartalmát Bradford módszer segítségével határoztam meg. Az UV-VIS készülékkel mért abszorbanciákból, valamint a BSA fehérjével végzett kalibráció segítségével a következő értékeket kaptam a mosás utáni oldatok fehérje tartalmára (6. táblázat)

6. táblázat: Különböző CaL B enzimmészítményekhez tartozó mosófolyadékok fehérje tartalma

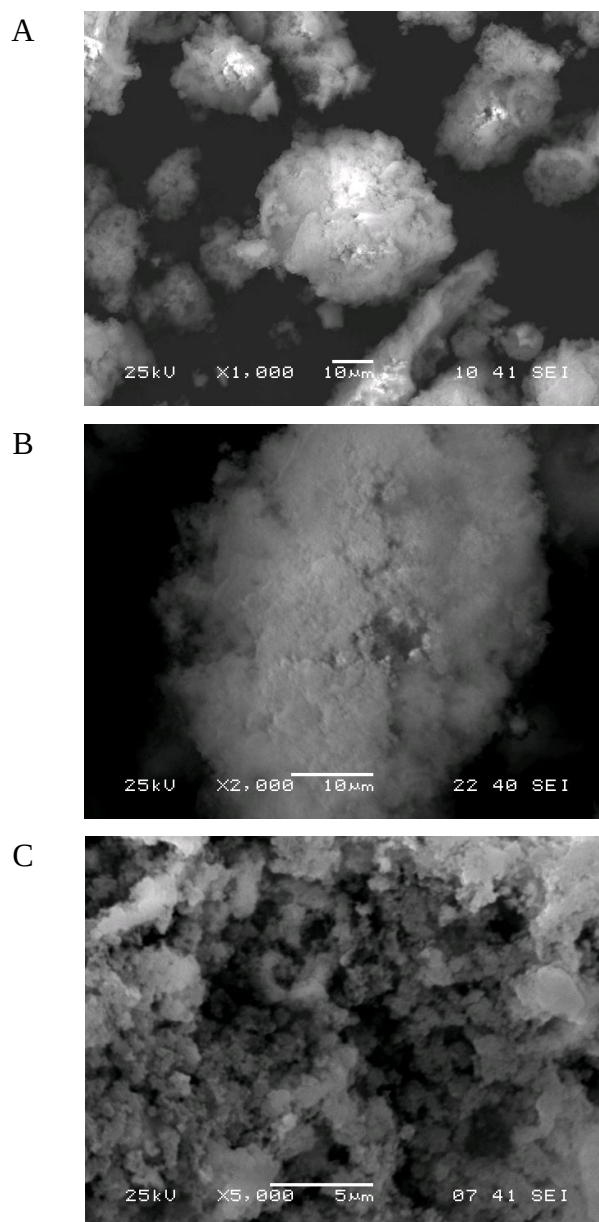
Minta	c [mg/ml]
Novozyme (435)	3,5
Chiral Vision (T2)	2,6
Adszorbeált (250-P)	6,2
Szol-Gél A12-P	2,3

Az 6. táblázat adatait és a 66. ábrán bemutatott eredményekkel összevetve látható, hogy az a TRX-100 detergenses kezelés során kapott mosófolyadékok fehérje tartalma követi az enzim készítmények maradó aktivitás értékeit. Az adszorpciós készítmény – amely leginkább elvesztette kezdeti enzim aktivitását – szűrlete tartalmazza a legtöbb proteint. Ezt követi a Novozyme szintén adszorpcióval előállított készítménye, majd közel azonos mértékű a Chiral Vision kovalensen CaL B katalizátorából és a saját turner szol-gél rendszerekből eltávolított fehérje mennyisége. A detergenses kezelés során kapott szilárd biokatalizátorok aktivitás változása és a mosó folyadékok fehérje tartalma között tehát egyértelmű a reláció. Az, hogy az aktivitásvesztés mértéke és a lemosott fehérje tartalom között nincs matematikailag egyenes arányosság, azzal magyarázható, hogy a Bradford módszer nem enzim specifikus, hanem az összes protein mennyiségét adja meg. A

kereskedelmi forgalomban kapható enzim készítményekről pedig korlátozottak az adataink, de ismert tény, hogy kommerciális célokra szánt enzimek előállításakor gyakran más fehérjével együtt (ez nagyon gyakran a BSA) rögzítik a katalitikus aktív enzimet, amelyekhez a Bradford reagens szintén kötődhet.

4.6. Szol-gél rögzített biokatalizátorok szerkezeti tulajdonságai

Az általam fejlesztett szol-gél immobilizált enzimkészítmények morfológiáját, szerkezetét Scanning Electron Microscope (SEM) segítségével vizsgáltam (68. ábra).



67. ábra: Szol-gél rögzített lipáz elektronmikroszkópos képe

A SEM felvételeken látható, hogy a szol-gél eljárással előállított készítmények szemcsemérete jellemzően 30-40 μm körül van (67. ábra, A). A nagyobb nagyításokon észrevehető, hogy szemcsék felszíne igen összetett, porózus szerkezetű, melyet a polimer háló struktúrája adhat (67. ábra, B, C). A pórusos felszín nagy fajlagos felületet biztosít, amely előnyösen befolyásolhatja a rögzített enzim katalitikus hatékonyságát.

5. Összefoglalás

TDK munkám során lipázok rögzítésére alkalmas szol-gél rendszerek fejlesztésével foglalkoztam. A szol-gél eljárás során alkoxiszilán prekursorok polimerizációjával gél állapotú közeg állítható elő, amely képes az enzimet magába zárni. Korábbi kutatásokból kiderült, hogy a szol-gél mátrix szerkezete, alkotói, a benne immobilizált enzim biokatalitikus tulajdonságaira és stabilitására is nagy hatással van. Munkám során célom volt egy szisztematikus, matematikailag jellemezhető kísérleti terv kidolgozása, amellyel a későbbiekben jól általánosítható szol-gél mátrix rendszerek alakíthatóak ki.

Lipázokat elterjedten alkalmaznak az ipari szintézisekben, humán gyógyászati célokra, ezért hatékony immobilizálásuk fontos feladat. Kísérleteim során Lipáz AK és CaL B enzimeket rögzítettem három különböző terner rendszerben, melyeket a Statistica programmal kiszámolt, három faktoros, 14 pontos, kétszeresen centralizált kísérleti tervvel optimalám három függő változóra vonatkoztatva: biokatalizátor aktivitás, enantiomertisztaság és enantiomerszelektivitás. Az így előállított enzim katalizátorokat racém aromás (1-feniletanol) és racém alifás (2-oktanol) alkoholok kinetikus reszolválásában teszteltem. Az eredmények azt mutatták, hogy a kísérletterv alkalmas lehet enzim-szubsztrát párosok optimalására, a megfelelő prekursorok megválasztásával a szol-gél rendszer enzimhez és a kívánt szubsztráthoz is alakítható, hatékony és szelektív átalakításokat eredményezve.

A modern biotechnológiai eljárások során nem csak a nagyfokú aktivitást, hanem a környezeti hatásokkal szembeni ellenálló képességet is megkövetelik. Ezért célom volt az általam fejlesztett enzimmészítményeket többértű igénybevételnek kitenni. Vizsgáltam a rögzített Lipáz AK és CaL B biokatalizátorok hőstabilitását szerves közegben, a visszaforgathatóságukat, valamint a rögzített CaL B biokatalizátorok felületaktív anyaggal végzett mosással szembeni ellenálló képességét. A vizsgálatok során a saját fejlesztésű szol-gél rendszereket, a szilikagélen adszorbeált enzimet, valamint a kereskedelmi forgalomban kapható készítményeket hasonlítottam össze.

A Lipáz AK és CaL B készítmények szerves közegbeli hőstabilitását 30-110 °C-ig közötti (20 °C-ként növelt) hőmérsékleteken végzett 2 órás kezelésekkkel vizsgáltam. A saját fejlesztésű biokatalizátorok (AK esetében: Szol-Gél-A10-P, CaL B esetében: Szol-Gél-A12-P) tekintve, hasonló jelleggel reagáltak a termikus igénybevételre; 70°C-on aktivitás növekedését mutattak, majd 110°C-on kezdeti aktivitásuk hozzávetőleg felét megőrzik.

A visszaforgathatóság vizsgálatánál a Lipáz AK esetében a rögzítetlen enzimhez képest mind a saját (Szol-Gél-A10-P), mind az adszorbeált készítmény könnyebben visszanyerhető volt, de a biokatalizátor aktivitás tekintetében egyértelműen a saját szol-gél készítmény bizonyult jobbnak. CaL B esetében a kereskedelmi készítmények jobban megőrzik aktivitásukat, mint a Lipáz AK esetében, de a harmadik kör után a szol-gél mátrix már nagyobb védelmet biztosít, még az erősnek mondható kovalens erővel rögzített enzimkészítménynél is.

A felületaktív anyaggal történő mosásnak a saját, szol-gél rögzített CaL B sokkal jobban ellenállt ($\Delta U_B = -23\%$), mint a kereskedelmi készítmények (Novozym 435: $\Delta U_B = -66\%$, Chiral Vision: $\Delta U_B = -32\%$), vagy a kutatócsoport adszorpciós készítménye (250P: $\Delta U_B = -97,3\%$).

Az elért eredmények összességében alátámasztják, hogy alkalmazott organoszilán prekursorok minőségének és arányának egyaránt jelentős hatása van a rögzített enzimek működésére, valamint a készítmények fizikai és hőstabilitására. Alkalmazásukkal hatékony és több szempontból stabil enzimkészítmények állíthatóak elő.

6. Függelék

1. *Rac-1a*: feniletanol

TEOS	DMDEOS	PTEOS	Kód	Enzyme	t h	c %	eeAc %	E	UB U/g
1	-	-	AUG1	CB	1	1,0	96,7	59,2	2,8
0,12	0,88		AUG2	CB	1	27,6	99,5	>>200	76,0
0,12	-	0,88	AUG3	CB	1	11,4	99,7	>>200	31,3
0,413	0,587	-	AUG4	CB	1	11,5	99,5	>200	31,6
0,413	-	0,587	AUG5	CB	1	11,5	99,4	>200	31,6
0,12	0,293	0,587	AUG6	CB	1	30,8	99,5	>>200	84,8
0,707	0,293	-	AUG7	CB	1	2,2	97,9	94,3	6,2
0,707	-	0,293	AUG8	CB	1	5,1	99,3	>200	14,1
0,12	0,587	0,293	AUG9	CB	1	19,2	99,3	>200	53,0
0,413	0,293	0,293	AUG10	CB	1	13,0	99,4	>200	35,9
0,707	0,147	0,147	AUG11	CB	1	1,4	97,1	68,3	4,0
0,267	0,587	0,147	AUG12	CB	1	18,2	99,4	>200	50,1
0,267	0,147	0,587	AUG13	CB	1	1,3	95,3	41,2	3,6
0,413	0,293	0,293	AUG14	CB	1	13,1	99,5	>200	36,2

TEOS	DMDEOS	OTEOS	Kód	Enzyme	t h	c %	eeAc %	E	UB U/g
1	-	-	AUG1	CB	1	1,1	96,7	61,2	2,9
0,12	0,88		AUG2	CB	1	26,4	99,7	>>200	72,8
0,12	-	0,88	AUG3	CB	1	4,8	99,0	>200	13,2
0,413	0,587	-	AUG4	CB	1	12,1	99,6	>>200	33,4
0,413	-	0,587	AUG5	CB	1	8,6	99,2	>200	23,8
0,12	0,293	0,587	AUG6	CB	1	11,3	99,6	>>200	31,3
0,707	0,293	-	AUG7	CB	1	2,5	98,1	>100	6,9
0,707	-	0,293	AUG8	CB	1	6,3	99,1	>200	17,4
0,12	0,587	0,293	AUG9	CB	1	23,0	99,8	>>200	63,3
0,413	0,293	0,293	AUG10	CB	1	8,8	99,5	>200	24,4
0,707	0,147	0,147	AUG11	CB	1	6,9	99,2	>200	19,1
0,267	0,587	0,147	AUG12	CB	1	13,3	99,6	>>200	36,7
0,267	0,147	0,587	AUG13	CB	1	0,5	86,9	14,4	1,4
0,413	0,293	0,293	AUG14	CB	1	7,3	99,4	>200	20,1

1. *Rac-1a*: feniletanol

TEOS	OTEOS	PTEOS	Kód	Enzyme	t h	c %	eeAc %	E	UB U/g
1	-	-	AUG1	CB	1	1,0	96,5	55,6	2,7
0,12	0,88		AUG2	CB	1	4,3	99,0	>100	12,0
0,12	-	0,88	AUG3	CB	1	12,6	99,4	>200	34,6
0,413	0,587	-	AUG4	CB	1	9,2	99,1	>200	25,5
0,413	-	0,587	AUG5	CB	1	13,5	99,5	>200	37,1
0,12	0,293	0,587	AUG6	CB	1	8,1	99,4	>200	22,3
0,707	0,293	-	AUG7	CB	1	6,5	99,3	>200	18,0
0,707	-	0,293	AUG8	CB	1	4,5	99,5	>200	12,4
0,12	0,587	0,293	AUG9	CB	1	1,5	98,5	>100	4,3
0,413	0,293	0,293	AUG10	CB	1	15,8	99,5	>200	43,6
0,707	0,147	0,147	AUG11	CB	1	6,3	99,2	>200	17,4
0,267	0,587	0,147	AUG12	CB	1	2,8	98,8	>100	7,8
0,267	0,147	0,587	AUG13	CB	1	17,8	99,5	>200	49,0
0,413	0,293	0,293	AUG14	CB	1	14,5	99,5	>200	40,0

TEOS	DMDEOS	PTEOS	Kód	Enzyme	t h	c %	eeAc %	E	UB U/g
1	-	-	AUG1	AK	1	0,8	97,0	66,4	2,1
0,12	-	0,88	AUG3	AK	1	34,5	99,6	>>200	95,0
0,413	0,587	-	AUG4	AK	1	39,7	99,8	>>200	109,5
0,413	-	0,587	AUG5	AK	1	20,7	99,6	>>200	57,1
0,12	0,293	0,587	AUG6	AK	1	44,6	98,8	>200	122,8
0,707	0,293	-	AUG7	AK	1	22,4	99,7	>>200	61,8
0,707	-	0,293	AUG8	AK	1	2,6	99,1	>200	7,1
0,413	0,293	0,293	AUG10	AK	1	8,4	99,5	>200	23,1
0,707	0,147	0,147	AUG11	AK	1	0,2	88,0	15,7	0,7
0,267	0,587	0,147	AUG12	AK	1	14,1	99,5	>200	38,9
0,267	0,147	0,587	AUG13	AK	1	16,3	99,3	>200	44,8
0,413	0,293	0,293	AUG14	AK	1	8,5	99,6	>>200	23,3

1. *Rac-1a*: feniletanol

TEOS	DMDEOS	OTEOS	Kód	Enzyme	t h	c %	eeAc %	E	UB U/g
1	-	-	AUG10	AK	1	0,8	97,2	70,4	2,2
0,413	0,587	-	AUG40	AK	1	40,8	99,7	>>200	112,4
0,413	-	0,587	AUG50	AK	1	17,6	99,2	>200	48,4
0,12	0,293	0,587	AUG60	AK	1	2,5	98,3	>100	6,8
0,707	0,293	-	AUG70	AK	1	22,1	99,2	>>200	60,9
0,707	-	0,293	AUG80	AK	1	4,2	98,9	>100	11,5
0,12	0,587	0,293	AUG90	AK	1	0,3	91,3	22,1	0,8
0,413	0,293	0,293	AUG100	AK	1	5,3	97,5	95,7	14,6
0,707	0,147	0,147	AUG110	AK	1	0,5	94,7	37,3	1,4
0,267	0,587	0,147	AUG120	AK	1	25,0	99,3	>200	68,9
0,267	0,147	0,587	AUG130	AK	1	26,5	98,9	>200	73,0
0,413	0,293	0,293	AUG140	AK	1	5,5	97,5	81,0	15,0

TEOS	OTEOS	PTEOS	Kód	Enzyme	t h	c %	eeAc %	E	UB U/g
1	-	-	AUG1	AK	1	0,8	97,1	68,8	2,2
0,12	0,88	-	AUG2	AK	1	35,7	99,7	>>200	98,3
0,12	-	0,88	AUG3	AK	1	39,3	98,4	>200	108,3
0,413	0,587	-	AUG4	AK	1	20,9	99,4	>>200	57,6
0,413	-	0,587	AUG5	AK	1	19,3	99,1	>200	53,2
0,12	0,293	0,587	AUG6	AK	1	38,5	98,4	>200	106,1
0,707	0,293	-	AUG7	AK	1	3,4	99,1	>200	9,3
0,707	-	0,293	AUG8	AK	1	4,1	98,4	>100	11,3
0,12	0,587	0,293	AUG9	AK	1	46,0	97,4	>100	126,8
0,413	0,293	0,293	AUG10	AK	1	35,8	98,0	>100	98,6
0,707	0,147	0,147	AUG11	AK	1	6,3	99,4	>200	17,3
0,267	0,587	0,147	AUG12	AK	1	38,7	98,6	>200	106,6
0,267	0,147	0,587	AUG13	AK	1	40,3	98,5	>200	111,2
0,413	0,293	0,293	AUG14	AK	1	34,2	98,3	>100	94,2

2. *Rac-1b*: 2-oktanol

TEOS	DMDEOS	PTEOS	Kód	Enzyme	t h	c %	eeAc %	E	UB U/g
1	-	-	AUG1	AK	1	0,3	60,8	4,1	0,7
0,12	-	0,88	AUG3	AK	1	19,8	61,9	4,9	41,6
0,413	0,587	-	AUG4	AK	1	4,0	54,5	3,5	8,3
0,413	-	0,587	AUG5	AK	1	5,2	53,1	3,4	11,0
0,12	0,293	0,587	AUG6	AK	1	38,5	55,2	4,8	80,9
0,707	0,293	-	AUG7	AK	1	1,3	52,7	3,3	2,8
0,707	-	0,293	AUG8	AK	1	0,9	64,7	4,7	1,9
0,413	0,293	0,293	AUG9	AK	1	5,1	52,5	3,3	10,6
0,707	0,147	0,147	AUG10	AK	1	0,2	65,9	4,9	0,4
0,267	0,587	0,147	AUG11	AK	1	7,0	62,4	4,5	14,7
0,267	0,147	0,587	AUG12	AK	1	6,7	57,8	3,9	14,0
0,413	0,293	0,293	AUG13	AK	1	4,8	52,7	3,3	10,1

TEOS	DMDEOS	OTEOS	Kód	Enzyme	t h	c %	eeAc %	E	UB U/g
1	0	0	AUG1	AK	1	0,3	56,9	3,6	0,5
0,413	0,587	0	AUG4	AK	1	4,3	53,0	3,3	8,9
0,413	0	0,587	AUG5	AK	1	10,4	56,8	3,9	21,8
0,12	0,293	0,587	AUG6	AK	1	24,2	57,0	4,4	50,8
0,707	0,293	0	AUG7	AK	1	1,1	52,2	3,2	2,3
0,707	0	0,293	AUG8	AK	1	2,3	59,8	4,0	4,8
0,12	0,587	0,293	AUG9	AK	1	28,3	57,4	4,6	59,4
0,413	0,293	0,293	AUG10	AK	1	20,9	61,2	4,9	43,9
0,707	0,147	0,147	AUG11	AK	1	0,7	58,4	3,8	1,5
0,267	0,587	0,147	AUG12	AK	1	14,5	58,8	4,2	30,4
0,267	0,147	0,587	AUG13	AK	1	21,9	56,6	4,2	45,9
0,413	0,293	0,293	AUG14	AK	1	21,1	58,5	4,4	44,3

2. *Rac-1b*: 2-oktanol

TEOS	PTEOS	OTEOS	Kód	Enzyme	t h	c %	eeAc %	E	UB U/g
1	-	-	AUG1	AK	1	0,4	52,9	3,3	0,9
0,12	0,88		AUG2	AK	1	23,0	56,5	4,2	48,4
0,12	-	0,88	AUG3	AK	1	20,8	47,9	3,2	43,8
0,413	0,587	-	AUG4	AK	1	5,8	49,7	3,1	12,1
0,413	-	0,587	AUG5	AK	1	9,1	59,4	4,2	19,1
0,12	0,293	0,587	AUG6	AK	1	18,3	50,5	3,4	38,4
0,707	0,293	-	AUG7	AK	1	1,0	57,7	3,7	2,0
0,707	-	0,293	AUG8	AK	1	2,7	57,0	3,7	5,7
0,12	0,587	0,293	AUG9	AK	1	27,8	53,2	4,0	58,3
0,413	0,293	0,293	AUG10	AK	1	20,3	57,6	4,3	42,6
0,707	0,147	0,147	AUG11	AK	1	1,7	56,3	3,6	3,7
0,267	0,587	0,147	AUG12	AK	1	19,7	56,6	4,1	41,4
0,267	0,147	0,587	AUG13	AK	1	18,6	54,4	3,8	39,1
0,413	0,293	0,293	AUG14	AK	1	17,3	60,6	4,6	36,3

TEOS	DMDEOS	PTEOS	Kód	Enzyme	t h	c %	eeAc %	E	UB U/g
1	-	-	AUG1	CB	1	0,1	70,6	5,8	0,2
0,12	0,88		AUG2	CB	1	33,3	99,6	>>200	70,0
0,12	-	0,88	AUG3	CB	1	0,5	83,8	11,4	1,1
0,413	0,587	-	AUG4	CB	1	13,2	99,3	>200	27,6
0,413	-	0,587	AUG5	CB	1	12,8	99,2	>200	26,8
0,12	0,293	0,587	AUG6	CB	1	16,2	99,6	>>200	34,0
0,707	0,293	-	AUG7	CB	1	1,7	93,5	30,4	3,5
0,707	-	0,293	AUG8	CB	1	8,6	99,4	>200	18,0
0,12	0,587	0,293	AUG9	CB	1	22,7	99,9	>>200	47,7
0,413	0,293	0,293	AUG10	CB	1	11,1	96,6	64,2	23,3
0,707	0,147	0,147	AUG11	CB	1	0,7	79,6	8,8	1,5
0,267	0,587	0,147	AUG12	CB	1	14,5	97,4	90,0	30,5
0,267	0,147	0,587	AUG13	CB	1	1,0	86,0	13,4	2,0
0,413	0,293	0,293	AUG14	CB	1	10,0	96,7	66,2	20,9

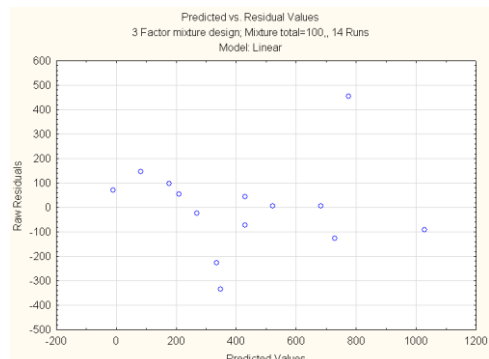
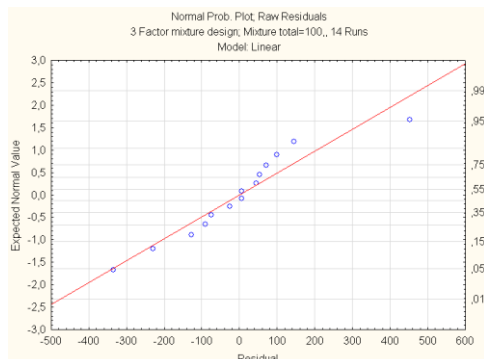
2. *Rac-1b*: 2-oktanol

TEOS	DMDEOS	OTEOS	Kód	Enzyme	t h	c %	eeAc %	E	UB U/g
1	-	-	AUG1	CB	1	0,1	75,0	7,0	0,2
0,12	0,88		AUG2	CB	1	32,1	99,8	>>200	67,5
0,12	-	0,88	AUG3	CB	1	38,4	99,7	>>200	80,6
0,413	0,587	-	AUG4	CB	1	14,3	99,8	>>200	30,1
0,413	-	0,587	AUG5	CB	1	16,5	99,6	>>200	34,7
0,12	0,293	0,587	AUG6	CB	1	5,7	99,8	>>200	11,9
0,707	0,293	-	AUG7	CB	1	1,3	93,2	28,6	2,8
0,707	-	0,293	AUG8	CB	1	4,9	99,8	>>200	10,4
0,12	0,587	0,293	AUG9	CB	1	26,7	99,8	>>200	56,1
0,413	0,293	0,293	AUG10	CB	1	11,3	99,7	>>200	23,8
0,707	0,147	0,147	AUG11	CB	1	7,7	99,9	>>200	16,2
0,267	0,587	0,147	AUG12	CB	1	10,1	99,8	>>200	21,2
0,267	0,147	0,587	AUG13	CB	1	0,6	95,4	42,4	1,2
0,413	0,293	0,293	AUG14	CB	1	10,4	99,3	>200	21,8

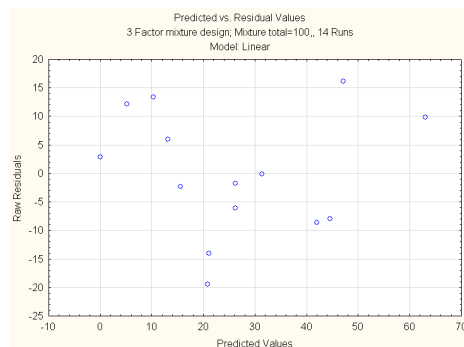
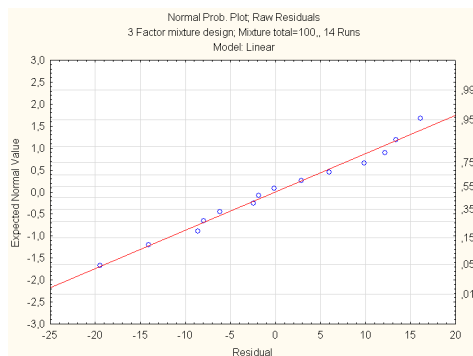
TEOS	PTEOS	OTEOS	Kód	Enzyme	t h	c %	eeAc %	E	UB U/g
1	-	-	AUG1	CB	1	0,1	72,0	6,2	0,2
0,12	0,88		AUG2	CB	1	0,7	83,3	11,0	1,5
0,12	-	0,88	AUG3	CB	1	34,5	99,7	>>200	72,4
0,413	0,587	-	AUG4	CB	1	10,8	98,9	>100	22,6
0,413	-	0,587	AUG5	CB	1	18,7	99,8	>>200	39,2
0,12	0,293	0,587	AUG6	CB	1	6,2	99,3	>200	12,9
0,707	0,293	-	AUG7	CB	1	8,4	99,4	>200	17,7
0,707	-	0,293	AUG8	CB	1	4,3	99,6	>>200	9,0
0,12	0,587	0,293	AUG9	CB	1	0,9	98,0	98,8	1,9
0,413	0,293	0,293	AUG10	CB	1	14,8	99,8	>>200	31,0
0,707	0,147	0,147	AUG11	CB	1	6,7	99,7	>>200	14,0
0,267	0,587	0,147	AUG12	CB	1	1,8	99,2	>200	3,9
0,267	0,147	0,587	AUG13	CB	1	15,6	99,8	>>200	32,7
0,413	0,293	0,293	AUG14	CB	1	16,6	99,8	>>200	34,8

3. CaL B immobilizálása TEOS/OTEOS/PTEOS terner prekursor elegyből felépített szol-gél rendszerekben. Gauss hálós ábra, és reziduumok ábrázolása a mérések sorrendjében.

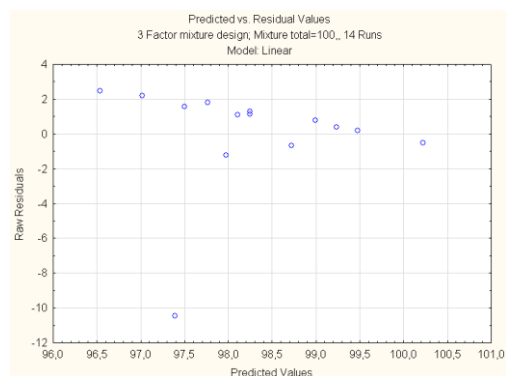
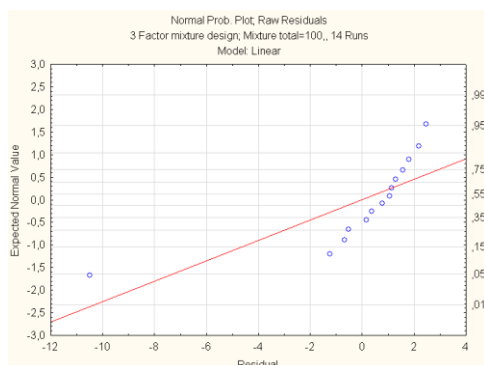
Rac-1a: enantiomerszelektivitás



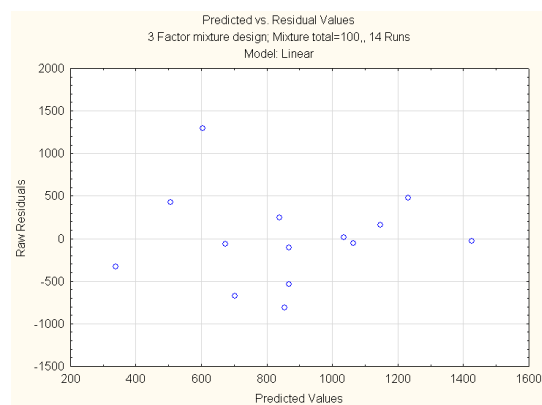
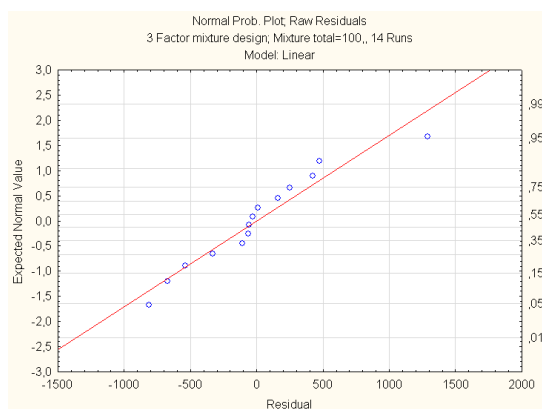
Rac-1a: biokatalizátor aktivitás



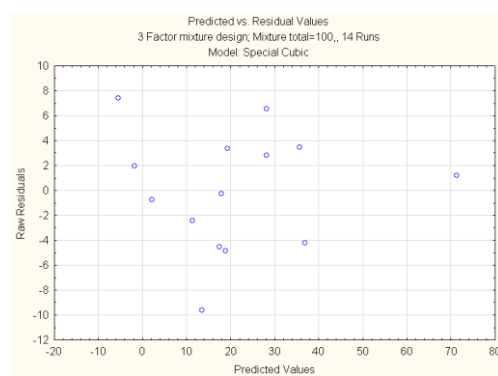
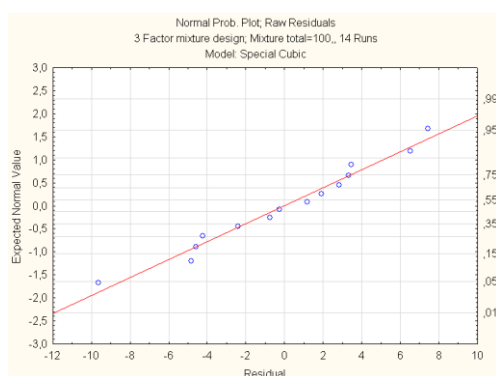
Rac-1a: enantiomertisztaság



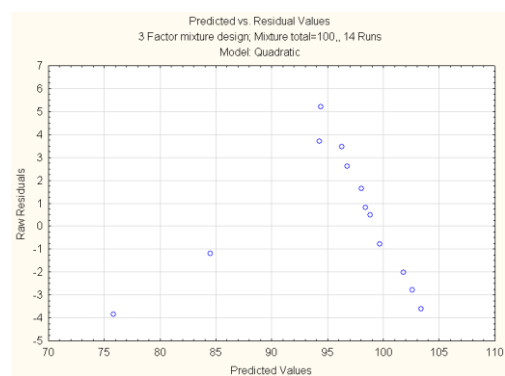
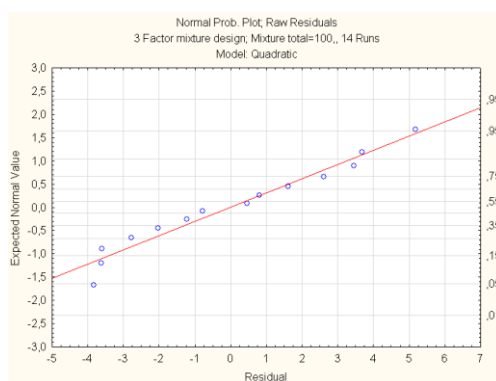
Rac-1b: enantiomerszelektivitás



Rac-1b: biokatalizátor aktivitás

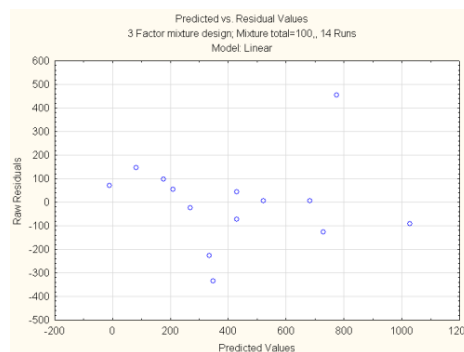
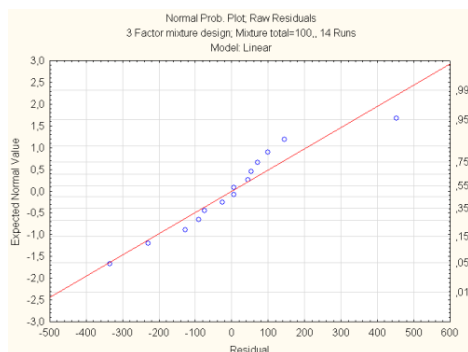


Rac-1b: enantiomertisztaság

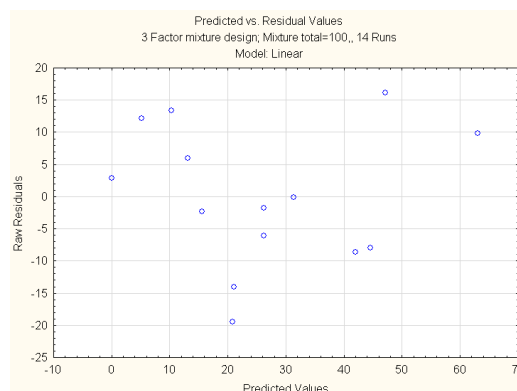
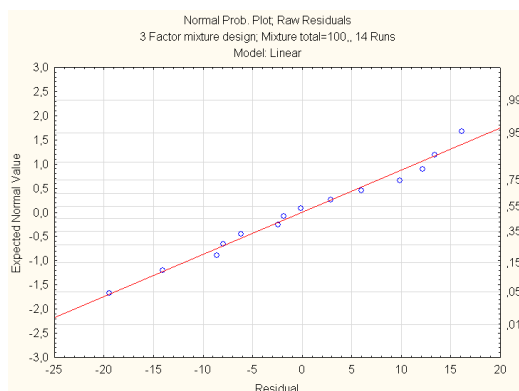


4. CaL B immobilizálása TEOS/DMDEOS/OTEOS terner prekursor elegyből felépített szol-gél rendszerekben. Gauss hálós ábra, és reziduumok ábrázolása a mérések sorrendjében.

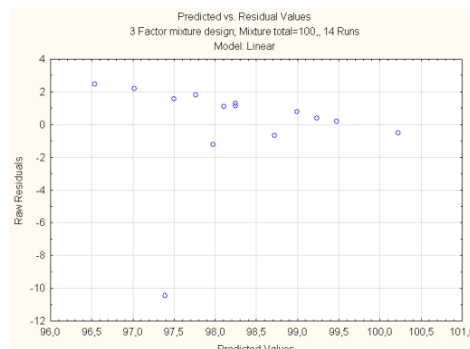
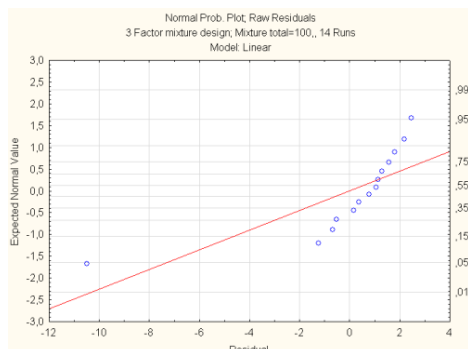
Rac-1a: enantiomerszelektivitás



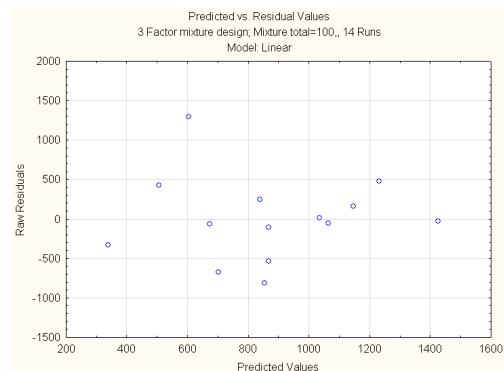
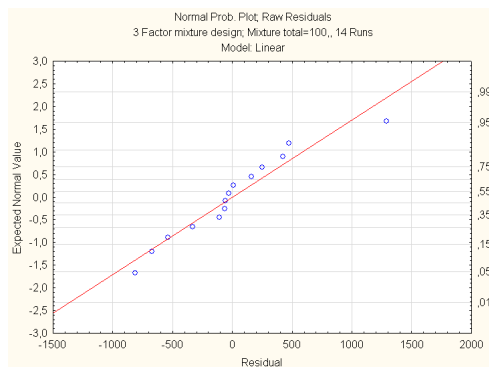
Rac-1a: biokatalizátor aktivitás



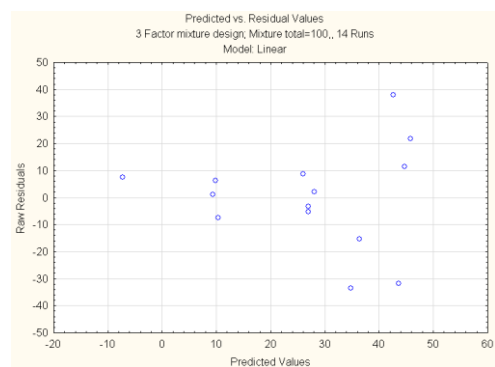
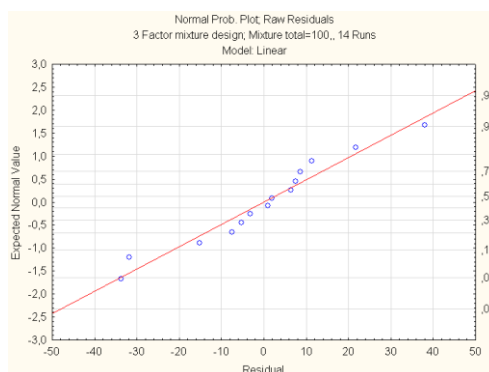
Rac-1a: enantiomertisztaság



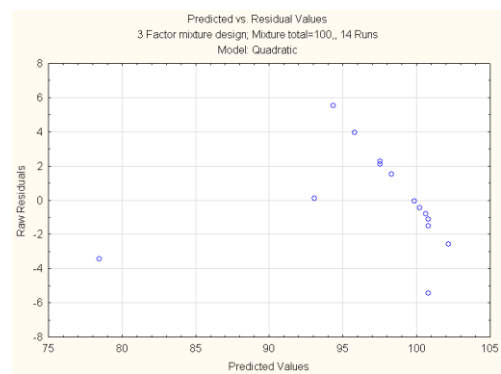
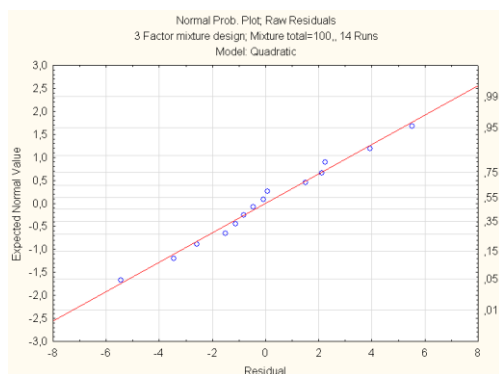
Rac-1b: enantiomerszelektivitás



Rac-1b: biokatalizátor aktivitás

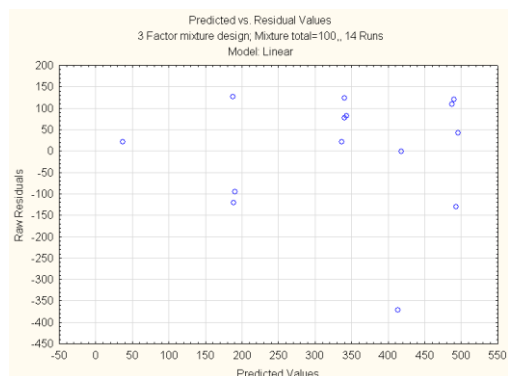
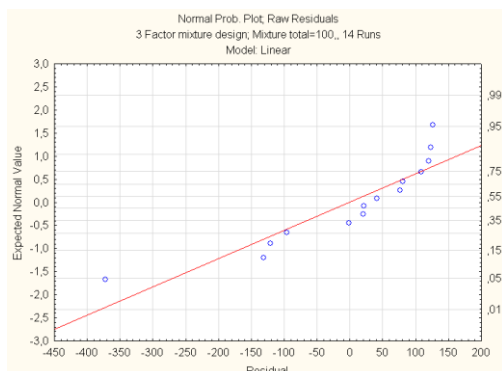


Rac-1b: enantiomertisztaság

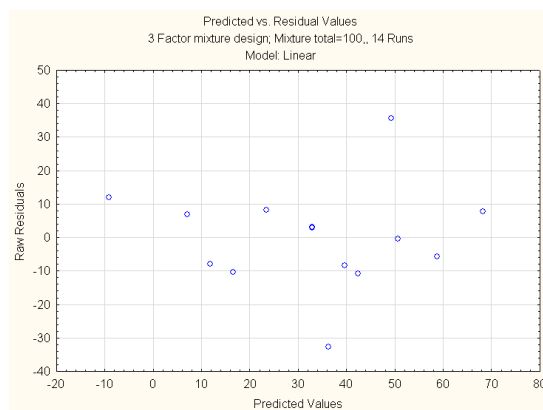
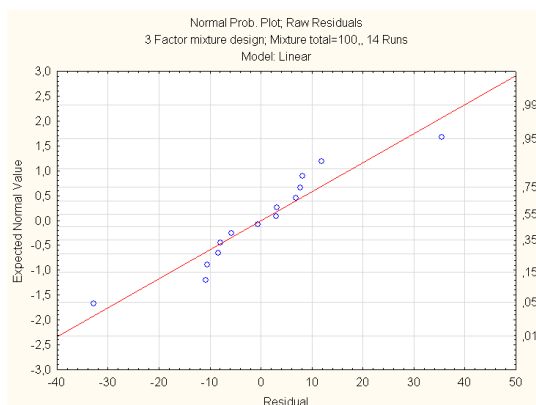


5. CaL B immobilizálása TEOS/DMDEOS/PTEOS terner prekursor elegyből felépített szol-gél rendszerekben. Gauss hálós ábra, és reziduumok ábrázolása a mérések sorrendjében.

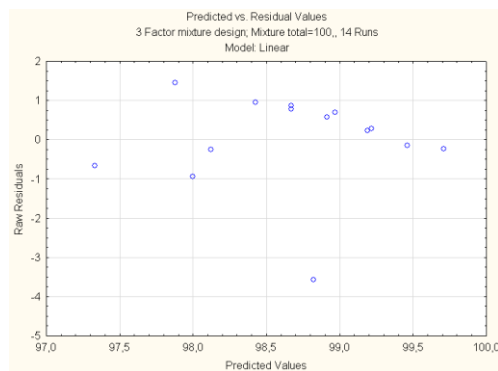
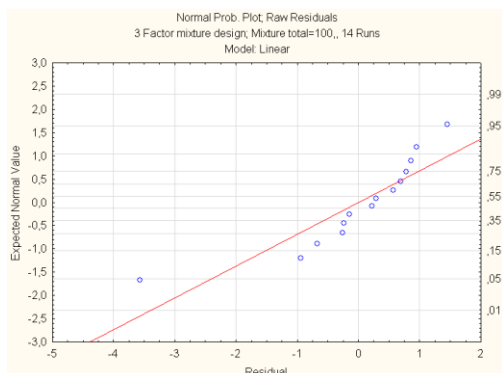
Rac-1a: enantiomerszelektivitás



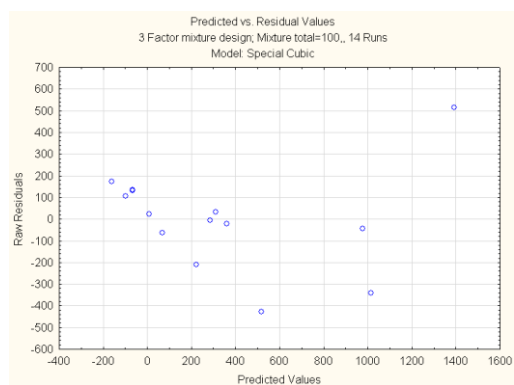
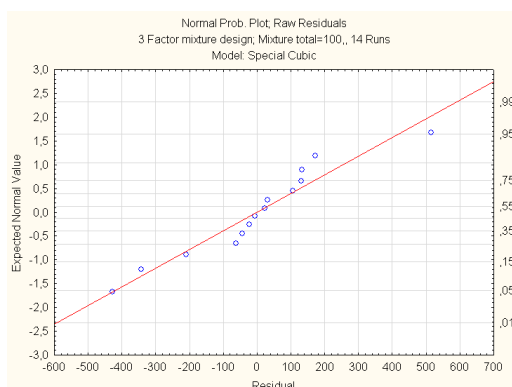
Rac-1a: biokatalizátor aktivitás



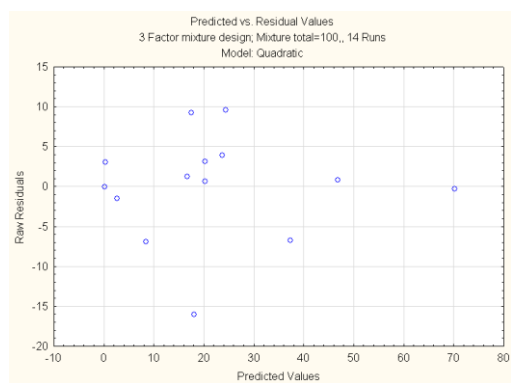
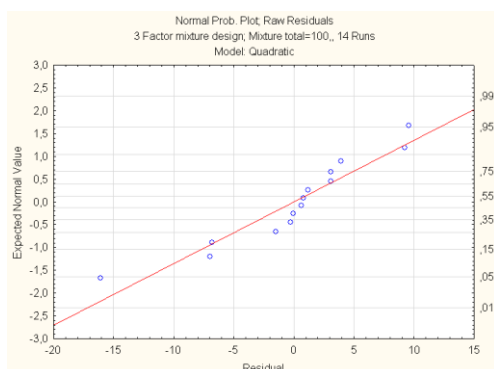
Rac-1a: enantiomertisztaság



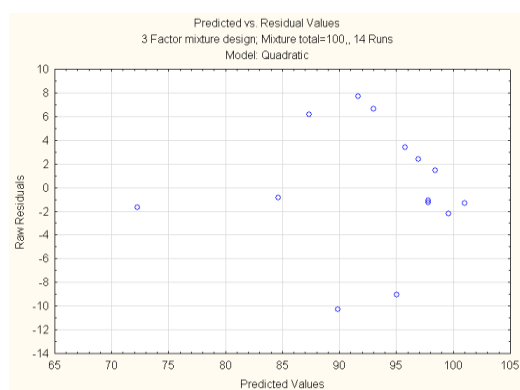
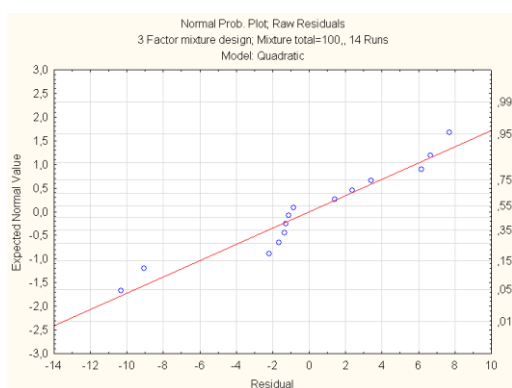
Rac-1b: enantiomerszelektivitás



Rac-1b: biokatalizátor aktivitás

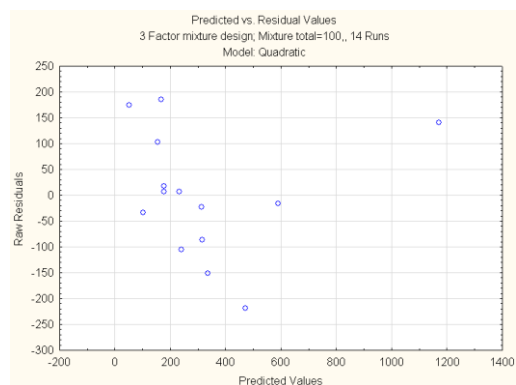
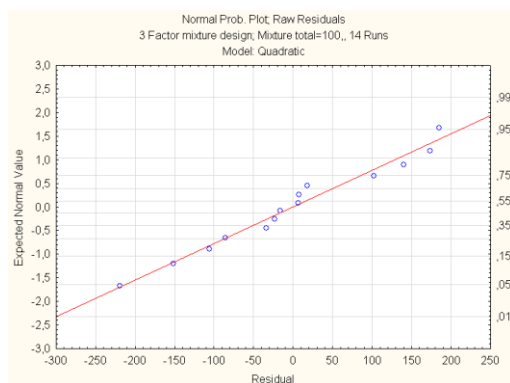


Rac-1b: enantiomertisztaság

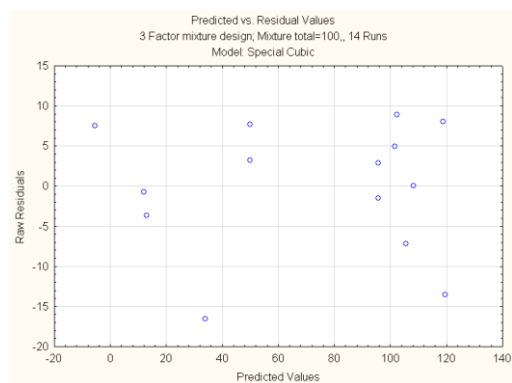
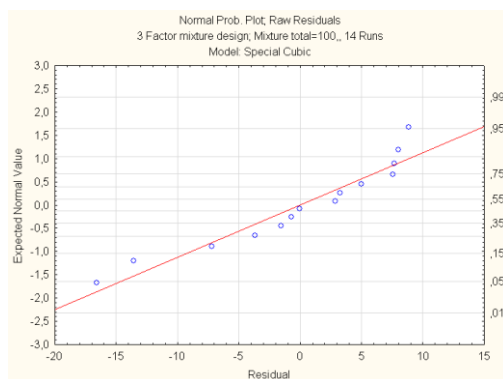


6. Lipáz AK immobilizálása TEOS/PTEOS/OTEOS terner prekursor elegyből felépített szol-gél rendszerekben. Gauss hálós ábra, és reziduumok ábrázolása a mérések sorrendjében.

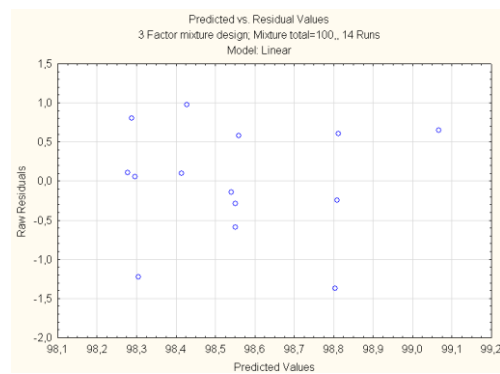
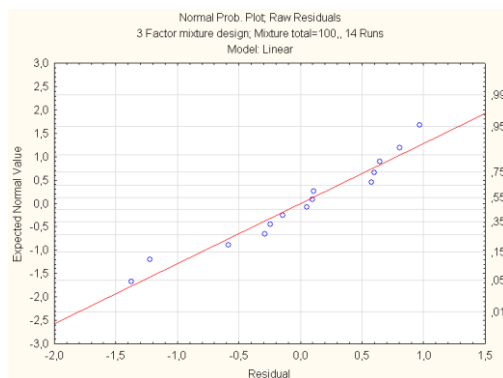
Rac-1a: enantiomerszelektivitás



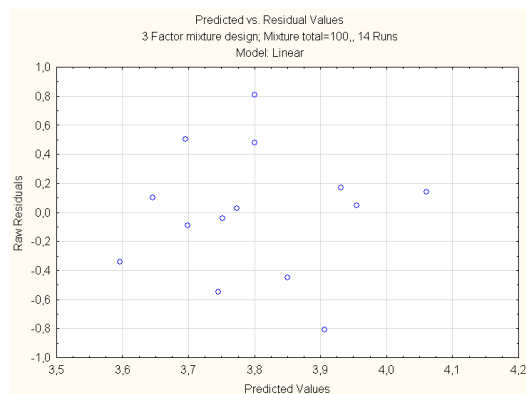
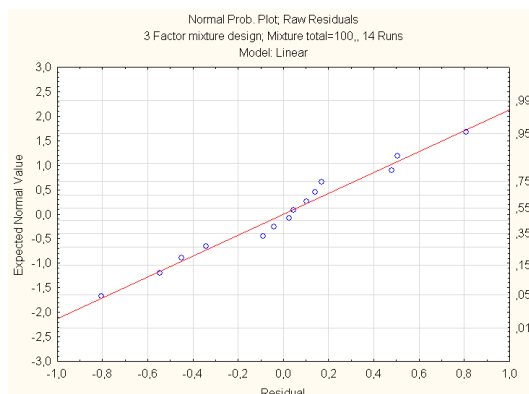
Rac-1a: biokatalizátor aktivitás



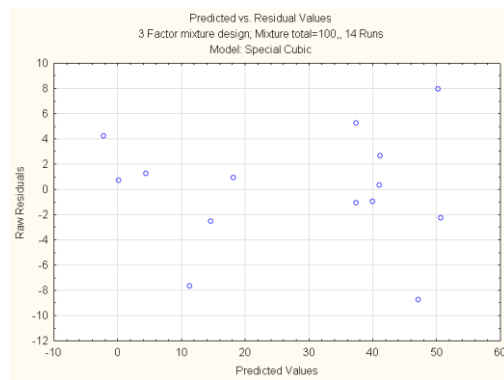
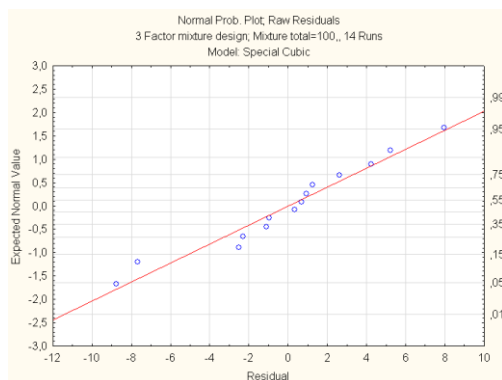
Rac-1a: enantiomertisztaság



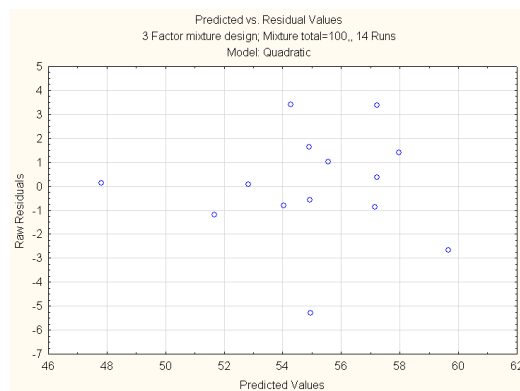
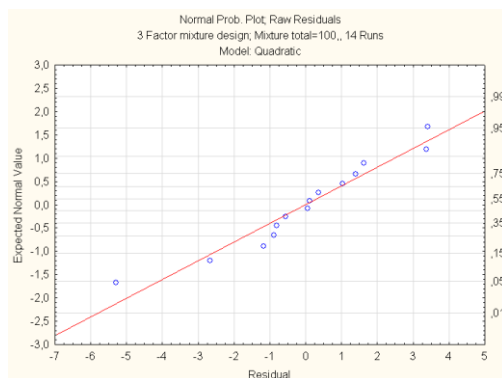
Rac-1b: enantiomerszelektivitás



Rac-1b: biokatalizátor aktivitás

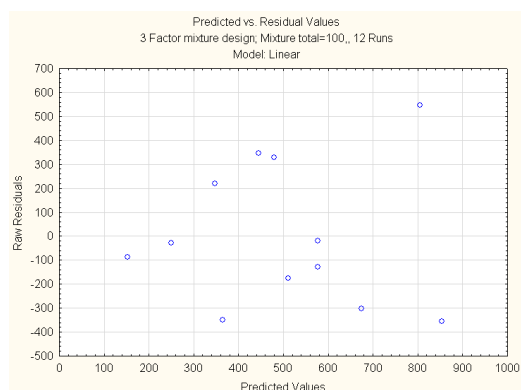
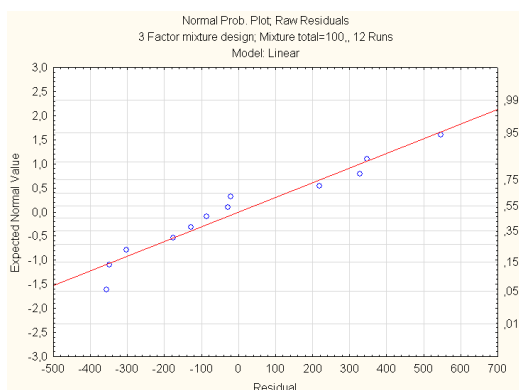


Rac-1b: enantiomertisztaság

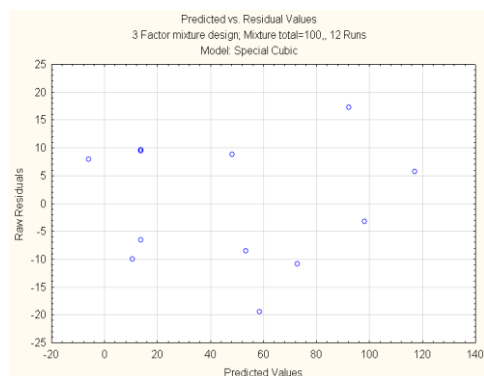
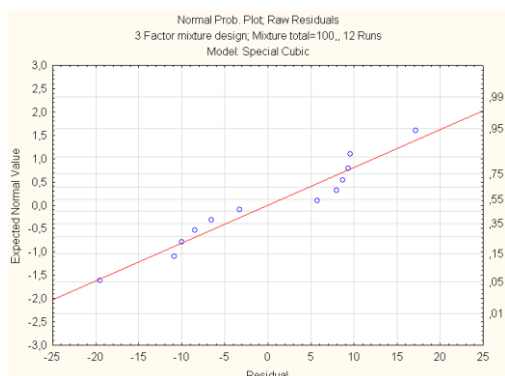


7. Lipáz AK immobilizálása TEOS/DMDEOS/PTEOS terner prekursor elegyből felépített szol-gél rendszerekben. Gauss hálós ábra, és reziduumok ábrázolása a mérések sorrendjében.

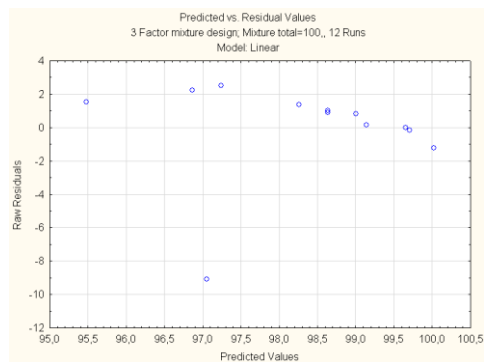
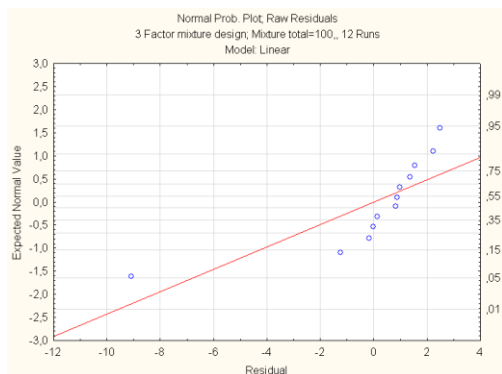
Rac-1a: enantiomerszelektivitás



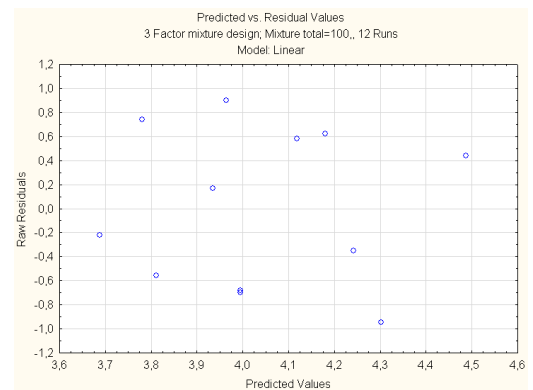
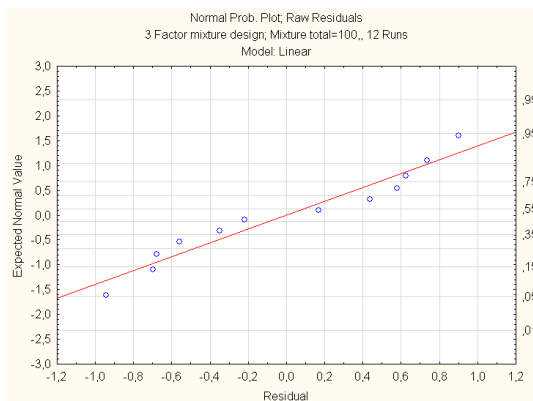
Rac-1a: biokatalizátor aktivitás



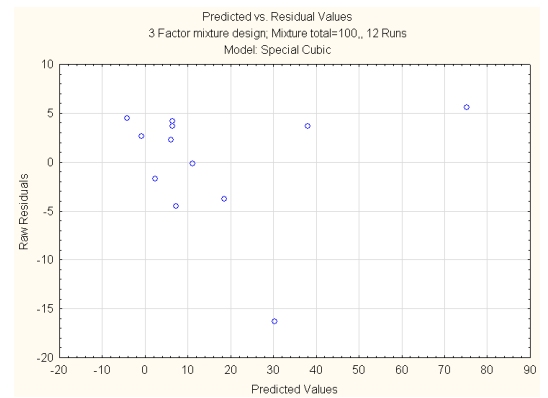
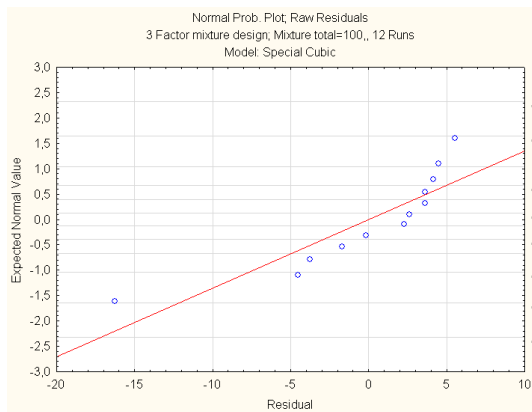
Rac-1a: enantiomertisztaság



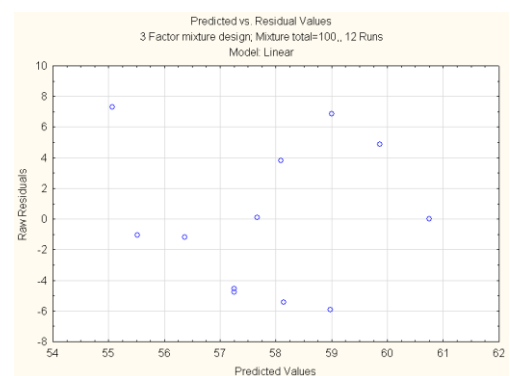
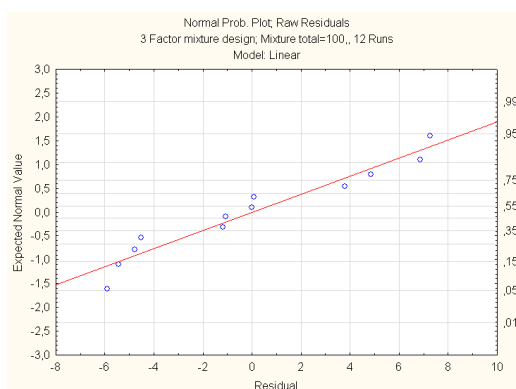
Rac-1b: enantiomerszelektivitás



Rac-1b: biokatalizátor aktivitás

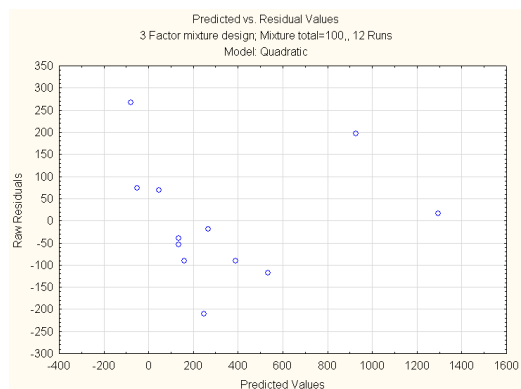
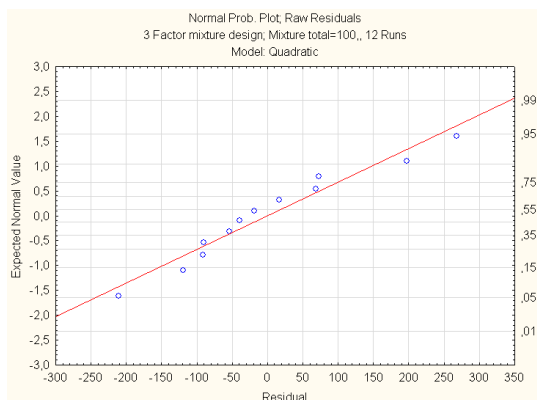


Rac-1b: enantiomertisztaság

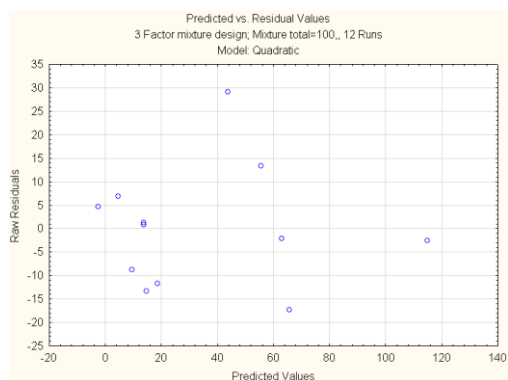
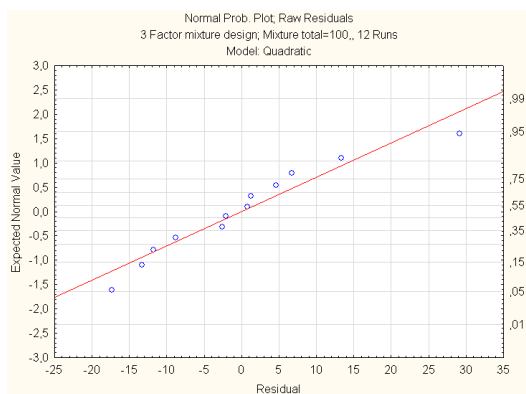


8. Lipáz AK immobilizálása TEOS/DMDEOS/OTEOS terner prekursor elegyből felépített szol-gél rendszerekben. Gauss hálós ábra, és reziduumok ábrázolása a mérések sorrendjében.

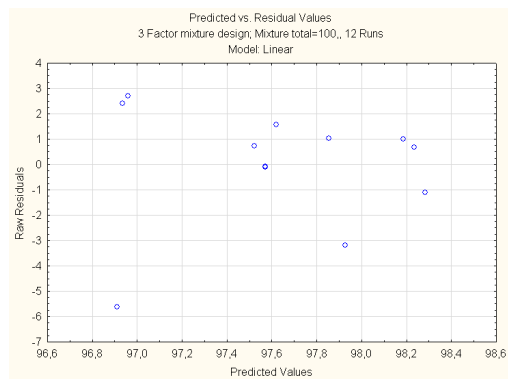
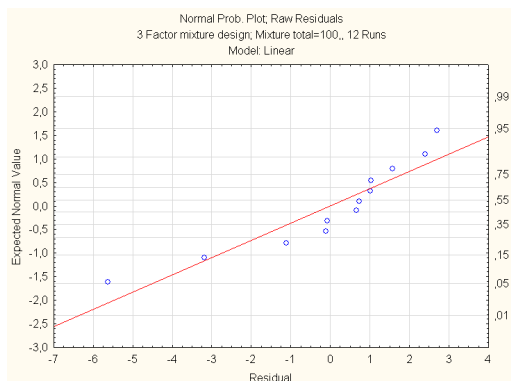
Rac-1a: enantiomerszelektivitás



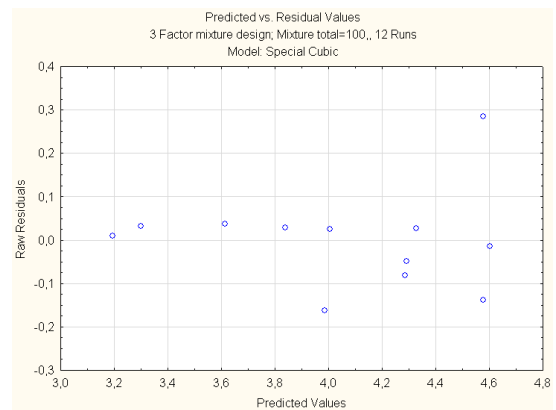
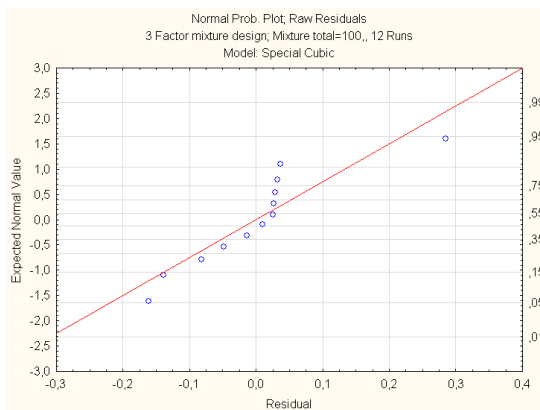
Rac-1a: biokatalizátor aktivitás



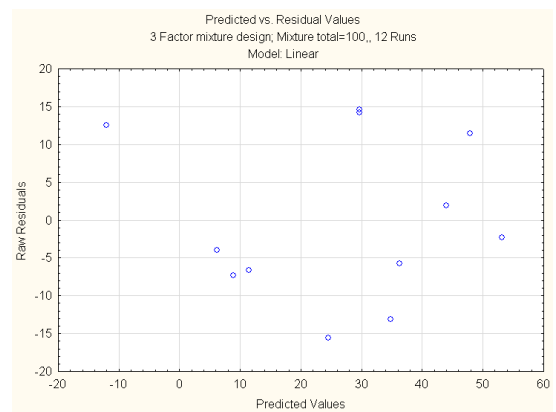
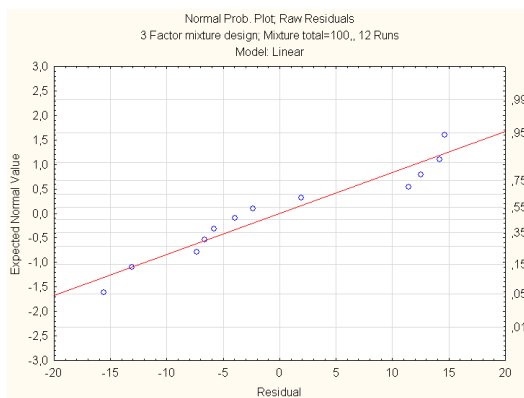
Rac-1a: enantiomertisztaság



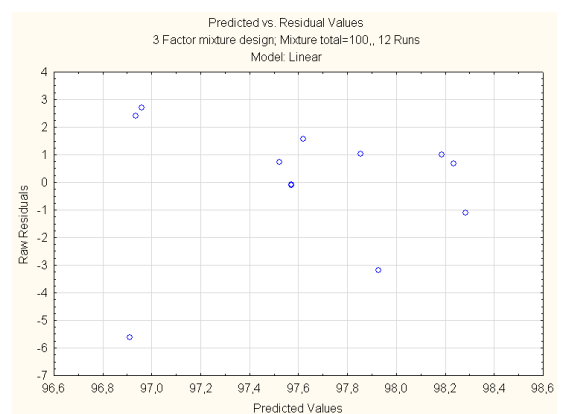
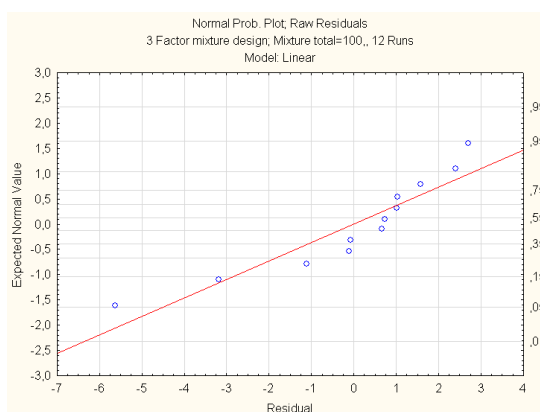
Rac-1b: enantiomerszelektivitás



Rac-1b: biokatalizátor aktivitás



Rac-1a: enantiomertisztaság



7. Felhasznált irodalom:

- [1] Poppe, L., Novák, L. *Biokatalízis a szintetikus szerves kémiában; A kémia újabb eredményei*, **1991**, (Akadémia Kiadó - Budapest).
- [2] Poppe, L., Novák, L. *Selective Biocatalysis: A Syntetic Approach*, **1992**, (VCH: Weinheim-New York).
- [3] Boross, L., Sisak, Cs., Szajáni, B., *Szilárd fázisú biokatalizátorok*, **2008**, (Akadémia Kiadó - Budapest).
- [4] Weiser, D., Boros, Z., Hornyánszky, G., Tóth, A., Poppe, L., *Process Biochemistry*, **2012**, 47, 428-434.
- [5] Faber, K. *Biotransformations in organic chemistry*, (5th ed.) **2004**, Springer, Berlin
- [6] Faigl, F., Szeghy, L., Kovács, E., Mátravölgyi, B., *Gyógyszerek*, **2011**, (Typotex Kiadó).
- [7] Andrew Lee L, Wang Q. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **2006**, 2, 137– 49.
- [8] Costello, E., Greenhalf, W., Neoptolemos, J.P., *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, August **2012**, 9 (8), 435-444.
- [9] Pieters, R., Hunger S. P., Boos J., Rizzari, C., Silverman, L., Baruchel, A., Goekbuget, N., Schrappe, M., Pui, C.H., *Cancer*, January 15, **2011**.
- [10] Liu, Y., Matharu, Z., Howland, M. C., Revzin, A., Simonian, A. L., *Anal Bioanal Chem*, **2012**, 404, 1181–1196.
- [11] Anjum Qureshia,*, Yasar Gurbuzb, Javed H. Niazia, *Sensors and Actuators*, **2012**, 171-172, 62– 76.
- [12] Jamal, M., Shaikh, F. M., Aslama, B., Kafil, M., *Razeeba Anal. Methods*, **2012**, 4, 1865.
- [13] Ricaa, R., Ailia, D., Stevensa, M. M., *Advanced Drug Delivery Reviews* August **2012**, 64 (11), 967–978.
- [14] Pathak, Y., Thassu, D., *Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Informa Healthcare USA*, **2009**.
- [15] Buzas, Z., *Magyar Orvos*, **2010**, 2, 37-40.
- [16] Schmid, R.D., Verger, R., *Angew Chem Int Ed*, **1998**, 37, 1608–1633.
- [17] Kulkarni, M.G., Dalai, A.K., *Ind Eng Chem Res*, **2006**, 45, 2901–2913.
- [18] Reetz, M.T., *Curr Opin Chem Biol*, **2002**, 6, 145–150.
- [19] Arendt, T., Fölsch E.R., *Oxford: Blackwell Science*, **2002**, 395-402.

- [20] Kovács, A., Takács, T., *Orvosképzés*, **1993**, 68, 169-76.
- [21] Sarkadi, L., *Biokémia mérnöki szemmel*, **2007**, Typotex Kiadó.
- [22] Sevella, B., *Biomérnöki műveletek és folyamatok*, **2011**, Typotex Kiadó.
- [23] Rakels, J. L. L., Straathof, A. J. J., Heijnen, J. J., *Enzyme and Microbial Technology*, December **1993**, 15 (12), 1051-1056.
- [24] Rodgers, L. E., Knott, R. B., Holden, P. J., Pike, K. J., Hanna, J. V., Foster, L.J.R., *Physica B*, **2006**, 386, 508–510.
- [25] Hanefeld, U., Gardossi, L., Magner, E., *Chem Soc Rev*, **2009**, 38, 453–468.
- [26] Nouredдини, H., Gao, X. J., *Sol–Gel Sci Technol*, **2007**, 41, 31–41.
- [27] Kim, J., Grate, J. W., *Nano Letters*, **2003**, 3, 1219–22.
- [28] Kim, J., Jiab, H., Lee, C., Chung, S., Kwak, J. H., Shina, Y., Dohnalkova, A., Kim, B. G., Wang, P., Grate, W. J., *Enzyme and Microbiological Technology*, **2006**, 39, 474-80.
- [29] Gao, S., Wang, Y., Wang, W., Luo, G., Dai, Y. J., *Mol. Catal.*, **2010**, 62, 218–224.
- [30] Godfrey, T., West, S., *Industrial Enzymology*, 2nd Edition **1996** (MacMillan Press: London).
- [31] Ming, T., Chang, S., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **1998**, 45, 3–8.
- [32] Hench, L. L., West, J. K., *Chem. Rev.*, **1990**, 90, 33-72.
- [33] Kálmán, E. *Magyar Tudomány*, **2003**, 9, 1154.
- [34] Kim J., Grate J. W., Wang P., *Chem. Eng. Sci.*, **2006**, 61, 1017 – 1026.
- [35] Houde A., Kademi A., Leblanc D., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2004**, 118, 155-170.
- [36] www.jegyzet.hu/notes.aspx?download=1&id=1730
- [37] Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C., *Biotechnol. Adv.* **2001**, 19, 627–662.
- [38] Warshel, A., Russell, S. J. *Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6569-6579.
- [39] Warshel, A., Naray-Szabó, G., Sussman, F., Hwang, J. K., *Biochem*, **1989**, 28, 3629-3637.
- [40] Brem, J., Turcu, M. C., Paizs, C., Lundell, K., Tosa, M.-I., Irimie, F.-D., Kanerva, L. T., *Proc. Biochem.* **2012**, 47, 119–126.
- [41] Kojima, Y., Yokoe, M., Mase, T., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1994**, 58(9), 1564-1568.

- [42] Teng, R.W., McManus, D., Aylward, J., Ogbourne, S., Johns, J., Parsons, P., Bacic, A., *Fitoterapia*, **2009**, 80, 233–236 .
- [43] N. Miletic, R. Rohandi, Z. Vukovic, A. Nastasovic, K. Loos, *React. Funct. Polymers*, **2009**, 69, 68–75.
- [44] Kemény, S., Deák, A., *Kísérletek tervezése és értékelése*, **2000**, (Műszaki könyvkiadó) .
- [45] Tomin, A., Weiser, D., Hellner, G., Bata, Z., Corici, L., Péter, F., Koczka, B., Poppe, L., *Proc. Biochem.*, **2011**, 46, 52-58.
- [46] Reetz M. T., Zonta A., Vijayakrishnan V., Schimossek K., *J. Mol. Catal. A Chem.*, **1998**, 134, 251-258.
- [47] Reetz M. T., Tielmann P., Wiesenhöfer W., Könen W., Zonta A., *Adv. Synth. Catal.*, **2003**, 345, 717-728.
- [48] Bornscheuer U. T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 3336-3337.
- [49] Mahmoud D.A.R., Refaat H.W., Abdel-Fattah A.F., Mahdy E.S.M.E., Shousha W.G., *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. **2011**, 5, 2127-2137.
- [50] Li X., YangW, Zou Q., Zuo Y., *Tissue Engineering: Part C*. **2010**, 16, 427-434.