



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar

Funkcionalizált szilika nanorészecskék alkalmazása új típusú enzim aggregátumok előállítására

OTDK dolgozat

Készítette: Nagy Flóra
II. évfolyamos biomérnök hallgató

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

Weiser Diána, PhD hallgató
BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. 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, aki a kísérletterv elkészítésében nyújtott kiváló szakmai segítséget, Dr. Koczka Bélát, aki az elektronmikroszkópos felvételek elkészítésében segített és Falus Pétert, aki a HPLC méréseknél nyújtott segítséget, valamint rendelkezésre bocsátotta az alkalázhoz való szubsztrátot.

Végül szeretném megköszönni a Szerves Kémia és Technológia Tanszék Bioorganikus Kutatócsoportjában dolgozóknak, hogy a munkám során felmerülő kérdéseimre mindig készségesen válaszoltak és munkámat segítették.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	5
1.1. Célkitűzés.....	6
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. Az enzimek működésének általános jellemzése	7
2.2. Az enzimkatalizált reakciók jellemzése	9
2.3. Enzimirögzítési módszerek	10
2.2.1. A CLEA módszer.....	12
3.1.2. Nanorészecskék alkalmazása enzimirögzítési célokra	14
2.3. Az alkalmazott enzimek bemutatása.....	17
2.3.1. <i>Bacillus licheniformis</i> alkaláz	17
2.3.2. <i>Candida antarctica</i> B lipáz	18
3. Kísérleti rész	20
3.1. Felhasznált anyagok.....	20
3.2. Szilika nanorészecskék szintézise.....	20
3.3. Nanorészecskék funkcionálizálása.....	20
3.4. NHM enzim készítmények előállítása	21
3.5. Hagyományos CLEAs előállítása	21
3.6. Rögzített enzimek tesztelése biokatalitikus átalakításokban	22
3.7. Rögzített enzimek működésének hőfokfüggése.....	22
3.8. Biokatalizátorok visszaforgathatóságának vizsgálata.....	22
3.9. Alkalmazott analitikai módszerek.....	23
4. Eredmények és értékelésük	25
4.1. A nanorészecskék méretkontrollált előállítása.....	27
4.2. A részecskék felületmódosítása	29
4.3. Lipáz enzim rögzítése hagyományos CLEA módszerrel és NHM rendszerekben	30
7.3. Alkaláz enzim rögzítése hagyományos CLEA módszerrel és NHM rendszerekben .	41
.....	
4.5. Rögzített lipáz enzimkészítmények működésének hőfokfüggése.....	48
4.6. Alkaláz enzimkészítmények működésének hőfokfüggése szerves közegben.....	51
4.7. Biokatalizátorok visszaforgathatóságának vizsgálata.....	53
4.8. Az NHM enzimkészítmények morfológiai vizsgálata	54
5. Összefoglalás	57

Rövidítések jegyzéke

NHM	Nano-hibrid mátrix enzimrögzítési rendszer
CLEAs	Keresztkötött enzim aggregátumok (Cross Linked Enzyme Aggregates)
CLEA módszer	Keresztkötött enzim aggregátum módszer
IPA	2-Propilalkohol
TRIS	Trizma® HCl [trisz-(hidroximetil)-aminometán]
TEOS	Tetraetoxiszilán
APrTMOS	Aminopropil-trimetoxiszilán
APrTEOS	Aminopropil-trietoxiszilán
EtTMOS	Etiltrimetoxiszilán
HeTMOS	Hexiltrimetoxiszilán
DeTEOS	Deciltriethoxiszilán
GDE	Glicerol-diglicidiléter
NPE	Neopentilglikol-diglicidiléter
PDE	Polietilénglikol-diglicidiléter
MTBE	<i>tert</i> -Butil-metiléter
N-Boc-Phe-S-Et	benziloxi-karbonil védőcsoporttal ellátott fenilalanin-etil-tioészter
GC	Gázkromatográfia (Gas Chromatography)
HPLC	Nagynyomású folyadékkromatográfia (High Pressure Liquid Chromatography)
SEM	Pásztázó elektronmikroszkóp (Scanning Electron Microscope)
UV-VIS	Ultraibolya-látható spektroszkópia (Ultra Violet-Visible Spectroscopy)
DLS	Dinamikus fényszórás mérés (Dynamic Light Scattering)

1. Bevezetés

A 21. század egyik legnagyobb kihívása, hogy a kémiai, a gyógyszer és a kapcsolódó iparágak egy zöldebb és fenntarthatóbb gyártás felé haladjanak, amely minimalizálja, vagy elkerüli a keletkező hulladékokat és mérgező anyagokat [1-3]. Ezek a követelmények sok esetben kielégíthetőek biokatalizátorok alkalmazásával. A biokatalitikus reakciók hagyományos reaktorokban (nem szükséges speciális berendezés hozzá), enyhe körülmények között (környezeti hőmérséklet és nyomás, fiziológias pH) környezetbarát oldószerben elvégezhetőek [4-6].

A leghatékonyabb biokatalizátorok az enzimek, amelyek nagyfokú szubsztrát-, regio- és sztereospecifitással rendelkeznek [7]. Az enzimkatalizált folyamatok során kevesebb hulladék keletkezik, sokkal energiahatékonyabb és nagyobb tisztaságú termékek keletkeznek, összevetve a hagyományos szintetikus utakkal. Ezen előnyök miatt napjainkban számos iparág egyre nagyobb súllyal támaszkodik valamilyen enzimkatalizált folyamatra. A modern orvoslás, energiatermelés, finomvegyszer gyártás és élelmiszeripar mára szinte elképzelhetetlen biokatalitikus transzformációk nélkül [8, 9].

Az enzimek komplex és rendkívül érzékeny molekulák, egyedi háromdimenziós szerkezettel, amelynek épsége nélkülözhetetlen működésükhöz. Bizonyos körülmények, mint a magasabb hőmérséklet, nyomás, extrém pH érték, vagy szerves oldószerek az enzimek irreverzibilis denaturálódásához vezethetnek, mely az aktivitásuk elvesztését okozza. Az enzimeket vizes közegben alkalmazva visszanyerésük, valamint az újrafelhasználásuk igen nehézkes és a terméktől történő elválasztásuk is komoly gondokat okoz. Ezekre a problémákra nyújthatnak megoldást az enzimrögzítési módszerek, amelyekkel stabilabb, könnyebben tárolható és visszanyerhető biokatalitikus készítmények állíthatóak elő [10, 11].

Manapság egyre gyakrabban alkalmazzák az enzimeket rögzített formában. A megfelelő rögzítési módszer megválasztásával a rögzített enzimkészítmény az adott felhasználás igényeihez igazítható [12-15]. Az egyre komplexebb, tudatosan tervezett enzimrögzítési technikák mára lehetővé teszik az enzimek olyan területeken történő alkalmazását is, amelyekre korábban nem volt lehetőség. Itt említhetőek meg az extrém körülmények között alkalmazott, rögzített enzimekkel megvalósított biotranszformációk, átfolyósos bioreaktorokban történő alkalmazások, valamint a rögzített enzimek terápiás, illetve diagnosztikai célokra történő hatékony alkalmazása.

1.1. Célkitűzés

TDK munkám során egy új, az irodalomban eddig nem ismert kombinált enzimrögzítési módszert hoztam létre. Az új módszer a már ismert CLEAs (Cross Linked Enzyme Aggregates; Keresztkötött Enzim Aggregátumok) képzési technikán és funkcionizált szilika nanorészecskék együttes alkalmazásán alapszik.

A CLEA módszer elve, hogy egy bifunkciós reagenssel az enzim molekulák aminosav oldalláncai között kovalens kötések alakíthatóak ki, amelyek végül egy enzim aggregátumot alkotnak [11, 16]. Ez a módszer igen egyszerű, szinte bármely enzim esetén létrehozható, megfelelő keresztkötő ágenszt alkalmazva. Nagyon nagy hátránya azonban, hogy a készítmény kizárólag az enzim molekulákból áll, ami nem csak gazdaságtalan, de a készítmény stabilitása, mechanikai tulajdonságai is nagyon kedvezőtlenek, bioreaktorokban való üzemi méretű alkalmazásuk pedig szinte lehetetlen.

A szilika nanorészecskék biokompatibilisek, rendkívül változatosan formálhatóak, megfelelő funkcionizálásuk után pedig önmagukban képesek enzimek rögzítésére kovalens kötésekkel keresztül [17]. Igen kis méretük miatt azonban kezelésük, visszanyerésük körülményes, gazdaságtalan és sok esetben egészségügyi kockázatokkal jár, hiszen a nanoméretű szemcsék a légutakon át könnyen a tüdő hörgőcskéibe kerülhetnek, ahol szilikózist okozhatnak [18].

A fent említett két módszer ötvözésével azonban egy olyan nano-hibrid mátrix alapú enzimrögzítési rendszer (a továbbiakban erre a rendszerre az NHM rövidítést alkalmazom) alakítható ki, amely egyfelől rendelkezik a CLEA módszerből fakadó sokoldalú felhasználhatósággal, hiszen az általam alkalmazott bifunkciós epoxidok bármilyen aminosav oldallánccal (amino, tiol, hidroxil csoport) reakcióba vihetők, ezáltal gyakorlatilag bármilyen enzim rögzítésére alkalmasak. Másfelől viszont a nanorészecskék bevitelével lényegesen jobb mechanikai, morfológiai jellemzők érhetőek el, mint a hagyományos CLEA technikával előállított, tisztán csak enzimből felépülő készítményeknél. Az így előállított készítmény méreteloszlása mikronos tartományba esik, amely nem okoz sem egészségügyi, sem technológiai problémákat.

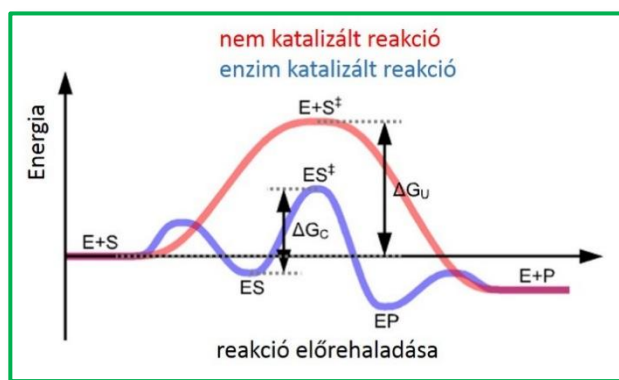
TDK munkám során a fent bemutatott újfajta, irodalomban még nem ismert enzimrögzítési eljárás megvalósítását és vizsgálatát tűztem ki célul. A kísérletek tervezéséhez és kiértékeléséhez, az új enzimrögzítési módszer fő változóinak megismeréséhez a *Statistica* szoftvert alkalmaztam. A rögzített enzimek készítmények hőfokfüggését és visszaforgathatóságát összehasonlítottam az enzim kereskedelmi forgalomban is kapható hagyományos CLEAs

formáival. A kísérleteket két ipari és gyógyászati szempontból releváns enzimes családon végeztem el (*Bacillus licheniformis* alkaláz és *Candida antarctica* B lipáz).

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az enzimek működésének általános jellemzése

Az enzimek az élő szervezetekben végbemenő kémiai reakciók fehérje típusú katalizátorai (biokatalizátorok). Katalitikus tulajdonságuk a szervetlen 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.



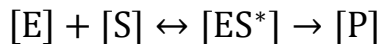
1. ábra: Az enzimkatalízis energiaprofilja

Az enzimek egy vagy több fehérjeláncból álló, természetes aminosavakból felépülő lineáris polimerek [19]. Más fehérjékhez hasonlóan az enzimek is egyszerűek (proteinek) vagy összetettek (proteidek) lehetnek. A proteineket csak polipeptid lánc alkotja. A proteidek közé tartozó enzimek fehérje részből (apoenzim) és nem fehérje természetű 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 megkötö a molekulát és a rá jellemző módon átalakítja azt.

Az Eyring-féle abszolút reakciósebességi elmélet alapján ahhoz, hogy egy kiindulási anyagból (szubsztrát) P termék képződhessen, a reakciónak termodinamikailag lehetségesnek kell lennie (azaz a kiindulási anyagok szabadenergia szintje magasabb a képződő termékénél), valamint a

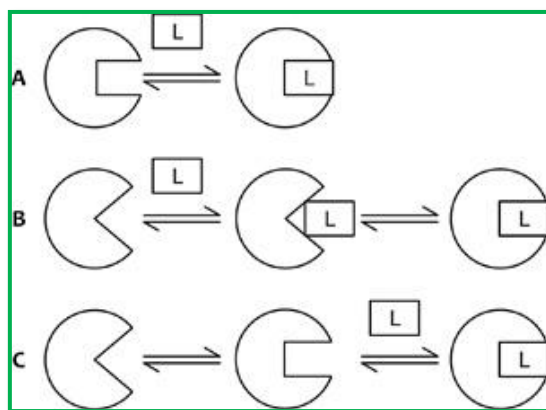
rendszerrel további energiát szükséges közölni, hogy egy átmenetileg még a kiindulásnál is magasabb, aktivált energiaszintre kerüljön. Ez a többlet energia az aktiválási energia (E_a) [20].

A reakció általános sémája enzimekre:



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

Az enzimkatalízis molekuláris mechanizmusára többféle modell létezik, amelyek az enzim és a szubsztrát molekula egymáshoz történő kapcsolódását jellemzik. Az egyik modell Emil Fischer kulcs-zár elmélete (1890), amely szerint a szubsztrát úgy illeszkedik az enzimbe, mint kulcs a zárba (2. ábra/A). Az indukált illeszkedés elmélete (D. E. Koshland, 1958) szerint a szubsztrát molekula részleges kötődése az enzim konformációjának oly mértékű megváltozását okozza, hogy az enzim-szubsztrát komplex létrejöhessen (2. ábra/B). A harmadik modell az ún. fluktuációs elmélet (1900-as évek), amely azt feltételezi, hogy az enzimnek állandóan változik a konformációja, és az éppen megfelelő konformációjú enzim fog reakcióba lépni a szubsztráttal (2. ábra/C) [20].



2. ábra: A fehérje – ligandum kötődés modelljei. A: „kulcs a zárban”, B: indukált illeszkedés, C: fluktuációs modell (L: ligandum) [21]

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.

2.2. Az enzimkatalizált reakciók jellemzése

Az enzimek enantiomer szelektív reakciókban való alkalmazását 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, ami 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*): [22]

- *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 enzimpreparátumokkal, így nem ismert pontosan az enzimek tömege sem grammban, sem molárisan, éppen ezért a g/dm³ vagy mol/dm³ koncentrációk sem alkalmazhatóak a jelen lévő biokatalizátor mennyiségének megadására. Ehelyett az enzimegységet (*Unit*) használják, amely szubsztrát átalakítási vagy termékképződési sebességet jelent [20]. Az enzimegység általánosan elfogadott definíciója:

egy egység az az enzim mennyiség, amely 1 μmol szubsztrátot alakít át vagy 1 μmol terméket képez 1 perc alatt adott reakciókörülmények között. Az adott reakciókörülményeket (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 (μmol×perc⁻¹×g⁻¹), (U/g)] a kiindulási alkohol molszámából [n_{rac} (μmol)], a konverzióból [c], a reakcióidőből [t (perc)] és biokatalizátor tömegéből [m_B (g)] számítható az alábbi képlet szerint:

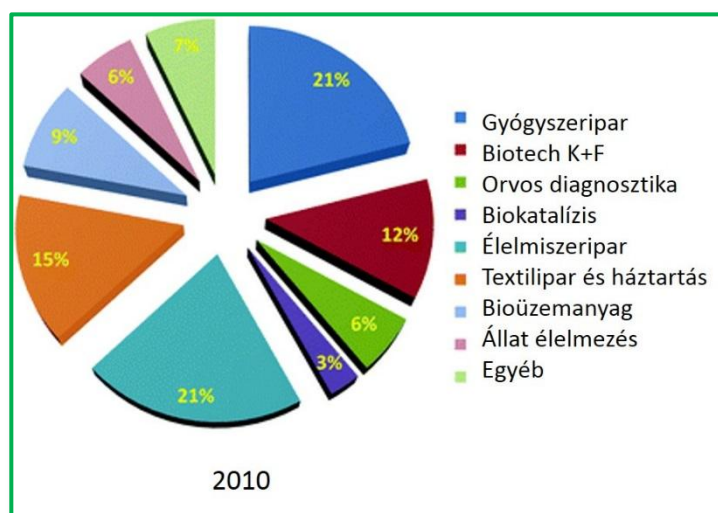
$$U_B = (n_{rac} \times c)/(t \times m_B)$$

2.3. Enzimrögzítési módszerek

Az enzimek aktivitása és stabilitása nagyban függ a reakciókörülményektől és a környezeti paraméterektől, a nem megfelelő körülményekre biokatalitikus aktivitásuk és szelektivitásuk elvesztésével reagálhatnak [12]. A homogén enzimes reakciók előnye, hogy az enzim izolálásán kívül más előkészületet nem igényelnek, de ezzel szemben állnak a gazdasági hátrányok. Homogén vizes közegben alkalmazva 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 [11, 23]. Tárolásuk során is csökken stabilitásuk, technológiai hátrányuk, hogy a terméket szennyezik, annak tisztítását nehezítik

[20], amely komoly technológiai problémát jelent az ipar számára. Terápiás alkalmazásuk során pedig a kívánt biohasznosulásuk elérése okozhat nehézséget.

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 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 [24-29]. A fent említetteknek köszönhetően napjainkban az immobilizált enzimek egyre nagyobb teret hódítanak számos iparágban [30].



3. ábra: Rögzített enzimek alkalmazási területei világszerte [30]

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) [11, 23].

1. táblázat: Enzimirögzítési módszerek csoportosítása

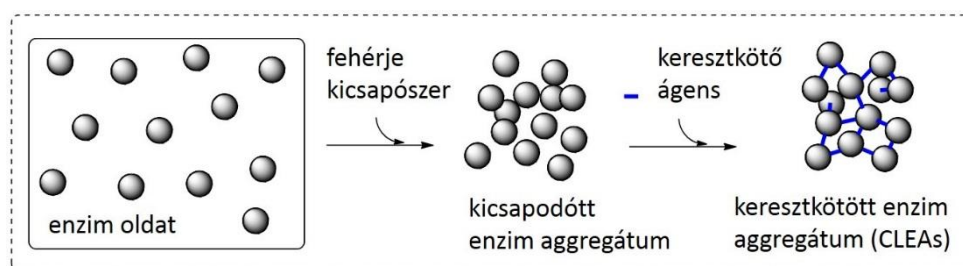
	Rögzítési módszer	Előnyök	Hátrányok
Kémiai módszerek	Keresztkötések enzim között (CLEA)	- egyszerű - olcsó - hatékony	kedvezőtlen mechanikai sajátságok
	Kovalens kötés hordozóhoz	stabil készítmény	csökkenhet az enzim aktivitása, szelektivitása
	Egyedi enzim nanorészecskék (SENs)	- hatékony enzimes rendszerek - potenciális biomedicina	- körülményes módszer - érzékeny, rövid élettartam
Fizikai módszerek	Adszorpció a hordozó pórusaiban	- egyszerű - hatékony	- kisebb stabilitás - enzim deszorpció
	Alginátba zárás	- egyszerű - olcsó - hatékony	instabil készítmények
	Nanorészecskébe, nanoszálba zárás	- nagy hatékonyság - szabad diffúzió	költséges
	Szol-gélbe zárás	- hatékony - stabil készítmény	nagyobb diffúziós gát

A következőkben az a két enzimirögzítési technika kerül bemutatásra, amelyek szorosan kapcsolódnak a TDK munka során alkalmazott módszerekhez. A két enzimirögzítési eljárás közül az egyik a keresztkötött enzim aggregáció, azaz a CLEA módszer (2.2.1 fejezet). A másik pedig a nanorészecskékre, azon belül is a szilika nanorészecskékre történő enzimirögzítési lehetőségek (2.2.2. fejezet).

2.2.1. A CLEA módszer

A keresztkötések létrehozása az enzimirögzítés egyik vonzó fajtája. A végső preparátum alapvetően a tiszta fehérje, egységnyi mennyiségben nagy enzim koncentrációval [12, 31]. A keresztkötött enzimek úgy hozhatóak létre, hogy egy vizes enzim oldatot kevertetnek glutáraldehid vizes oldatával. Ez a módszer már az 1960-as években is ismert volt [32]. Az eljárás gyors és egyszerű, de a készítmények kezelése bonyolult volt és alacsony enzimaktivitást, gyenge reprodukálhatóságot és gyenge stabilitást mutatnak. Így a következő három évtizedben inkább a hordozóhoz kötött enzimek fejlesztése terjedt el. Az 1990-es évek elején azonban az Altus Biologics bemutatta a keresztkötött enzim kristályokat (CLECs: Cross Linked Enzyme Crystals), melyek fokozott aktivitású és stabilitású biokatalizátorok, és a méretük is könnyen szabályozható (1-100 μm) [33]. A kristályok létrehozása viszont egy

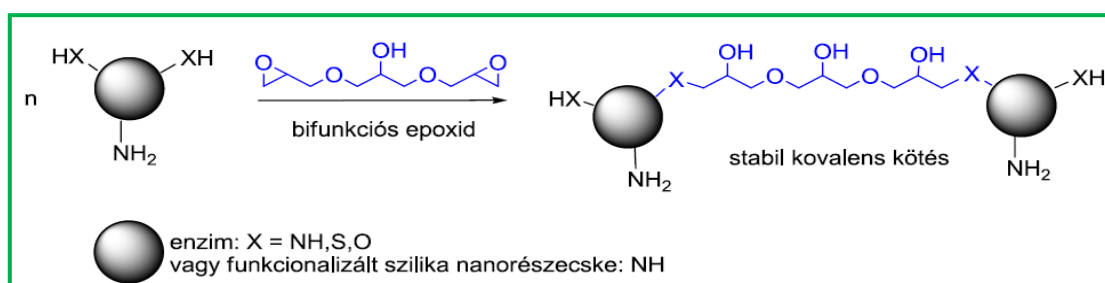
időigényes és igen költséges folyamat, mivel nagy tisztaságú enzimet követel, így ennek következtében a CLEC módszer még nem terjedt el széleskörűen. Néhány évvel ezelőtt úgy gondolták, hogy a kristályosítást helyettesítheti az enzim kicsapása pufferelt közegből, amely egy egyszerűbb, kevésbé drága módszer és nem követeli meg a nagy tisztaságú enzimek alkalmazását. Korábban azt is leírták, hogy sók, vízzel elegyedő szerves oldószerek, vagy nem ionos polimerek hozzáadása a fehérje vizes oldatához a makromolekulák kicsapásához vezet, amelyek aggregátumokat képezve, kovalens kötések nélkül tudnak kapcsolódni [34, 35]. Ha ehhez a csapadékhoz vizet adnak, az az enzim feloldását eredményezi. Ezzel szemben, ha keresztkötéseket hoznak létre az aggregátumok között, az lényegében egy térhálós polimerhez vezet, mely oldhatatlanná teszi a készítményt, miközben megőrzi szerkezetét és ebből kifolyólag az enzim aktivitását. Ez vezetett az enzimrögzítés egy új fajtájának, a keresztkötött enzim aggregátumok (CLEAs) bevezetéséhez. A CLEA módszer lényegében két folyamatot egyesít, tisztítást és rögzítést egy műveletben. A keresztkötések kialakítására legelterjedtebben a glutáraldehidet alkalmazzák, amely Schiff-bázis képzés közben a fehérjék szabad amino csoportjaival (N-terminális) lép reakcióba (4. 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. A nyers enzim extraktum közvetlenül a fermentléből is vehető, és egy egyszerű művelettel létrehozható a rögzített enzim, közvetlenül a termelés helyén, közbenso feldolgozás vagy tisztítás nélkül [36].



4. ábra: Kovalensen kötött enzimaggregátumok előállítása (CLEAs) [37]

A különféle enzimekből történő CLEA előállításánál a keresztkötő ágens kiválasztása során legtöbbször a glutáraldehidre esik a választás. A glutáraldehid alacsony koncentrációban egyidejűleg létezhet monomerként, hidrátként és félacetálként. Magasabb koncentrációban oligomer félacetálokká polimerizálódik és ebben a formában különböző módon tud reagálni fehérjékkel, ami rögzíti, immobilizálja őket Schiff-bázis és egyéb kötések kialakítása során [38, 39]. Mivel az enzimrögzítésben résztvevő glutáraldehid formái különböző tényezőktől

függnek (hőmérséklet, pH, koncentráció, oldószer összetétel), a glutáraldehid használatánál a protokollnak igazodnia kell az adott fehérjéhez. Általános módszerek, melyek a glutáraldehidet alkalmazzák keresztkötőként, már sokféle enzimesaládra ismertek [40–45]. Biszepoxi vegyületeket, például a glicerol-diglicidilétert (GDE) is széleskörűen alkalmazzák adalékanyagként amin, hidroxil vagy karboxil csoportokat tartalmazó polimerek térhálósításánál. Kutatócsoportunk már vizsgálta a GDE használatát keresztkötő ágensként CLEAs képzésnél glutáraldehid helyett [37]. Enyhe körülmények között képesek stabil kötések kialakítására nem csak lizin aminos csoportjával, hanem a ként és oxigént tartalmazó ciszteinnel, tirozinnal, aszpartáttal és glutamáttal is. Ráadásul a GDE egy olcsó, vízben részben oldódó biszepoxi vegyület, mely kevésbé toxikus, mint a glutáraldehid.



16. ábra: Kovalens kötések kialakítása bifunkciós epoxidokkal

3.1.2. Nanorészecskék alkalmazása enzimrögzítési célokra

Az enzimrögzítési módszerek között egyre népszerűbb a nanoméretű hordozókon történő immobilizálás. A nanohordozókra kötött enzimeket széles körben alkalmazzák gyógyászati, diagnosztikai és bioszeparációs célokra [46–48]. A nanorészecskékre felvitt enzimek kis méretükből adódóan jól közelítik a homogén fázisú, rögzítetlen fehérje molekulák viselkedését, ám szilárd állapotuk miatt könnyebben elválaszthatóak az alkalmazott közegtől. Előnyként említhető az is, hogy a hordozóhoz kötés növelheti az enzimek stabilitását, terápiás célú alkalmazás esetén pedig segítheti a célszervhez történő eljuttatásukat, emellett új teret nyit az orvosdiagnosztikában is [49, 50].

A 2. táblázatban példák láthatóak nanorészecskék alkalmazására enzimrögzítési célokra.

2. táblázat: Nanorészecskék alkalmazása enzimek rögzítésére

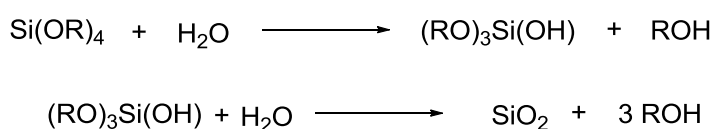
Enzim	Nanorészecske típusa	Alkalmazás	Ref.
Koleszterin oxidáz	Fe ₃ O ₄ nanorészecske	Koleszterin szint meghatározás	[51]
Haloalkén dehalogenáz	Szilika réteggel borított Fe ₃ O ₄ nanorészecske	Dehalogenáz szekvenciát tartalmazó proteinek előállítása	[52]
Lakkáz	Kitozán-mágneses nanorészecske	Környezeti szennyező anyagok bioremediációja	[53]
Keratináz	Fe ₃ O ₄ nanorészecske	Keratin szintézis	[54]
α -Amiláz	Cellulóz réteggel borított Fe ₃ O ₄ nanorészecske	Keményítő bontás	[55]
β -Galaktozidáz	ZnO nanorészecske	Laktóz hidrolízis	[56]
Lipáz	Fe ₃ O ₄ nanorészecske	pNPP hidrolízis	[57]

Amennyiben az enzim molekulákat nanoméretű hordozókhoz, nanorészecskékhez kívánjuk rögzíteni, nagyon fontos szempont a nanorészecske mérete és morfológiája, valamint felületi tulajdonságai. A nanoanyagok előállítása alapvetően kétféle útvonalon mehet végbe (3. táblázat). Az egyik az ún. "top-down" szintézis, mely során felülről lefelé, tehát makro-, illetve mikroszkópikus méret felől történik az előállítás a nano méret felé. Ilyen technika például a nanomalmokkal megvalósítható őrlés, aprítás, illetve lebontás [58]. Ezzel a tradicionális megközelítéssel ellentétes a nanotechnológiai megközelítésmód, amely az ún. "bottom-up" szintéziseket foglalja magában. Ez esetben a nanoanyagok előállítása alulról felfelé építkezik, tehát atomos, molekuláris szintről indulva halad a folyamat a nanoméretű részecske felé [59, 60].

3. táblázat: Nanoanyagok előállításának általános lehetőségei

„Top-down,, szintézis Tradicionális megközelítés		„Bottom-up” szintézis Nanotech” megközelítés
Őrlés, nanomalom	Gáz fázisú növesztési technikák, atomréteg leválasztás	Precipitációs módszerek
Aprítás, LASER pirolízis	Folyadék fázisú növesztési technikák, kolloid rendszerek, önszerveződő rétegek	Szol-gél eljárások
Lebontás, litográfia	Szilárd fázisú növesztési technikák, fázis szétválasztás	Solvothermal szintézisek

A folyadék fázisú növesztési technikákkal előállítható kolloid méretű szilika részecskék rendkívül népszerűek könnyű előállíthatóságuk, valamint méretük és méreteloszlásuk pontos kézbe tarthatósága miatt [61]. Stöber és munkatársai monodiszperz szférikus szilika részecskék egyszerű szintézisét publikálták [62]. A szintézis a tetraetoxiszilán (TEOS) hidrolízisével és kondenzációs lépésével jön létre, alkohol és vizes ammónia oldat keverékében. A hidrolízis lépésben egy kissé hidrolizált TEOS monomer keletkezik és ez a hidrolizált köztitermék kondenzálódik, végül szilícium-dioxidot formál (5. ábra). A keletkezett részecskék az ammónia oldat ionjainak elektrosztatikus taszítása során stabilizálódnak.

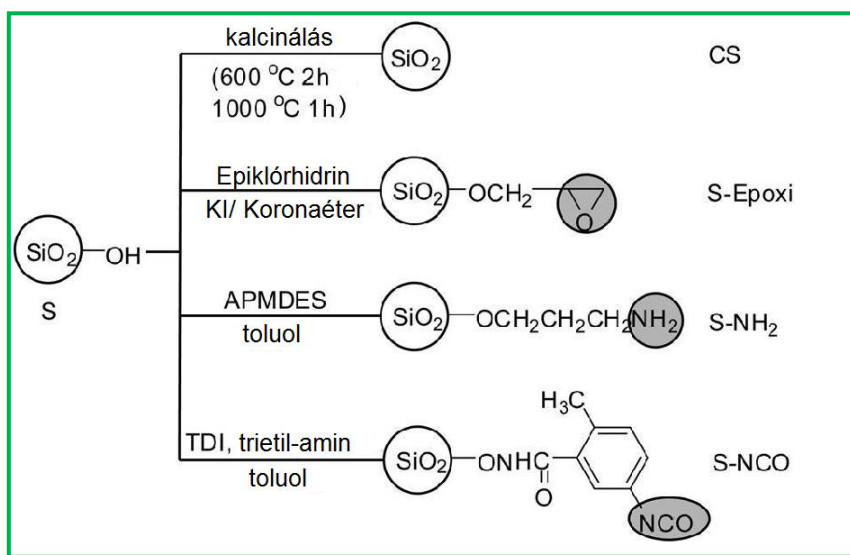


5. ábra: TEOS hidrolízise és kondenzációja

A hidrolízis sebessége alapvetően háromféle úton befolyásolható. Az egyik lehetőség, hogy a folyamatot iniciáló OH⁻ ion mennyiségét változtatjuk. A másik lehetőség, hogy a részecskét felépítő organoszilán prekursor alkoxi csoportját cseréljük le gyorsabban, illetve lassabban hidrolizáló fajtákra. A harmadik lehetőség a reakció során alkalmazott hőmérséklet növelése, amely szintén gyorsíthatja a reakciót.

A nanorészecske tulajdonságai alapvetően befolyásolják a részecskére felvihető enzim molekulák számát, valamint az enzim rögzülésének minőségét. Annak érdekében, hogy a nanorészecskékre enzimeket rögzíthessünk, ki kell alakítani azokat a funkciós csoportokat,

amelyek képesek kémiai kölcsönhatásokon keresztül megkötni az enzim molekulákat. A szilika részecske felületének kémiai tulajdonságait főként a különböző szilanol és sziloxán csoportok határozzák meg, melyek jelen vannak mind a külső, mind a belső szerkezetben. A részecskék funkcionálizálása könnyedén megvalósítható különböző kémiai eljárásokkal [63]. A leggyakrabban az amino, epoxi, izocianát csoportokat alakítják ki organoszilánokkal, epiklórhidrinrel, illetve diizocianátokkal (6. ábra) [64].



6. ábra: Felületmódosításra alkalmas funkciós csoportok [64]

2.3. Az alkalmazott enzimek bemutatása

2.3.1. *Bacillus licheniformis* alkaláz

Az alkaláz enzim a proteázok családjába tartozik, melyek a fehérjéket hasítják úgy, hogy a peptid kötés felbomlását katalizálják. A szerin-proteázok csoportjába tartozó endopeptidáz széles szubsztrátspecifitással rendelkezik [65]. Az alkaláz egy 275-aminosavból álló globuláris fehérje több alfa-hélix-szel és egy nagy béta-redővel. Az aktív centrumot alkotó katalitikus triád tagjai: Asp-32, His-64, Ser-221. A Ser nukleofilként viselkedik és peptid kötéseket formál a parciális negatív töltésű oxigénjének segítségével. Ezt a Subtilisin természetes töltéseloszlása teszi lehetővé [66].

Az alkalázt sokrétűen alkalmazzák háztartási célokra, mosószerként nagyon jól használható fehérje eredetű foltok (fűfolt, vér, tojás, stb.) tisztítására. Emellett fontos enzim az élelmiszeriparban is, például kukorica fehérjéinek hidrolízisére. Segítségével értékesebb, nagyobb tápanyagtartalmú, könnyen felhasználható készítményt hoznak létre, mely az élelmiszeriparban alternatív helyettesítője lehet az állati fehérjéknek [67]. Az orvostudomány

és az élelmiszeripar egy közös felfedezést is tett az alkalázzal kapcsolatban. Az angiotenzin I-et angiotenzin II-vé konvertáló enzim (ACE) inhibitorai a leggyakrabban alkalmazott magas vérnyomás elleni terápiás szerek közé sorolhatók. Azáltal fejtik ki hatásukat az inhibitorok, hogy gátolják az angiotenzin II keletkezését, így csökken a vérnyomás. A szintetikusan előállított ACE inhibitorok használatának azonban kellemetlen mellékhatásai lehetnek, például köhögés, ízérzékelési zavarok és bőrproblémák. Egyes tengeri állatokban természetes formában is előfordulnak ACE inhibitorok. Ezek azonban hidrolízis nélkül nem hozzáférhetők, így aktív állapotba kell őket valamilyen módon hozni. Erre lehet alkalmas az alkaláz, mely enzimatisz hidrolízissel kinyerhetővé teszi a bioaktív, gyógyszerként használható inhibitor-peptideket. Így például a lazacfeldolgozás során keletkező, korábban hulladékként kezelt melléktermékekből (fej, bél, uszonyok) enzim segítségével kinyerhető az inhibitor gyógyszerhatóanyag [68].

Az alkaláz a kereskedelemben kapható oldat formájában nehezen kezelhető, a reakcióelegytől nem elválasztható és idővel csökken, majd nagyjából fél év alatt szinte teljesen megszűnik az enzimaktivitás.

2.3.2. *Candida antarctica* B lipáz

A lipázok a legszélesebb körben alkalmazott enzimek. Biotechnológiai szempontból jelentősek, az enzimtechnológia területén is vezető szerepet játszanak. Elsősorban a glicerinszavakkal képzett hármassztereit, a triglicerideket hidrolizálják glicerinsre és szavakra, de emellett katalizálhatnak szterezési és acilezési reakciókat is [69]. Megtalálhatók az emlősök májában, a ricinusmagban, továbbá egyes penészgombák és baktériumok anyagcseretermékei között egyaránt [70]. 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 katalízissnek minősül. A lipázok aktivitása általában lúgos közegben maximális. Optimális pH-juk 7,0 és 8,8 között van. Hőmérsékleti optimumuk 30 - 40°C.

A *Candida antarctica* B lipáz 324 aminosavból épül fel, 35 kDa molekulatömegű enzim. Kedvező tulajdonságai (pH és hő tűrés, nagy hatékonyság és szelektivitás, megfelelő minőségű termék és kevés melléktermék képzése) révén széleskörűen alkalmazható lipáz. Regio és sztereospecifikus reakcióban is felhasználható mind a hidrolízist, mind a szintézist tekintve. Acilezési reakcióknál szubsztrátként többféle anyagot, például alkoholokat, aminosavakat is képes hasznosítani, beleértve a természetes eredetűeket [71, 72]. A kiválasztott

lipáz rögzített formája ideális biokatalizátor lehetne olyan biotranszformációkban, mint például racém alkoholok szakaszos és folyamatos üzemű rendszerben végzett kinetikus reszolválása.

3. Kísérleti rész

3.1. Felhasznált anyagok

A felhasznált vegyszerek és oldószerek a Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, Alfa Aesar és Molar Chemicals termékei: racém 1-feniletanol, tetraetoxiszilán (TEOS), 3-aminopropil-trietoxiszilán (ApTEOS), 3-aminopropil-trimetoxiszilán (ApTMOS), etil-trimetoxiszilán (EtTMOS), hexil-trietoxiszilán (HeTEOS), decil-trietoxiszilán (DeTEOS), 2-propanol (IPA), vinil-acetát, trisz-(hidroximetil)-amino-metán (TRIS), nátrium-foszfát-monohidrát, dinátrium-foszfát-heptahidrát, n-hexán, *terc*-butil-metiléter, *terc*-butanol, benzil-amin, etanol, n-propanol, n-butanol. A felhasznált enzimek a C-LEcta és a Sigma-Aldrich termékei: *Candida antarctica* B lipáz, *Alcalase Enzyme Bacillus licheniformis*.

A racém-*N*-Boc-Fenilalanin-etil-tioészter (*N*-Boc-Phe-S-Et) preparatív úton lett előállítva a Bioorganikus kutató csoport munkatársai által.

3.2. Szilika nanorészecskék szintézise

A különböző méretű szilika nanorészecskéket módosított Stöber módszer szerint állítottam elő. Jellemzően 180 ml absz. alkoholhoz (n-butanol, n-propanol, vagy etanol) különböző mennyiségű (30, 38, vagy 22 ml) NH_4OH oldatot adtam (35 %-os vizes oldat). Az elegyet 10 percig rázattam, majd 18 ml TEOS prekursorat adagoltam az elegyhez. Ezt követően a mintákat 24 órán át rázattam (szobahőmérsékleten, 450 rpm). Végül a mintákat rotációs vákuumbepárlás segítségével száraz állapotba hoztam, majd 550°C-on 4 órán át kalcináltam.

3.3. Nanorészecskék funkcionálizálása

Egy 45 ml-es zárható centrifugacsőbe 800 mg nanorészecskét 8 ml etanolban ultrahangos szonikálás segítségével diszpergáltam (15 perc, szobahőmérséklet). Ezt követően 80 μl NH_4OH oldatot (25%-os vizes oldat) adtam hozzá és 10 percig rázattam őket. Végül a megfelelő organoszilán elegyeket a nanorészecske szuszpenziójához adtam, majd a lezárt, leparafilmezett mintát 24 órán át szobahőmérsékleten rázattam. 24 óra eltelte után a mintát centrifugáltam (3500 rpm, 10 perc, 8°C). A felülúszót leöntöttem, majd a mintát kétszer 20 ml etanollal mostam (azonos körülmények mellett centrifugáltam). Ezután a mintákat Petri csészére helyeztem és egy napon át vegyifülke alatt (elszívás mellett) száradni hagytam.

3.4. NHM enzim készítmények előállítása

Kimértem 100 mg-ot a megfelelő nanorészecskékből és 6 ml Na-foszfát pufferben (100 mM, pH 7,5) diszpergáltam ultrahangos szonikálás segítségével, 30 percen keresztül. Ezt követően 3 ml alkaláz vagy lipáz enzim oldatot (10 mg/ml, Na-foszfát puffer, 100 mM, pH 7,5) adtam a szuszpenziókhoz. Az elegyeket 10 percen át rázattam (szobahőmérséklet, síkrázógép, ~ 450 rpm) majd 27 ml absz. etanolt adtam hozzájuk. 10 perc rázatás után 900 µl keresztkötő ágenst (GDE vagy NPE vagy PDE) adtam hozzá, majd az elegyet 24 órán át rázattam. Ezt követően a mintákat centrifugálással (3500 rpm, 10 perc, 8°C), 15 ml Na-foszfát pufferrel (100 mM, pH 7,5), majd kétszer 2-propanollal mostam. Végül a mintákat vegyifülke alatt, elszívás mellett 1 napon át száradni hagytam.

A fent leírtaknak megfelelően jártam el a funkciós csoportot nem tartalmazó és a funkcionizált szilika nanorészecskék esetében is.

3.5. Hagyományos CLEAs előállítása

Alkaláz CLEAs

20 ml alkaláz oldathoz (~10 mg/ml, a gyártói oldat pontos összetétele ismeretlen) folyamatos rázatás mellett (szobahőmérséklet, síkrázógép, ~ 450 rpm) 60 ml etanolt adtam lassan adagolva. Ezután az elegyet 15 percig rázattam, majd 2,0 ml keresztkötő ágenst (GDE, vagy NPE, vagy PDE) adtam hozzá, végül tovább rázattam 24 órán át. Ezt követően a mintákat centrifugálással (3500 rpm, 10 perc, 8 °C) 15 ml Na-foszfát pufferrel (100 mM, pH 7,5) majd, kétszer 2-propanollal mostam. Végül a mintákat vegyifülke alatt, elszívás mellett 1 napon át száradni hagytam.

Lipáz CLEAs

20 ml lipáz oldathoz (10 mg/ml, Na-foszfát puffer, 100 mM, pH 7,5) folyamatos rázatás mellett (szobahőmérséklet, síkrázógép, ~ 450 rpm) 60 ml etanolt adtam lassan adagolva. Ezután az elegyet 15 percig rázattam, majd 2,0 ml keresztkötő ágenst (GDE, vagy NPE, vagy PDE) adtam hozzá, végül tovább rázattam 24 órán át. Ezt követően a mintákat centrifugálással (3500 rpm, 10 perc, 8 °C) 15 ml Na-foszfát pufferrel (100 mM, pH 7,5) majd, kétszer 2-propanollal mostam. Végül a mintákat vegyifülke alatt, elszívás mellett 1 napon át száradni hagytam.

3.6. Rögzített enzimek tesztelése biokatalitikus átalakításokban

Rögzített lipáz készítmények

A reakciókat 4 ml-es, légmentesen lezárt reakcióedényben végeztem, melybe 25 mg rögzített enzimet, 1,0 ml hexán:MTBE 2:1 arányú elegyét 50 µl 1-feniletanolt, 100 µl vinil-acetátot mértem be, majd a reakciókat 30 °C-on termosztálva rázattam (~ 700 rpm). A reakcióelegyekből 30, 60 és 120 perc elteltével 50 µl mintát vettem, amelyet etanollal 1 mg/ml töménységűre hígítottam. Az így kapott mintákat királis állófázisú GC segítségével elemeztem (ld. 3.8 fejezet GC).

Rögzített alkaláz enzimkészítmények:

A reakciókat 4 ml-es légmentesen lezárt reakcióedényben végeztem, melybe 15 mg rögzített enzimet, 2,0 ml terc-butanolt, 15 mg racém N-Boc-Phe-S-Et és 6 µl benzilamint mértem be, majd a reakciókat 30 °C-on termosztálva rázattam (~ 700 rpm). A reakcióelegyekből 3, 6 és 24 óra elteltével 60 µl mintát vettem, amelyet 440 µl hexán:IPA 98:2 arányú elegyével hígítottam, majd hidrofób HPLC szűrőn (d = 0,42 µm) szűrtem. Az így kapott mintákat királis állófázisú HPLC segítségével elemeztem (ld. 3.8 fejezet HPLC).

3.7. Rögzített enzimek működésének hőfokfüggése

Rögzített lipáz készítmények

A készítményeket a 3.6. pontban leírtak szerint teszteltem, amely során a reakciót az adott hőmérsékleteken (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C) termosztálva végeztem. Oldószer közegként a 3.6 pontban leírt hexán:MTBE 2:1 oldószer keverék helyett vízmentes toluolt alkalmaztam.

Rögzített alkaláz készítmények

A készítményeket a 3.6. pontban leírtak szerint teszteltem, amely során a reakciót az adott hőmérsékleteken (30, 40, 50, 60, 70, 80°C) termosztálva végeztem.

3.8. Biokatalizátorok visszaforgathatóságának vizsgálata

A biokatalizátorokat a 3.6. pontban leírtaknak megfelelően teszteltem. A mintavétel 1 óra után történt, ezután a reakcióelegyet centrifugáltam (12000 rpm, 2 perc) majd egyszer vízzel és kétszer IPA-val mostam. 1 órás szárítás után (szobalevegő) a visszanyert biokatalizátorok

pontos tömegét visszamértem, majd megismételtem a tesztreakciót a 3.6. pontban leírt komponensek arányainak pontos betartásával (biokatalizátor/1-feniletanol/vinilacetát/n-hexán:MTBE 2:1 = 1/2/4/40). Ily módon a visszaforgatást 4 ciklusban végeztem el.

3.9. Alkalmazott analitikai módszerek

GC vizsgálat

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:

racém 1-feniletanol: 120°C izoterm, 8 perc. Retenciós idők (t_R): (S)-1-feniletilacetát: 4,13 perc; (R)-1-feniletil-acetát: 4,65 perc; (R)-1-feniletanol: 6,10 perc; (S)-1-feniletanol: 6,44 perc.

HPLC vizsgálat

A HPLC méréseket fotodióda-soros detektorral (DAD) felszerelt HP 1090 készüléken végeztem, Daicel Chiralpak® IB (150 $\times$ 2,1 mm, 5 μ m szemcseméret, szilikagélre rögzített trisz-(3,5-dimetilfenilkarbamát)-tal módosított cellulóz töltet) enantiomerszelektív királis állófázist tartalmazó kolonnával. A reakciók követéséhez a HPLC-hez szükséges mintákat közvetlenül a reakcióelegyből vettem, majd hexán/2-propanol 98/2 eluenssel hígítottam a megfelelő koncentrációra (1-1,5 mg/ml).

Primer amino csoportok meghatározása Ninhidrin reagenssel

10 mg szilika nanorészecskéhez 1 ml nátrium-acetát/ecetsav puffer oldatot (100 mM, pH 5,5), valamint 2 ml Ninhidrin reagenst (3 m/m %-os n-propanolos oldat, ecetsavval savanyítva) adtam, majd az elegyet 15 percig 100°C-on intenzíven kevertettem. Ezt követően a mintákat szobahőmérsékletűre hűtöttem, majd centrifugáltam (3500 rpm, 5 perc, 25 °C). Ezután a felülúszóból mintát vettem, melynek megmértem a reakció során képződő lilás színű komplex abszorbanciáját (λ = 570 nm, T = 30 °C) [74]. A fotometriás méréseket Spectronic Genesys 2 típusú UV-spektrofotométer segítségével végeztem el.

SEM

L JSM JEO -5500LV SEM-EDS készülék: Pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) energiadisperzív analizátorral (EDS/EDX/EDAX) és környezeti (ESEM) üzemmóddal, mely energiadisperzív röntgen-analizátorral (energy dispersive spectroscopy – EDS, energy dispersive X-ray analysis – EDX/EDAX) is fel van szerelve. A minta előkészítés során a mintákat kétoldalú karbon szalaggal fixáltuk, majd a jobb képalkotás érdekében a mintákat arany nanofilmel vontuk be porlasztó készülékkel. Ezt követően a felvételeket nagyvákuum üzemmódban készítettük.

DLS

A DLS mérés során a vizsgálandó részecskék stabil szuszpenzióját laser fénnel sugározzuk be. A besugározott részecskéket a fényszóródás jelenségén alapulva vizsgáljuk a szórt fény detektálásával, amelynek jellemzői a vizsgált részecskék tulajdonságaira engednek következtetni. A DLS mérés a szórt fény időbeli intenzitás változásának vizsgálata, autokorrelációs függvényének felvételével és analizálásával. A fényszóródás jellege nagyban függ a részecske méretétől. Ha a laser fotonnal besugárzott részecske nano mérettartományba esik, akkor Reyleigh-szórás jelentkezik, míg a nagyobb, mikrométeres részecskék esetében már inkább a Mie-szórás figyelhető meg.

A méréseket etanolos közegben Horiba LA-950 típusú DLS készülékkel végeztem, 25°C-on.

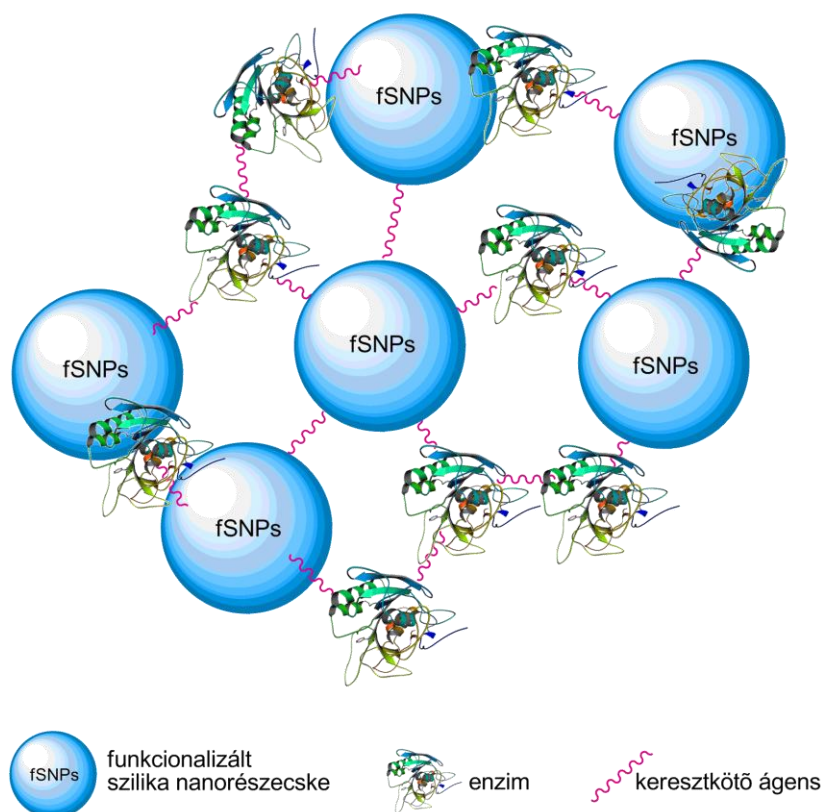
4. Eredmények és értékelésük

TDK munkám során egy olyan új típusú enzimrögzítési módszert dolgoztam ki, amely általánosan alkalmazható enzimek rögzítésére, emellett hatékony biokatalitikus működést tesz lehetővé. A kísérletek során különböző reaktív felülettel és mérettel rendelkező nanorészecskék és enzim molekulák között hoztam létre stabil, kovalens kötéseket bifunkciós keresztkötő ágensek segítségével.

Különböző nanoméretű anyagok, különösen a nanorészecskék egyre gyakrabban és egyre szélesebb körben alkalmazhatóak enzimek és egyéb biológiailag aktív anyagok rögzítésére. Kis méretükből fakadó előnyük, a nagy felület/térfogat arány rendkívül jó hatékonyságot jelent különösen a katalitikus folyamatok során. Ez az előny azonban számos technológiai hátránnyal is jár. A nanoméretű anyagok reakcióelegyből történő kinyerése, újrahasznosíthatósága komoly probléma és sok esetben gazdaságtalan.

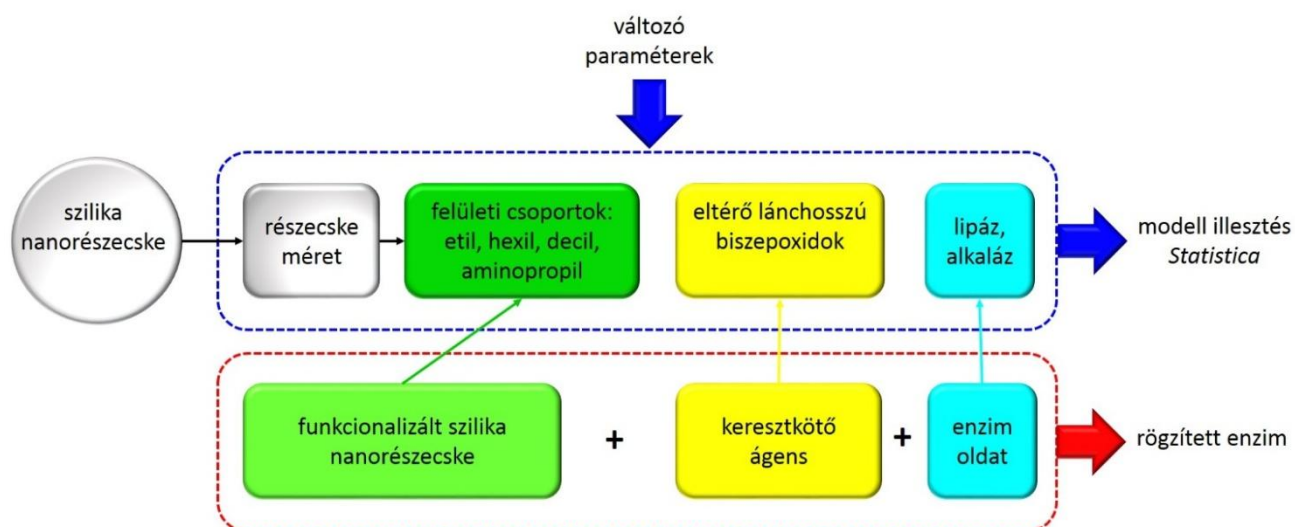
Az irodalomban ugyan már jól ismert a CLEA (Cross Linked Enzyme Aggregate) módszer, amely során keresztkötéseket hoznak létre az enzim molekulák között. Ez a technika számos enzim esetén alkalmazható, de a pusztán fehérje molekulákból felépülő aggregátumokban kialakuló szoros kapcsolat komoly diffúziós gátat jelenthet az enzimatikusan átalakítani kívánt szubsztrát molekulák számára.

A fent vázolt két módszer ötvöztetését különböző szempontok szerint optimáltam. Az enzimrögzítési folyamat során a különböző funkciós csoportokkal rendelkező nanorészecskék, az enzim molekulák és a bifunkciós reagensek egy időben történő reakciója alakítja ki azt az ún. hibrid mátrix szerkezetet (NHM enzimrögzítési rendszer), amelyben az enzim molekulák és a nanorészecskék stabilan egymáshoz rögzülnek (7. ábra).



7. ábra: Új típusú NHM enzimrögzítési rendszer

Munkám során vizsgáltam a nanorészecskék méretének és felületi csoportjainak, valamint a keresztkötéseket kialakító biszopoxidok hatását az enzimrögzítés folyamán (8. ábra). Az általam létrehozott új komplex NHM (Nano-hibrid mátrix) enzimrögzítési rendszerekben két fontos enzimes család immobilizálhatóságát vizsgáltam.

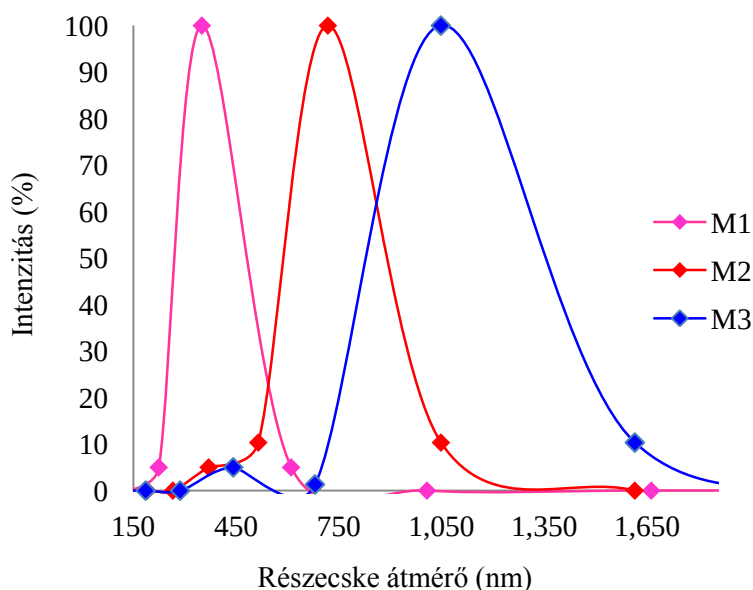


8. ábra: Az enzimrögzítési rendszer felépítése

A NHM enzimrögzítés során a rendszer vizsgálatára három fő paramétert választottam, melyek várhatóan befolyásolják majd a rögzített enzim biokatalitikus aktivitását. E három paraméter az alkalmazott szilika nanorészecskék mérete, felületi tulajdonságai, valamint a keresztkötéseket létrehozó biszepoxidok lánc hosszúsága.

4.1. A nanorészecskék méretkontrollált előállítása

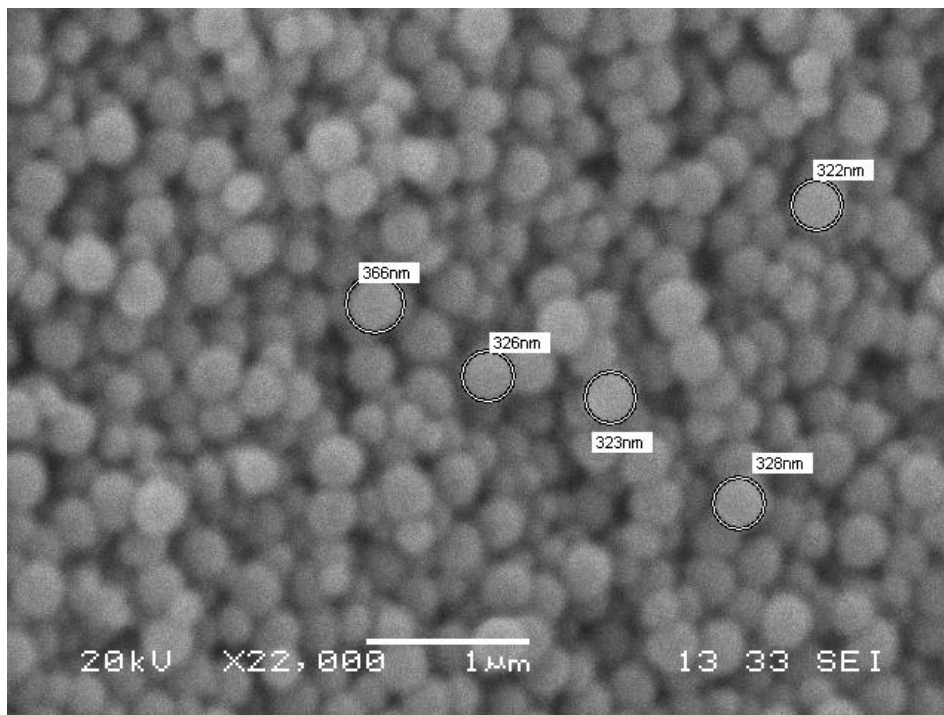
Az első paraméter az alkalmazott szilika nanorészecskék mérete volt. Ennek érdekében a nanorészecskéket három különböző összetétel szerint állítottam elő (M1, M2, M3). A részecske szintézis alapja során az irodalomban ismert Stöber módszer, amely során tetraalkoxi szilán prekursorból ammóniás alkoholos közegben képződnek a szférikus szilika részecskék [73]. A részecskéket tetraetoxiszilánból (TEOS) építettem fel, a szintézis során pedig az ammónium-hidroxid mennyiségének és az alkohol szénlánc hosszának hatását vizsgáltam a képződő részecskék méretére. Az eredményül kapott minták méreteloszlását dinamikus fényszóródás mérés (DLS, Dynamic Light Scattering) segítségével vizsgáltam.



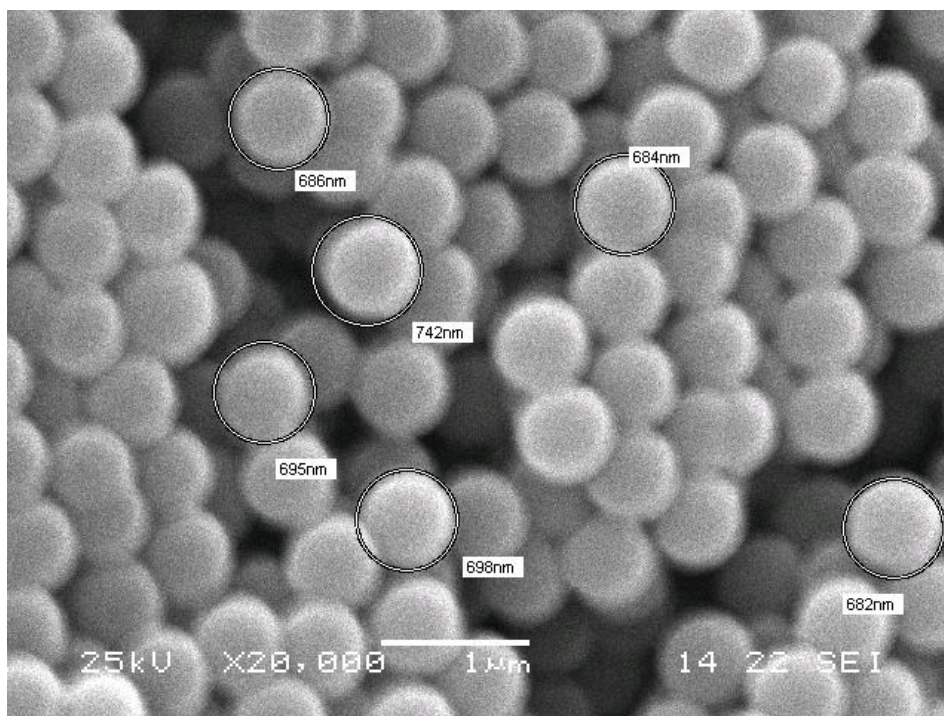
9. ábra: A szilika nanorészecskék méreteloszlása

A DLS mérésekből jól látható, hogy a minták méreteloszlása szűk, egyértelműen kivehető a három különböző részecske méret: 350, 700 és 950 nm (9. ábra). A kapott méreteket összevetve a nanorészecske szintézis paramétereivel elmondható, hogy az NH_4OH mennyisége és a megválasztott alkoholos közeg is befolyásolta a részecske átmérőt. A

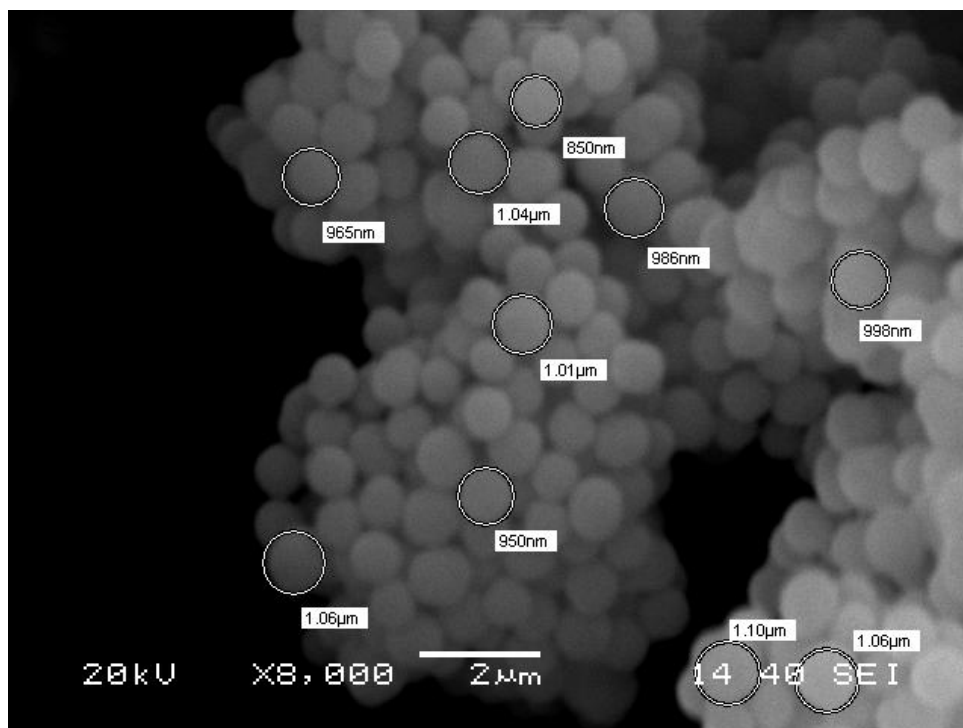
részecskék méretét és morfológiai tulajdonságait pásztázó elektronmikroszkóp (SEM; Scanning Electron Microscope) segítségével is vizsgáltam (10, 11, 12. ábra).



10. ábra: M1 jelű szilika nanorészecskék SEM felvétele



11. ábra: M2 jelű szilika nanorészecskék SEM felvétele



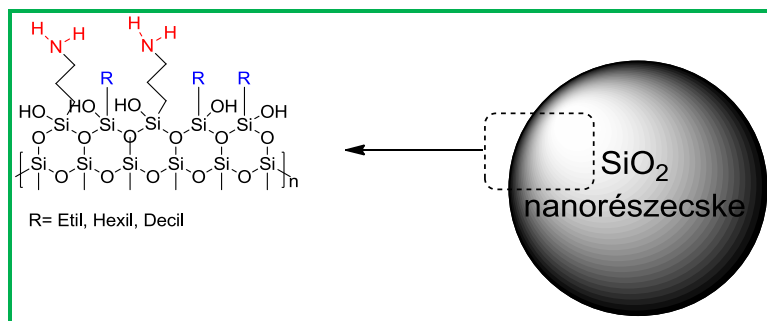
12. ábra: M3 jelű szilika nanorészecskék SEM felvétele

A képeken látható, hogy a részecskék alakja szabályos, szférikus, szűk méret eloszlásúak és ez egybevág a DLS mérés során tapasztaltakkal. A részecskék méretét leginkább az alkalmazott NH_4OH mennyisége és az alkalmazott alkohol szénlánc hosszúsága befolyásolta. Az oldószer polaritásának (dielektromos állandójának) tehát kulcsszerepe van a részecskeméret szabályozásában. Az általam módosított Stöber módszer rokon viselkedésű az irodalomban leírtakkal [74].

4.2. A részecskék felületmódosítása

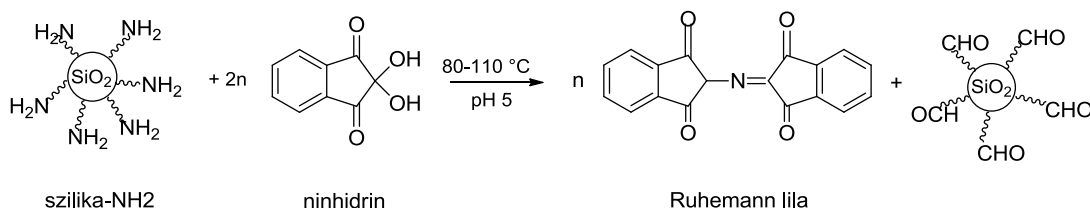
A nano-hibrid rendszerek előállítása során, amikor a cél stabil, kovalens kötések kialakítása az enzim molekulák és a szilika nanorészecskék között, nagyon fontos a jól definiált, egységes, megfelelően funkcionizált szilika nanorészecskék jelenléte. Ahhoz, hogy az enzim molekulák hatékonyan rögzüljenek, mindenképpen szükséges a nanorészecske felületén olyan funkciós csoportok kialakítása, amelyek egyszerű körülmények között, rövid idő alatt reakcióba vihetők. Ilyen funkciós csoportok lehetnek az amino csoportok, amelyek mint jó nukleofil ágensek számos vegyülettel könnyen reakcióba vihetők. Már számos esetben jutottak a kutatók arra a megállapításra, hogy az ún. kevert felületek, - amik nem csak a reaktív funkciós csoportokat, hanem inert (tehát az elsődleges kémiai kötésekben részt nem vevő) csoportokat is tartalmaznak - sokkal hatékonyabb enzimrögzítéseket tesznek lehetővé. Ennek okán a szilika nanorészecskék felületét reaktív amino csoportot tartalmazó organo

szilánnal (3-aminopropil trimetoxiszilán, 3-aminopropil trietoxiszilán) és inert organoszilánokkal (etil-trimetoxiszilán, hexil-trietoxiszilán, decil-trietoxiszilán) is módosítottam (13. ábra).



13. ábra: Szilika nanorészecske funkcionálizálása

A reaktív és inert funkciókat tartalmazó szilánok különböző arányú elegyével végeztem el funkcionálizálási eljárást mindhárom méretű nanaorészecske esetében. A felületmódosítás végeztével annak sikerességét Ninhidrin-reagenssel történő oxidatív dezaminálással állapítottam meg (14. ábra).



14. ábra: A Ninhidrin reagens és a szilika nanorészecskén lévő primer amino csoportok reakciója

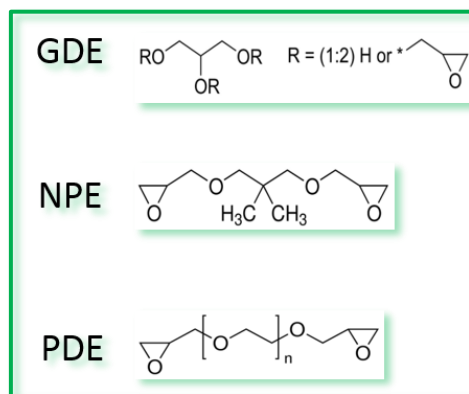
Az amino csoport meghatározásnál a felületmódosítás során alkalmazott 3-aminopropil-trimetoxiszilán ismert koncentrációjú n-propanolos oldatával és Ninhidrin reagenssel kalibrációt végeztem. Ezt követően meghatároztam az egyes felületmódosított nanorészecskék amino csoport tartalmát. A kapott eredmények alapján látható volt, hogy a kiindulási amino/inert csoport arány a felületmódosítás után is érvényesült, azonban az amino csoportok összmenyiségét 5-10 %-os eltéréssel lehetett meghatározni.

4.3. Lipáz enzim rögzítése hagyományos CLEA módszerrel és NHM rendszerekben

A *Candida antarctica* törzsből származó B típusú lipáz bifunkciós keresztkötőkkel történő CLEAs képzését a kutatócsoportban korábban már vizsgálták. A legelterjedtebben használt glutaraldehydet sikeresen kiváltották egy biszepoxi molekulával, a glicerol-diglicidiléterrel (GDE). Az enzimaktivitási tesztek nem csak a *Candida*, hanem más törzsből származó

lipázok és ammónia liázok esetében is azt mutatták, hogy a két végén epoxi gyűrűt tartalmazó linker molekulával jobb eredmények érhetőek el, mint a széles körben elterjedt glutáraldehiddel [37]. Ezen felüli előny, hogy a biszepoxi vegyületek toxikussága is csekélyebb, mint a glutáraldehidé.

Ezen tapasztalatokból kiindulva három eltérő vázú biszepoxi vegyületet alkalmaztam a lipáz CLEAs előállításánál (15. ábra).



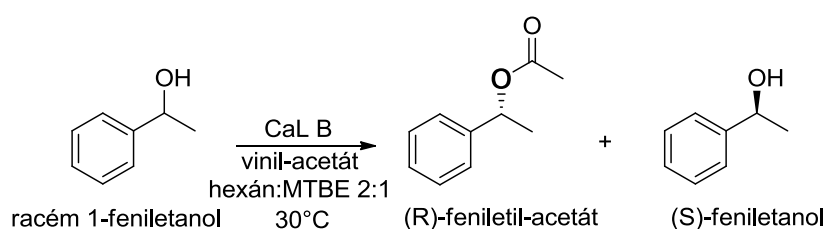
15. ábra: A CLEAs képzés során alkalmazott biszepoxi vegyületek

A NHM rendszerek kialakítása során is ugyanezt a háromféle epoxi molekulát alkalmaztam az előző fejezetben bemutatott funkcionizált nanorészecskék és az alkalmazott enzimek közötti kovalens kötések kialakítására. A nanorészecskék felületmódosítása során kialakított amino csoportok és az enzim aminosav láncain található amino, tiol, hidroxil csoportok között a két végén oxirán gyűrűt tartalmazó bifunkciós epoxi molekulák képesek stabil, irreverzibilis kovalens kötések kialakítására. A hagyományos CLEAs képzés során a kötések két vagy több enzim molekula között jönnek létre, hiszen ez esetben nincsen jelen semmilyen szilárd hordozó vagy egyéb templát anyag.

A keresztkötő tulajdonsága is várhatóan beleszól az enzimkészítmény aktivitásába, hiszen az NHM rendszer kialakulása végső soron egy kvázi térhálós mátrixot eredményez, így annak átjárhatósága, mozgékonyága fontos paraméter lehet a biokatalitikus folyamatok lejátszódása során.

Az irodalomból jól ismert hagyományos CLEAs és az általam létrehozott NHM enzimrögzítési módszereket első körben úgy hasonlítottam össze, hogy mindhárom, a 15. ábrán bemutatott biszepoxi reagenssel külön-külön CLEAs készítményeket hoztam létre, majd a CLEAs képzést olyan szilika nanorészecskék jelenlétében hajtottam végre, amelyek

nem estek át semmilyen felületmódosítási eljáráson, tehát nem tartalmaztak se inert, se reaktív csoportot. Erre azért volt szükség, hogy megvizsgáljam, hogy egyáltalán létrejöhet-e az enzim rögzülése a különböző méretű nanorészecskék jelenlétében. A rögzített lipáz készítményeket minden esetben a racém 1-feniletanol acilezési reakciójában vizsgáltam (16. ábra). Az enzim teszteket párhuzamosan teljesen azonos körülmények között végeztem el, a reakciókból levett mintákat pedig királis állófázisú GC segítségével analizáltam (ld. 3.9. fejezet). A kapott kromatogramokból a 2.2. fejezetben ismertetett képletek alapján határoztam meg az enzim működésére jellemző paramétereket, azaz a konverziót (c), az enantiomertisztaságot (ee_P) és a biokatalitikus aktivitás (U_B) értékeket.



16. ábra: A racém 1-feniletanol lipáz katalizált acilezése

4. táblázat: Rögzített lipázok biokatalitikus működése a racém 1-feniletanol acilezésében

Keresztkötő	Szilika	c	ee_P	U_B
ágens	nanorészecske	(%)	(%)	(U/g)
GDE	-	2,0	97,3	5,4
NPE	-	0,5	90,6	1,4
PDE	-	0,8	94,4	2,1
GDE	350 nm	5,9	98,7	16,3
NPE	350 nm	8,8	99,1	24,4
PDE	350 nm	6,9	99,2	18,9
GDE	700 nm	5,3	98,7	14,6
NPE	700 nm	5,5	99,1	15,1
PDE	700 nm	5,7	99,0	15,7
GDE	950 nm	4,0	98,8	11,1
NPE	950 nm	3,5	97,9	9,6
PDE	950 nm	1,8	96,5	5,1

Az eredményekből látható, hogy a hagyományos CLEAs készítmények minden esetben gyengébb eredményeket mutattak, mind a konverzió, mind az enantiomertisztaság terén. A három különböző részecske méretet tekintve, a legkisebb 350 nm átmérőjű nanorészecske

jelenlétében létrehozott rögzítés bizonyult a legjobbnak. A részecskék méretének további növelése rontja az eredményeket, azonban minden esetben jobbak az enzimatisz működések, mint a hagyományos, pusztán csak enzimet tartalmazó minták esetében. Ennek oka feltehetően az, hogy a részecskék jelenléte nem engedi igazán közel az enzim molekulákat, tehát növeli az enzim közötti szabad teret, amely kedvező a biokatalízis során, hiszen a szubsztrát molekulák szabadabban mozoghatnak. A nagyobb részecskeméreteknél, különösen a már majdnem mikronos nagyságrendbe eső szilika részecske esetében, a túl nagy részecske átmérő már fizikailag akadályozza az enzimek közötti kovalens kötések kialakulását, ezáltal elképzelhető, hogy kevesebb enzim molekula képes stabilan megkötődni a rögzítés során. Mivel az rögzítés befejeztével minden esetben a készítmények alapos pufferrel történő mosása következik, a be nem rögzült enzimek ekkor kimosódhatnak, így csak a biztosan beépült enzimek vehetnek részt a biokatalitikus reakciókban. Érdemes azt is megjegyezni, hogy a valószagos enzimaktivitás a nanorészecskés rendszerekben még ennél is jobb, hiszen ezek a rögzített biokatalizátorok fajlagosan kevesebb enzimet tartalmaznak, mint az egyszerű CLEAs rendszerek.

A továbbiakban olyan enzimkészítményeket állítottam elő és vizsgáltam, amelyben a szilika nanorészecskék előzetes felületmódosításon mentek keresztül, amely során egy előre meghatározott arányban kaptak inert (etil-, hexil-, vagy decil-) illetve reakív (amino-) csoportokat. Az így előállt nanorészecskékkal és a korábban is bemutatott három különböző biszepoxi vegyülettel az NHM enzimrögzítéseket végeztem el.

Az új NHM rendszer viselkedésének megismeréséhez, optimálásához kísérlettervezési modellt alkalmaztam. Az optimálandó objektum a rendszert felépítő nanorészecskék mérete, a felületmódosító minősége és aránya, valamint a keresztkötő ágens minősége 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 (pl. részecskeméret, keresztkötő ágens), amelyektől Y értéke függ. Amennyiben e matematikai modellt optimálásra kívánjuk felhasználni, a célfüggvény függő változójának maximumát keressük, melyhez a faktorok e szempontból optimális beállítási értékei (faktorok szintjei) tartoznak.

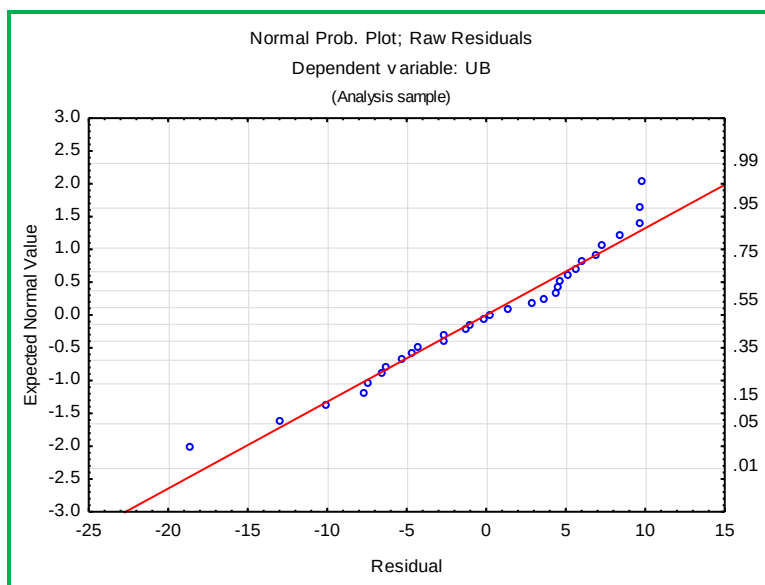
Annak érdekében, hogy megkapjuk a legjobb kísérlettervet, definiálni kell a faktorok nevét, számát és szintjeiket, valamint a függő változókat (a *Statistica* program alkalmazásával). A

kísérlet során alkalmazott faktorok az NHM rendszert felépítő részecske mérete, a felületmódosító minősége, valamint összetételi aránya, és végül a keresztkötő ágens minősége. A függő változók pedig a biokatalitikus aktivitás és szelektivitás értékei. A kísérlettervet a *Statistica* program *Experimental Design Builder* opciójával készítettem, ahol megadtam, hogy a faktorok főhatására vagyok kíváncsi, ezen felül a felületmódosító csoportok és azok aránya, valamint a felületmódosító és a keresztkötő közötti másodlagos kölcsönhatásokra. Ezeket a pontokat a következő táblázat mutatja be:

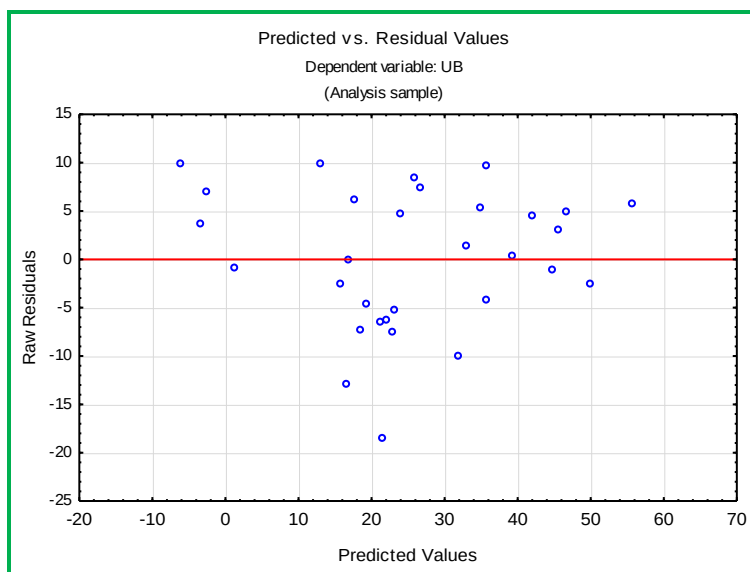
5. táblázat: A kísérleti terv

Kísérletek száma	Részecskeméret (nm)	Részecske felületére felvitt csoportok	Csoportok aránya (n/n)	Keresztkötő ágens
1	950	etil / amino	1/0	PDE
2	950	etil / amino	1/1	GDE
3	950	etil / amino	4/1	NPE
4	950	hexil / amino	8/1	NPE
5	950	hexil / amino	1/1	NPE
6	950	hexil / amino	8/1	PDE
7	950	hexil / amino	1/0	GDE
8	950	decil / amino	4/1	GDE
9	950	decil / amino	8/1	PDE
10	950	decil / amino	1/0	NPE
11	950	decil / amino	2/1	PDE
12	700	etil / amino	4/1	GDE
13	700	etil / amino	1/0	GDE
14	700	etil / amino	2/1	PDE
15	700	etil / amino	4/1	NPE
16	700	hexil / amino	1/0	PDE
17	700	hexil / amino	1/1	NPE
18	700	hexil / amino	2/1	PDE
19	700	hexil / amino	8/1	GDE
20	700	decil / amino	1/1	GDE
21	700	decil / amino	2/1	PDE
22	700	decil / amino	8/1	NPE
23	350	etil / amino	1/0	NPE
24	350	etil / amino	1/1	PDE
25	350	hexil / amino	2/1	PDE
26	350	hexil / amino	4/1	GDE
27	350	hexil / amino	8/1	GDE
28	350	hexil / amino	1/0	NPE
29	350	decil / amino	1/1	NPE
30	350	decil / amino	2/1	GDE
31	350	decil / amino	4/1	GDE

Kísérletek tervezésekor alapvető követelmény az alkalmazott modell eloszlásának és reziduumának vizsgálata, amely során az általam vizsgált változók közül először a biokatalizátor aktivitás (U_B) értékeket néztem meg.



17. ábra: A biokatalizátor aktivitás eloszlás függvénye - Gauss hálós ábra



18. ábra: A biokatalizátor aktivitás eloszlás függvénye – reziduuma

Látható, hogy a pontok alapvetően jól illeszkednek az egyenesre, tehát az eloszlás normális eloszlásnak tekinthető (17. ábra). A reziduumok pedig a kísérletek elvégzésének sorrendjében nem mutatnak rendszerességet, véletlenszerűen helyezkednek el, tehát a modell alkalmas a rendszer viselkedésének statisztikai elemzésére (18. ábra).

A varianciaanalízis arra a kérdésre ad választ, hogy van-e a különböző faktoroknak hatása a biokatalizátor aktivitásra. A kísérlettervezés során a rendszerre illesztett matematikai

modellben a függő változóra számított (U_B) értékeket megadtam, majd a *Statistica* programmal meghatároztam a rendszer viselkedésének szignifikáns paramétereit (6. táblázat, zölddel jelölve).

6. táblázat: Szignifikáns változók vizsgálata U_B értékekre

Hatás	Szignifikancia egyváltozós vizsgálata U_B értékekre				
	Szigma korlátozott paraméterezés, Std. hiba becslés/ 2,07887				
	SS	Szabadsági fokok száma	MS	F	p
Tengelymetszet	20474,51	1	20474,51	266,7685	0,000000
Méret	112,0	2	56,0	0,7296	0,494485
Felület	3022,66	2	1511,33	19,6916	0,000019
Arány	3786,48	4	946,62	12,3338	0,000032
Keresztkötő	5,49	2	2,75	0,0358	0,964920

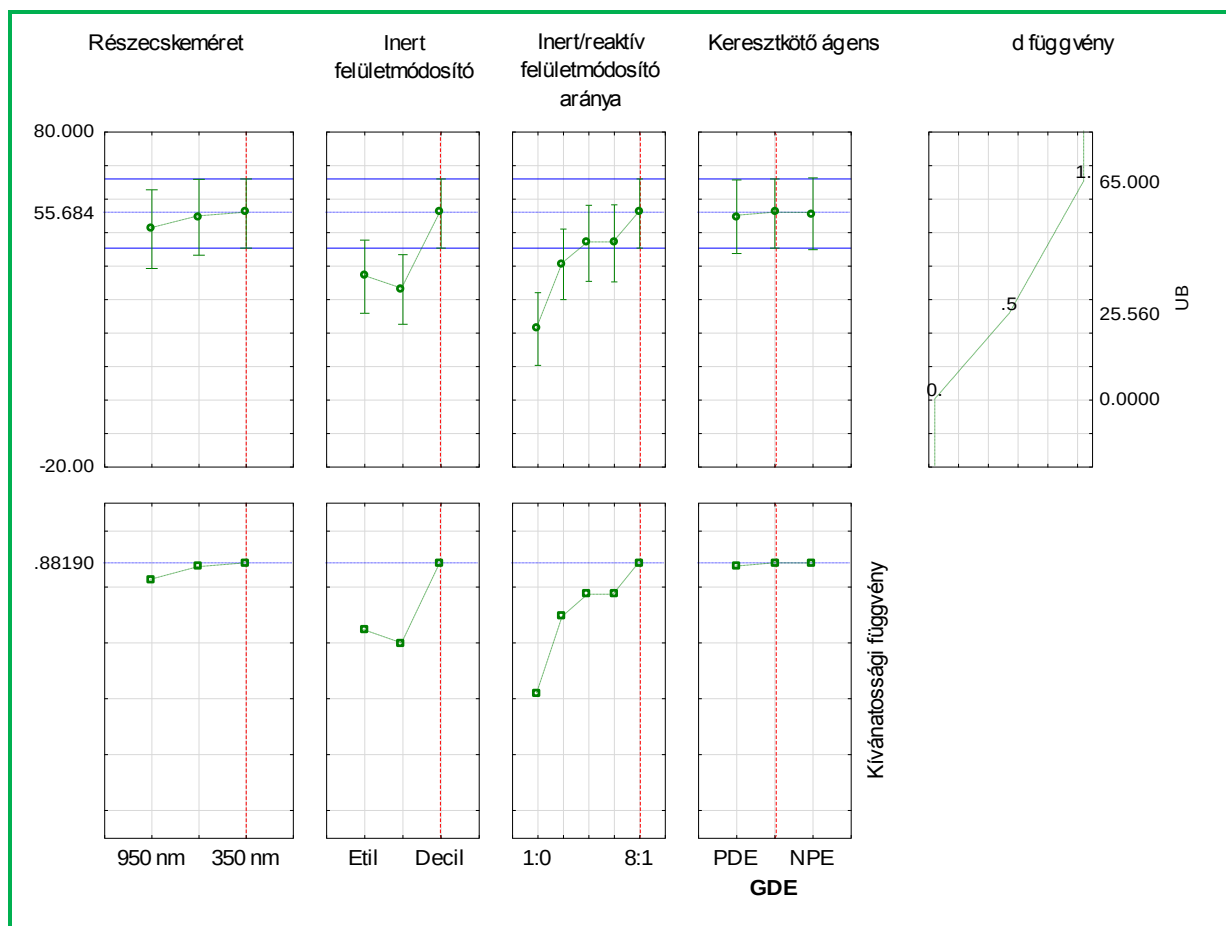
A második oszlopban a négyzetösszegek (SS), a harmadik oszlopban a szabadsági fokszámok láthatóak. A méret szabadsági foka 2, mivel három részecskeméretet hasonlítottunk össze, a felületnél és a keresztkötőnél szintén, az arány szabadsági foka pedig 4, mivel itt öt különböző arányt hasonlítottunk össze. A negyedik oszlop a szórásnégyzeteket (MS) tartalmazza. A következő két oszlop a próbastatisztika (F) és p értékét mutatja. A felületmódosító és az inert/reaktív csoportok aránya esetén látható, hogy az F próbastatisztika értéke nagy, így kicsi annak p valószínűsége, hogy ekkora, vagy ennél nagyobb értéket kapjunk a véletlen műveként, ha a faktornak nem lenne hatása. A szignifikáns hatások zölddel vannak jelölve, ahol p értéke kisebb, mint 0,05.

A következő ábrán (19. ábra) a négy faktor különböző szintjeinek hatását grafikusan ábrázoltam. Az ábrán található d-függvényt Harrington dolgozta ki 1965-ben. A függvény a (0; 1) intervallumban vesz fel értékeket.

$d=1$ az y felső határán, melynél nagyobb érték nem fordulhat elő,

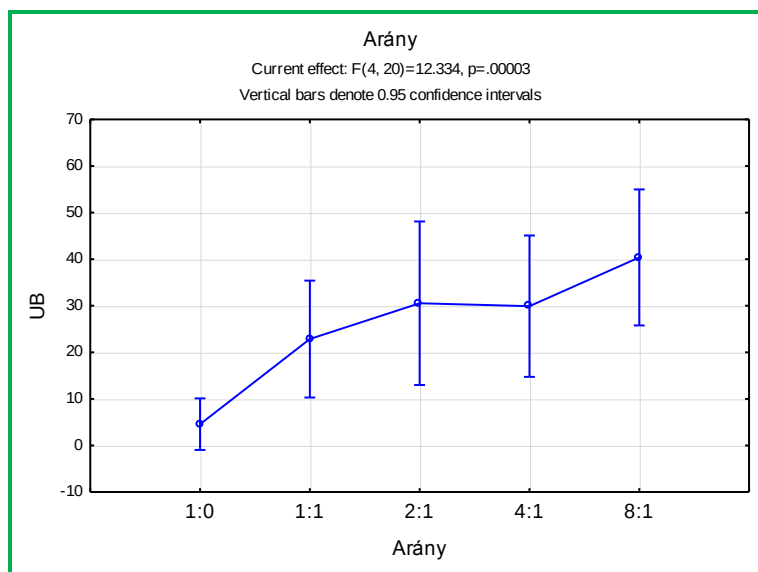
$d=0$ az y alsó határértékénél, melynél kisebb érték nem lehetséges.

A d-függvény használható optimum keresésére. A d kívánatossági függvény és a közvetlenül mért függő változók (U_B , ee_p) közötti összefüggés a *Statistica* programban lineáris függvény a $d=(0; 0,5)$ és a $d=(0,5; 1)$ intervallumokban. A program a d-függvényt optimalizálja, ez akkor is alkalmazható, ha egyszerre csak egy függő változóra akarunk optimalizálni [75].



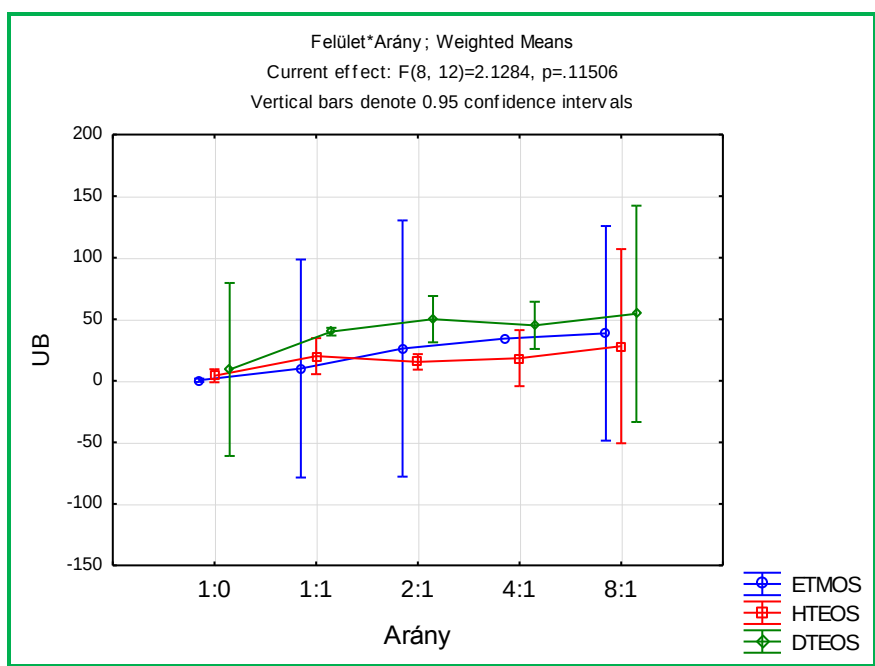
19. ábra: Profilok a biokatalizátor aktivitás értékekre lipáz enzim esetén

A 19. ábra felső részén a négy faktor függvényében a biokatalizátor aktivitás célfüggvény, az alsó ábrán a kívánatossági függvény látható. A program megkeresi azokat a beállításokat, amelyekhez a d-függvény maximuma tartozik. Optimalizáláskor a program nemcsak a főhatásokkal számol, hanem a teljes modellel, ehhez képest az ábrán csak a főhatásokat látjuk. Az ábrán látható, hogy a részecskeméretnek és a keresztkötnőnek nincs szignifikáns hatása. A felületmódosító hatása a legjelentősebb, a biokatalizátor aktivitásra gyakorolt szerepe a decil-csoport esetén a legjobb. A felületmódosító arányának valamivel kisebb, de szintén jelentős hatása van, az optimális beállítás ebben az esetben a 8/1-es inert/reaktív felületmódosító arányra esik.



20. ábra: Az inert és reaktív felületmódosítók arányainak hatása a biokatalizátor aktivitásra

A 20. ábrán látható, hogy az 1/0 aránynál, vagyis csak az inert felületmódosítót tartalmazó szintnél a legkisebbek a biokatalizátor aktivitás értékek, ami annak tulajdonítható, hogy ekkor a szilika nanorészecske felületén nincsenek reaktív amino csoportok, amelyek képesek lennének az enzimmal kovalens kötést kialakítani. Ebben az esetben a rendszer hasonló a 4. táblázatban bemutatott enzimkészítményekhez, amelyeknél semmilyen felületkezelés nem történt a szilika nanorészecskéken. Bár a hosszabb alkil csoportok segíthetik az enzim hidrofób adszorpcióját a felületen, ez a rögzülési erő nem igazán erős ahhoz, hogy a fehérje molekula tartósan a hordozón maradjon, ezáltal a készítmény pufferes mosásával az enzim könnyedén eltávolítható. Az 1/1 inert és aktív organoszilán aránynál már javulnak az enzimaktivitás értékek, de a legjobb aktivitást ott kapjuk, ahol 8/1 az inert és aktív hányad, vagyis az sem előnyös, ha túl sok amino csoport van a felszínen. Ez azzal magyarázható, hogy a sok reaktív csoport „túlzsúfoltta” teheti a felületet, mivel az enzimrögzítés során nagy feleslegben alkalmazott keresztkötő ágens telítheti a nanorészecske felületét. Ez úgy történhet meg, hogy az enzim molekulánál több nagyságrenddel kisebb keresztkötő ágens könnyedén eléri a részecske felületén lévő amino csoportokat, és ha azokból egymáshoz közel, térben túl sok helyezkedik el, akkor megnő a valószínűsége annak, hogy a mindkét végén epoxi gyűrűvel rendelkező keresztkötő két szomszédos amino csoportot kapcsol össze az adott részecske szegmensén. Ezáltal gyakorlatilag leárnyékolja a kötőhelyeket az enzim molekulák számára. Ezzel magyarázható, hogy miért lehet előnyös, ha a reaktív csoportokat egymástól kissé távolabb, rendezettebb formában helyezzük a hordozón. Ez az állapot a kapott eredmények alapján az inert csoportok minőségével és mennyiségével befolyásolható.



21. ábra: Az inert felületmódosítók és azok reaktív felületmódosítókkal képzett különböző arányainak hatása a biokatalizátor aktivitásra

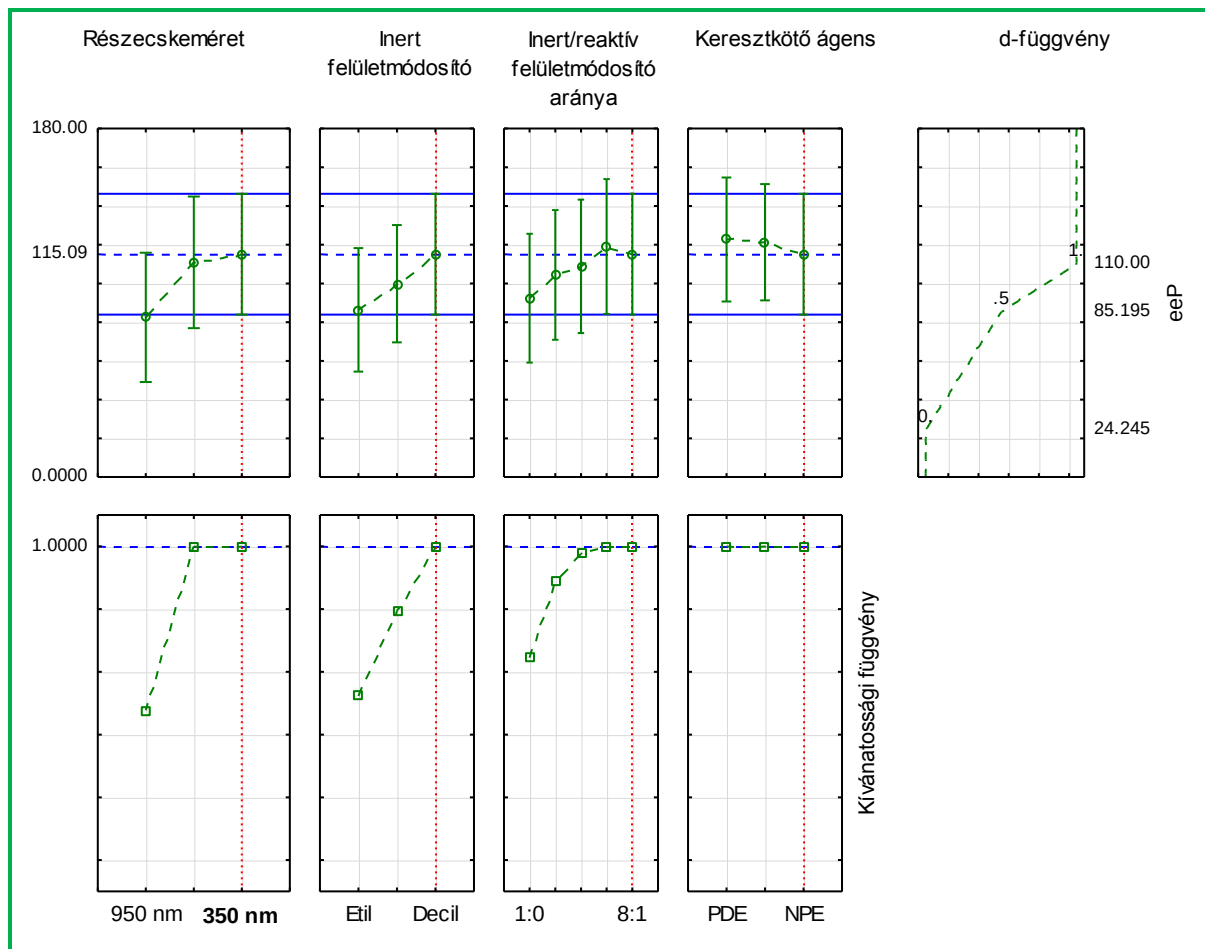
Mivel a főhatások közül a felületmódosítónak és az alkalmazott arányuknak külön-külön van szignifikáns hatása, ábrázoltam a két faktor együttes hatását is. Azonban, ahogy az a 21. ábrán is látható, nincs szignifikáns kölcsönhatás a felületmódosító fajtájának és azok aránya között. Az enzimkatalizált folyamatok kulcsfontosságú jellemzője az aktivitás mellett a reakció során képződő termék enantiomertisztasága (ee_p). Az U_B függő változóhoz hasonlóan, itt is meg kell állapítani a szignifikáns paramétereket (7. táblázat).

7. táblázat: Szignifikáns változók vizsgálata az ee_p értékekre

Hatás	Szignifikancia egyváltozós vizsgálata ee_p értékekre Szigma korlátozott paraméterezés				
	SS	Szabadsági fokok száma	MS	F	p
Tengelymetszet	262662,7	1	262662,7	1889,397	0,000000
Méret	173,1	2	85,6	0,623	0,546595
Felület	874,1	2	437,0	3,144	0,064987
Arány	2562,3	4	640,6	4,608	0,008444
Keresztkötő	177,1	2	88,5	0,637	0,539311
Hiba	2780,4	20	139,0		

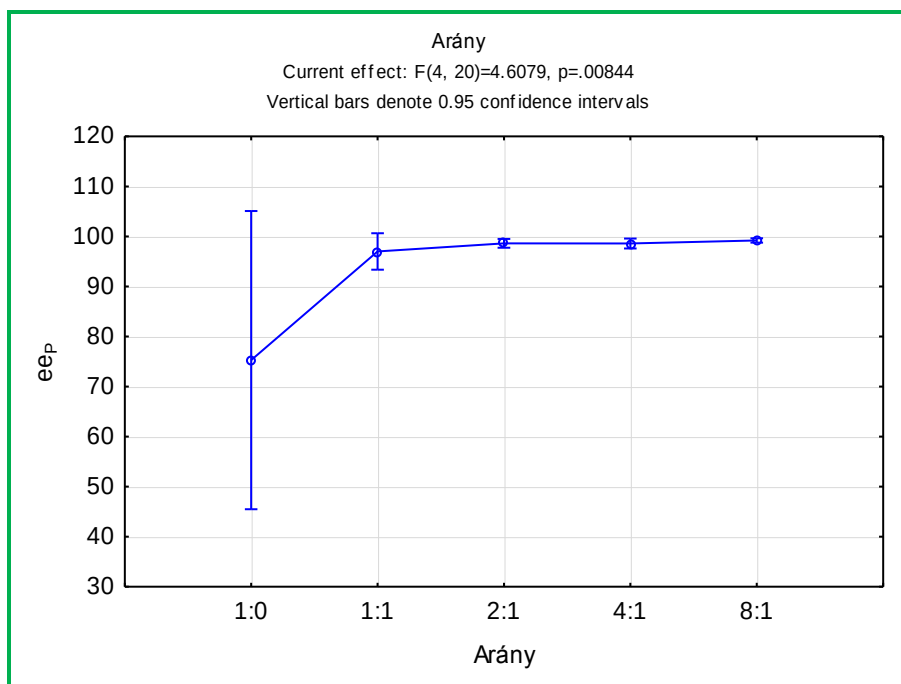
A táblázat alapján az enantiomertisztaság értékeire a felületmódosítók aránya van szignifikáns hatással ($p<0,05$). Itt a felületmódosítónak látszólag nincs hatása, de a p értékeknél

megfigyelhető, hogy jóval kisebb az értéke, mint a méretnek, vagy keresztalkotó ágensnek. Ezt követően grafikusán is ábrázoltam az eredményeket (22. ábra).



22. ábra: Profilok az enantimertisztaság értékekre lipáz enzim esetén

A grafikus ábrák is a táblázat adataival vannak összhangban. A 22. ábra első sorának ábráin látszik, hogy a szórások nagyjából lefedik egymást, egyedül az aránynál van egy kiugró érték, így annak szignifikáns a hatása. Hogy ez jobban láthatóvá váljon, a különböző arányokról és a hozzájuk tartozó szórásokról hatásábrát készítettem.

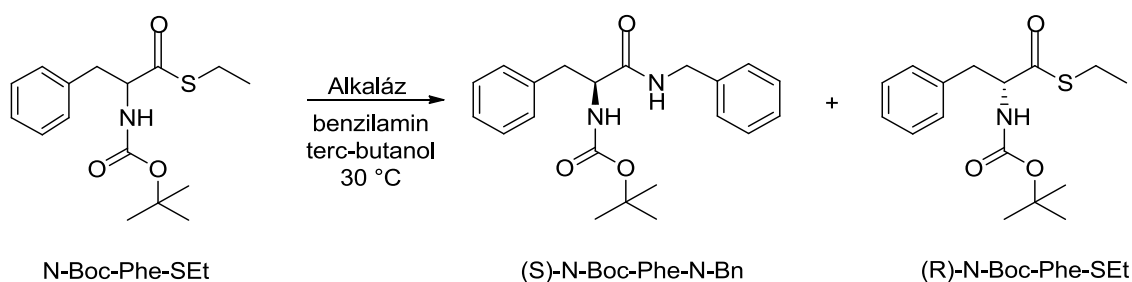


23. ábra: Az inert és reaktív felületmódosítók különböző arányainak hatása az enantiomertisztaságra

A hatására alátámasztja a fentebbi megállapítást. Látható, hogy ahol nem volt reaktív csoport, ott sokkal nagyobb az ingadozás az értékek között. Ha a reaktív csoport megjelenik, ott már kezd szűkülni a tartomány, azonban ott a legkisebb az ingadozás, ahol alacsonyabb a reaktív organoszilán aránya az inerthez képest. Az enzimkatalízis során egy adott szubsztrátra vonatkoztatott szelektivitás nagyban függ az enzim természetétől. Egy rögzített enzim rendszernél a diffúziós körülményeknek döntő szerep jut, melyet a hordozó anyag fizikai-kémiai karaktere igen erősen befolyásolhat. Ezért az ee_p 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.

7.3. Alkaláz enzim rögzítése hagyományos CLEA módszerrel és NHM rendszerekben

A 4.3. fejezetben tárgyalt lipáz hagyományos CLEA módszerrel történő rögzítését, valamint a kezeletlen felületű szilika nanorészecskék jelenlétében megvalósított változatát és az új NHM enzimrögzítéseket egy teljesen más karakterű enzim, az alkaláz rögzítésére is kiterjesztettem. A rögzített alkaláz enzimkészítményeket minden esetben a *N*-Boc-Phe-S-Et benzilaminnal történő amidálási reakciójában teszteltem, teljesen azonos körülmények között (24. ábra). A reakcióelegyekből levett mintákat királis állófázisú HPLC segítségével vizsgáltam (1. 3. 9. fejezet), a kapott kromatogramokból pedig a 2. 2. fejezetben bemutatott összefüggések alapján határoztam meg a biokatalitikus jellemzőket.



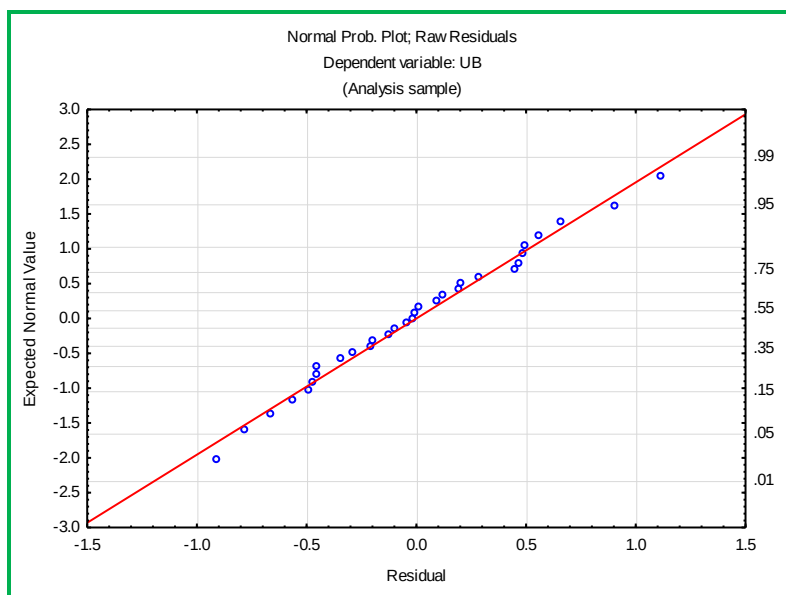
24. ábra: A N-Boc-Phe-S-Et alkaláz által katalizált amidálása

8. táblázat: Rögzített alkaláz készítmények a racém-N-Boc-Phe-S-Et amidálásában

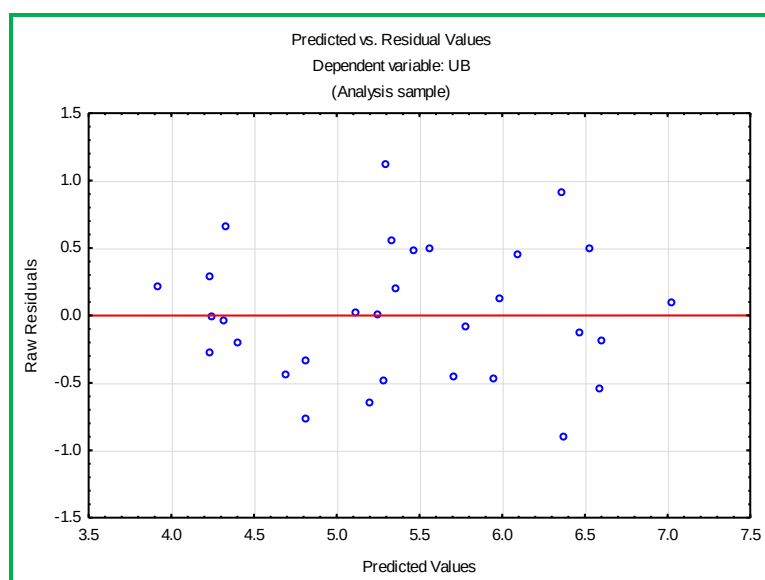
Keresztkötő ágens	Szilika nanorészecske	c (%)	ee _p (%)	U _B (U/g)
GDE	-	13,3	90,8	0,3
NPE	-	6,1	76,0	0,1
PDE	-	15,6	90,2	0,4
GDE	350 nm	25,9	96,6	0,6
NPE	350 nm	34,2	96,6	0,8
PDE	350 nm	30,8	96,7	0,7
GDE	700 nm	20,9	95,1	0,5
NPE	700 nm	21,6	96,8	0,5
PDE	700 nm	22,3	94,4	0,5
GDE	950 nm	25,0	95,9	0,6
NPE	950 nm	27,7	96,1	0,6
PDE	950 nm	31,6	97,0	0,7

A 8. táblázat eredményeiből látható, hogy a lipázhoz hasonlóan a hagyományos CLEAs készítmények jóval gyengébb enzimatisz működést produkáltak, mint a szilika nanorészecskéket tartalmazó minták. Látványos a különbség, nem csak az elért konverziókban, hanem az enantiomertisztaságokban is. Hasonlóságot mutat a lipázokkal az is, hogy a legkisebb, 350 nm körüli részecske méret volt a leghatékonyabb az alkaláz rögzítése során, viszont érdekes, hogy ezt nem a közepes, hanem a legnagyobb 950 nm átmérőjű részecskét tartalmazó rendszerek követik.

A lipáz esetében alkalmazott NHM rendszert teljes egészében az alkaláz rögzítésére is adoptáltam. Az 5. táblázatban feltüntetett kísérleti terv alapján végeztem el az enzím rögzítési kísérleteket. A terv alapján eredményül kapott adatok normalitását, valamint a reziduumokat szintén megvizsgáltam (25. és 26. ábra).



25. ábra: A biokatalizátor aktivitás eloszlás függvénye - Gauss hálós ábra



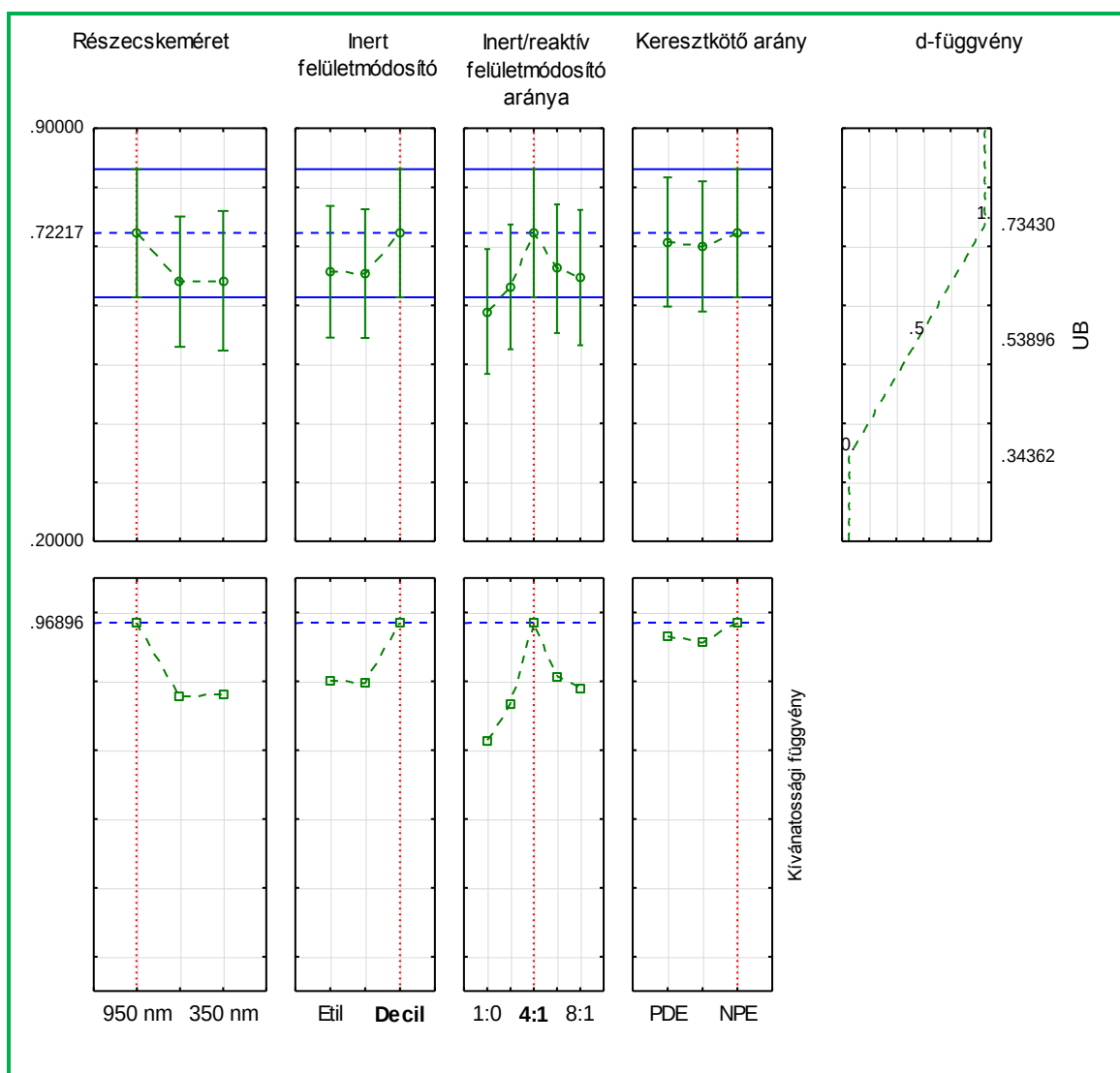
26. ábra: A biokatalizátor aktivitás eloszlás függvénye – reziduuma

Az eloszlás igazodik a normál eloszláshoz, és a mérések reziduuma is véletlenszerű, a nulla körül ingadozik, tehát az enzimrögzítési kísérlet során felállított modell ismét alkalmasnak bizonyult. Ezután ábrázoltam a szignifikáns hatásokat a biokatalizátor aktivitásra nézve.

9. táblázat: Szignifikáns változók hatása az U_B értékekre

Hatás	Szignifikancia egyváltozós vizsgálata U_B értékekre Sztigma korlátozott paraméterezés, Std. hiba becslés/ 0,0904839				
	SS	Szabadsági fokok száma	MS	F	p
Tengelymetszet	8,755455	1	8,755455	1069,388	0,000000
Méret	0,042230	2	0,021115	2,579	0,100818
Felület	0,028952	2	0,014476	1,768	0,196308
Arány	0,052120	4	0,013030	1,591	0,215370
Keresztkötő	0,003768	2	0,001884	0,230	0,796511
Hiba	0,163747	20	0,008187		

A 9. táblázat alapján nincs szignifikáns hatása egyik fő komponensnek sem. A biokatalizátor aktivitás értékek hasonlóak lettek a különböző részecskeméret, felületmódosító, inert/reaktív csoport arányok és keresztkötő ágensek ellenére is. Ezt alátámasztja a grafikus ábrázolás is. Látható, hogy a méret esetén a legnagyobb, 950 nm-es bizonyult a legjobbnak, felületmódosító esetén a DeTEOS, keresztkötő esetén pedig az NPE és PDE egyforma aktivitás értékeket eredményezett, viszont ezek a hatások nem térnek el szignifikánsan a többitől (27 ábra).



Ennek az lehet az oka, hogy az alkaláz enzim más felszíni tulajdonságokkal rendelkezik, mint a lipáz, aktivitása kevésbé érzékeny a körülötte lévő környezetre, hasonlóan jó aktivitással rendelkezik szinte mindegyik NHM rendszer esetén. Ami lényeges különbséget jelentett, az a szilika nanorészecskék jelenléte, hiszen ezek egyértelműen javították az enzimátikus képességeket, a hagyományos kereskedelmi forgalomban kapható CLEAs készítményhez képest. Az is látható, hogy a funkciós csoportokat tartalmazó rendszerek esetében a reaktív amino csoportnak azért szerepe van, hiszen jelenlétében jobbak voltak a biokatilitikus aktivitások. Ez azzal magyarázható, hogy ha az enzim működésére közvetlenül nem is hat, de elősegíti az enzim molekula stabil jelenlétét a rögzítés folyamán. Mivel a felületi csoportoknak és a keresztkötő ágenseknek nem volt szignifikáns hatásuk, elmondható, hogy a szilika nanorészecskék alapvetően stabilan bent tartják az enzimet a mátrixban, valamint lazítják a rendszer belső struktúráját. Ezáltal nagyobb csatornák képződnek a készítmény

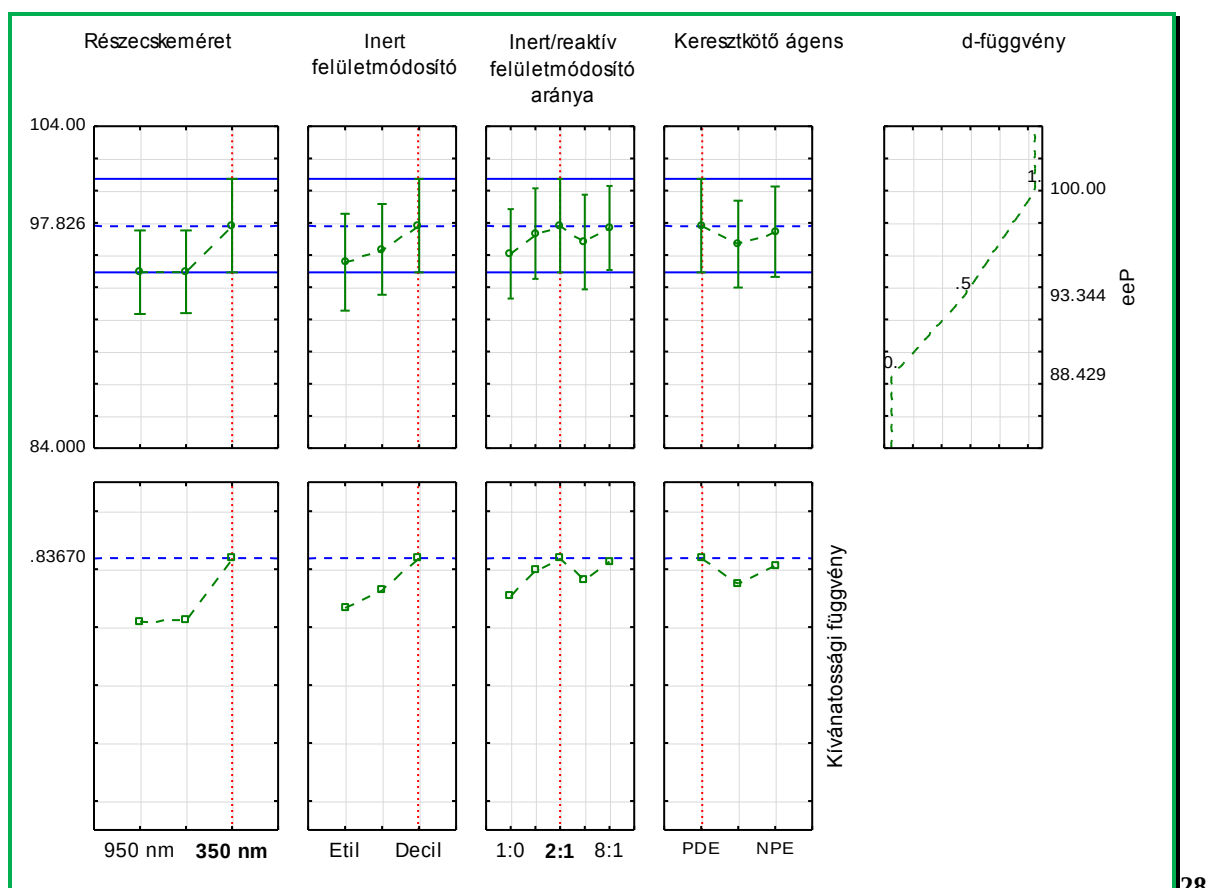
belsejében, ami jóval könnyebb anyagáramlást tesz lehetővé a katalitikus reakció során. Ennek a könnyített diffúciónak a hatása lényegesen jobban érvényesül, mint a részecskék felületének sajátságai, vagy a keresztköti ágens típusa.

Az enantiomertisztaságok esetében elmondható, hogy az *N*-Boc-Phe-S-Et-rel végzett amidálási reakciónál a legjobb értékekre a nanorészecskék mérete volt szignifikáns hatással (10. táblázat).

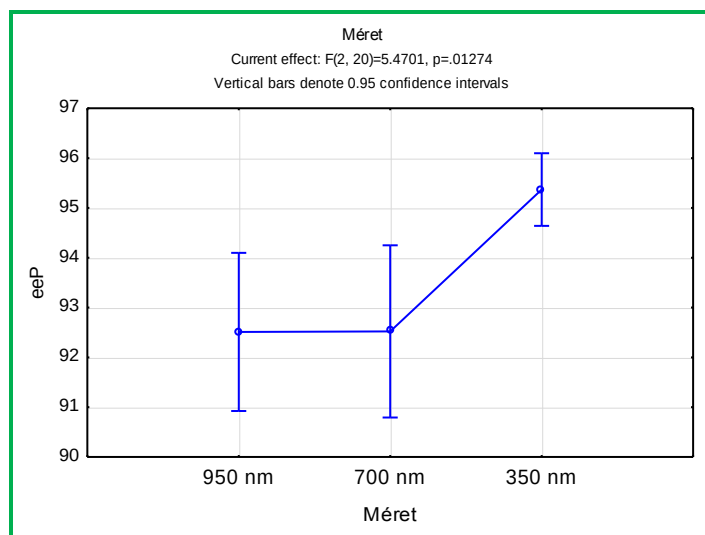
10. táblázat: Szignifikáns hatások az *ee_P* értékekre

Hatás	Szignifikancia egyváltozós vizsgálata <i>ee_P</i> értékekre				
	Std. hiba becslés/ 2,07887				
	SS	Szabadsági fokok száma	MS	F	p
Tengelymetszet	261859,1	1	261859,1	60591,56	0,000000
Méret	47,3	2	23,6	5,47	0,012737
Felület	25,0	2	12,5	2,89	0,078760
Arány	12,0	4	3,0	0,69	0,606176
Keresztköti	7,0	2	3,5	0,81	0,460608
Hiba	86,4	20	4,3		

A grafikus ábrán is látható, hogy a méret kivételével a többi faktor hatása nem szignifikáns, a különböző faktorok estén a különböző szintekhez tartozó átlagok ingadozása közel esik egymáshoz. Az értékek szórása nagyjából lefedi egymást, ebből látszik, hogy ezek a faktorok nem befolyásolják számottevően az enantiomertisztaságot.



Mivel a méretnek itt jelentős hatása van, ezért külön ábrázoltam a különböző méretekhez tartozó átlagokat, valamint az értékek szórását (29. ábra). Itt jobban megfigyelhető, hogy a legkisebb mérethez tartoznak a legjobb enantiomertisztaság értékek, és itt a legkisebb a szórás is. Ennek oka lehet az, hogy a kisebb méret olyan geometriai lehetőséget teremthet, amelyben a szilika nanorészecskék kisebb görbülete miatt, a funkciós csoportok és a keresztkötők jobban érvényesülhetnek, ezáltal stabilabbá válik az enzim aktív konformációja.

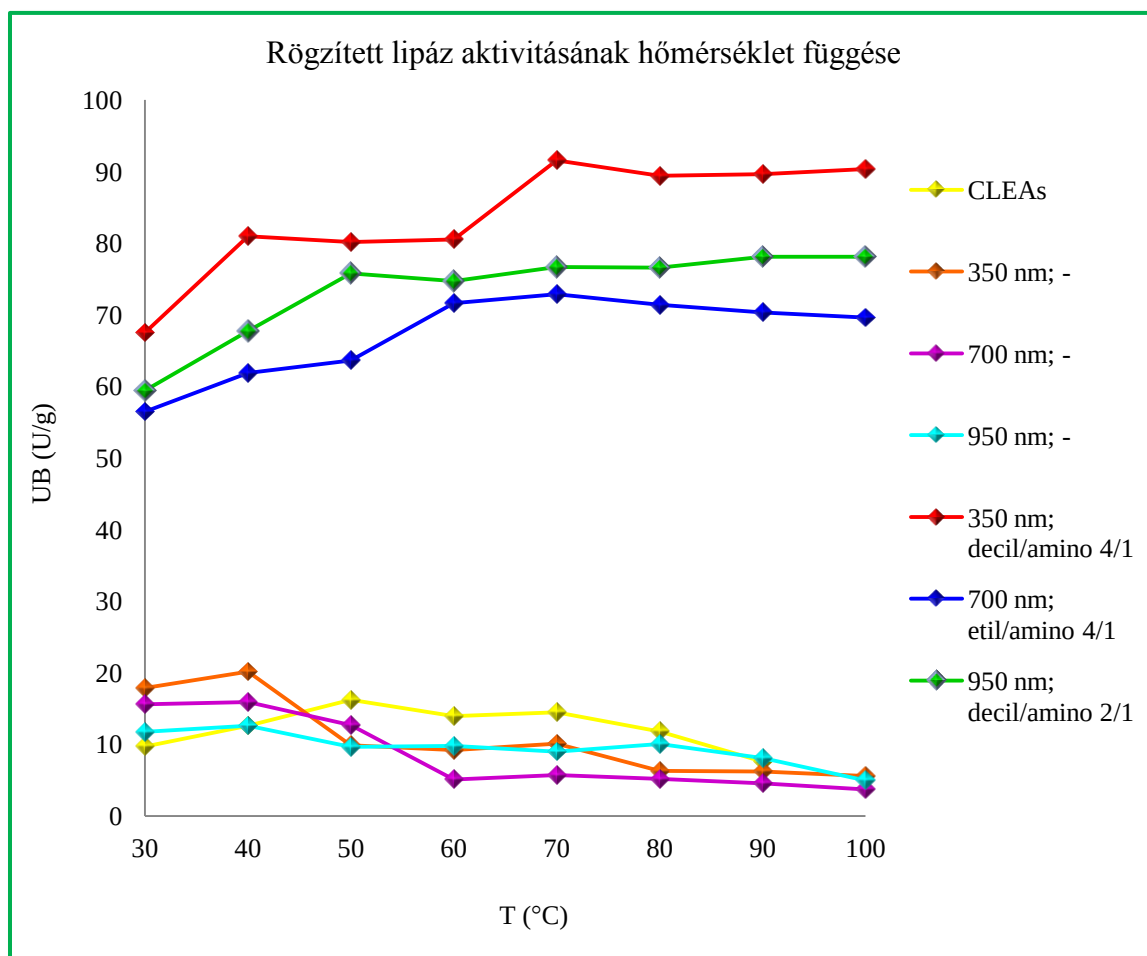


29. ábra: A nanorészecskék méretének hatása az enantiomertisztaságra alkaláz enzim esetén

4.5. Rögzített lipáz enzimkészítmények működésének hőfokfüggése

A hőmérsékletnek nagy hatása lehet a 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. Régóta tudjuk, hogy Arrhenius szerint a reakciósebesség nő a hőmérséklet emelésével. Sok esetben igen hasznos lehetne, ha például az enzimkatalizált folyamatokat nem csak fiziológiás vagy standard körülmények között végezhetnénk el, mivel a magasabb hőmérséklet alkalmazása gyorsítaná a folyamatot, amely sok előnyhöz vezethet. Éppen ezért nemcsak érdekes, hanem hasznos is lehet megismerni a különbözőképpen rögzített enzimek működésének hőmérsékleti optimumát.

Az általam rögzített lipázok közül három típusból választottam ki a legjobban működő készítményeket. Az első típus a hagyományos CLEAs készítmény, a második típus a három legjobb felületmódosítatlan szilika nanorészecskét tartalmazó készítmény, a harmadik típus pedig három legjobb már, funkciós csoportokkal rendelkező szilika nanorészecskés NHM készítmény. Így összesen hét rögzített lipáz működésének hőfokfüggését vizsgáltam. A reakciókat teljesen azonos körülmények között, egy tizedesjegy pontossággal szabályozható rázótermosztátban végeztem el 10 °C –os lépésközökkel. A végrehajtott tesztreakció ezúttal is a racém 1-feniletanol acilezése volt magasabb forráspontú oldószerben (toluol). A reakcióelegyekből 1 óra elteltével vettem mintát és a 3.9 fejezetben leírtaknak megfelelően GC segítségével vizsgáltam.

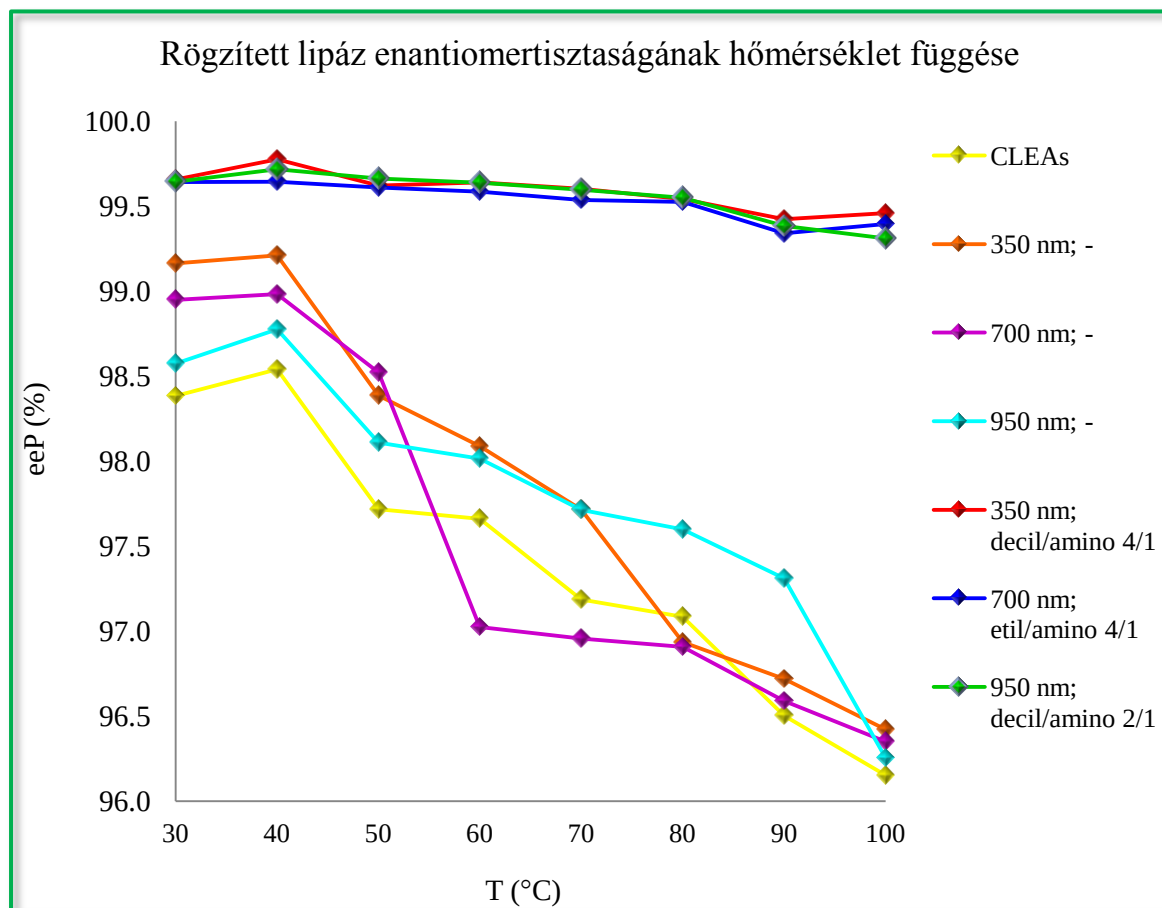


30. ábra: Rögzített lipázok U_B értékeinek változása a hőmérséklet függvényében

A kapott eredményekből látható, hogy a kezdeti biokatalizátor aktivitás értékek közül a saját készítmények messze kiemelkednek, aktivitásuk több, mint háromszorosa a legjobbnak bizonyult felületmódosítás nélküli készítményének, és ötször aktívabbak az egyszerű CLEAs-tól (30. ábra). Ez azzal magyarázható, hogy egyrészt a felületmódosításnak köszönhetően a kialakult amino csoportok segítségével több enzim tud kapcsolódni a keresztkötő segítségével a részecskéhez, mint a felületmódosítás nélküli részecskéhez. Másrészt pedig a sima CLEAs-hoz képest kisebb a diffúziós gát a szubsztrát molekulák számára, mivel a bevitt inert csoportok, valamint a különböző hosszúságú keresztkötők egy hálózatos, jobban átjárható rendszert alkotnak. Ezzel szemben CLEAs esetén az enzimek szorosan egymás mellett, aggregátumként vannak jelen. A legkisebb méretű részecskére rögzített készítmény bizonyult a legjobbnak, hőmérsékleti optima a 70°C irányába tolódott el. A másik két NHM rendszernél telítési görbeként jelenik meg a hőmérséklet profil. A görbénél megfigyelhető, hogy CLEAs esetén 50°C-on egy optimum látható, a hőmérséklet növelésével azonban

csökken a készítmény aktivitása. A felületmódosítás nélküli részecskéknél ez az optimum nem figyelhető meg, 40°C után csökken a működésük.

Az aktivitás mellett a másik fontos jellemzője az enzimkatalizált reakcióknak az enzim enantiomertisztasága. A következő ábrán látható, hogy ez az érték hogyan változik az egyre nagyobb hőstressz hatására.



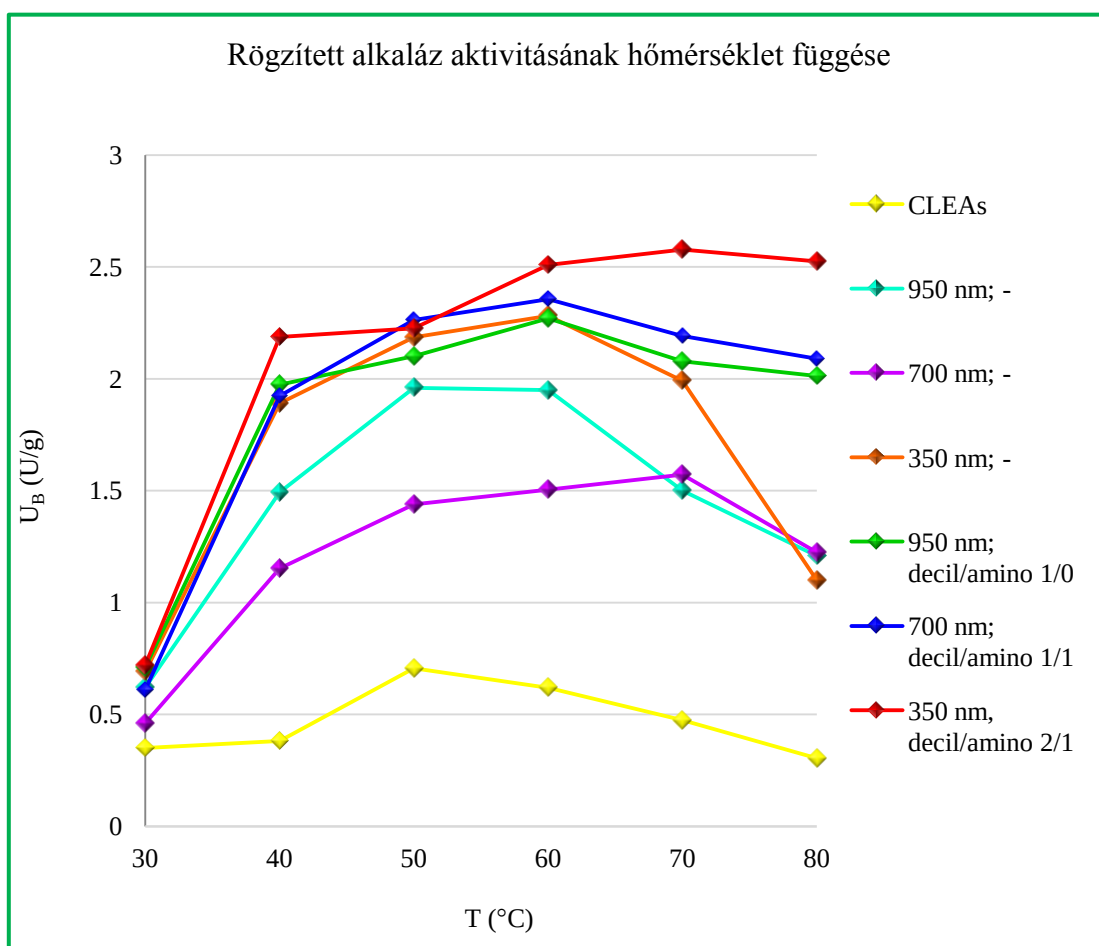
31. ábra: Rögzített lipázok ee_p értékeinek változása a hőmérséklet függvényében

A 31. ábra alapján elmondható, hogy az új típusú NHM rendszerek képesek a rajtuk immobilizált enzim szelektivitását a legnagyobb mértékben konzerválni. Enantimerszelektivitás értékük szinte alig változik, és még 100°C-os hőmérsékleten is 99% fölött marad. Ehhez képest a hagyományos CLEAs és a felületmódosítás nélküli készítmények 40°C-on jobb enantiomertisztaság értékeket mutatnak a kezdetihez képest, magasabb hőmérséklet hatására azonban már csökken az enzimműködésük.

4.6. Alkaláz enzimkészítmények működésének hőfokfüggése szerves közegben

Az előző alfejezetben leírtakhoz hasonlóan a rögzített alkaláz enzim működésének hőmérséklet-függését is megvizsgáltam. A vizsgálatok során az enzimkatalizált amidálási reakció a 3.7. fejezetben leírtak alapján ment végbe, a tesztreakciókat tizedesjegy pontosan szabályozott termosztálható rázógépen, tíz fokos lépésközzel végeztem el. A reakcióból a mintavételezés 12 óra elteltével történt. Mivel a *terc*-butanol nem lehetett magasabb forráspontú oldószerrel kiváltani, ezért a hőfokfüggés felső határát a *terc*-butanol forráspontja (83°C) szabta meg, így ezeket a teszteket 80°C-ig végeztem el.

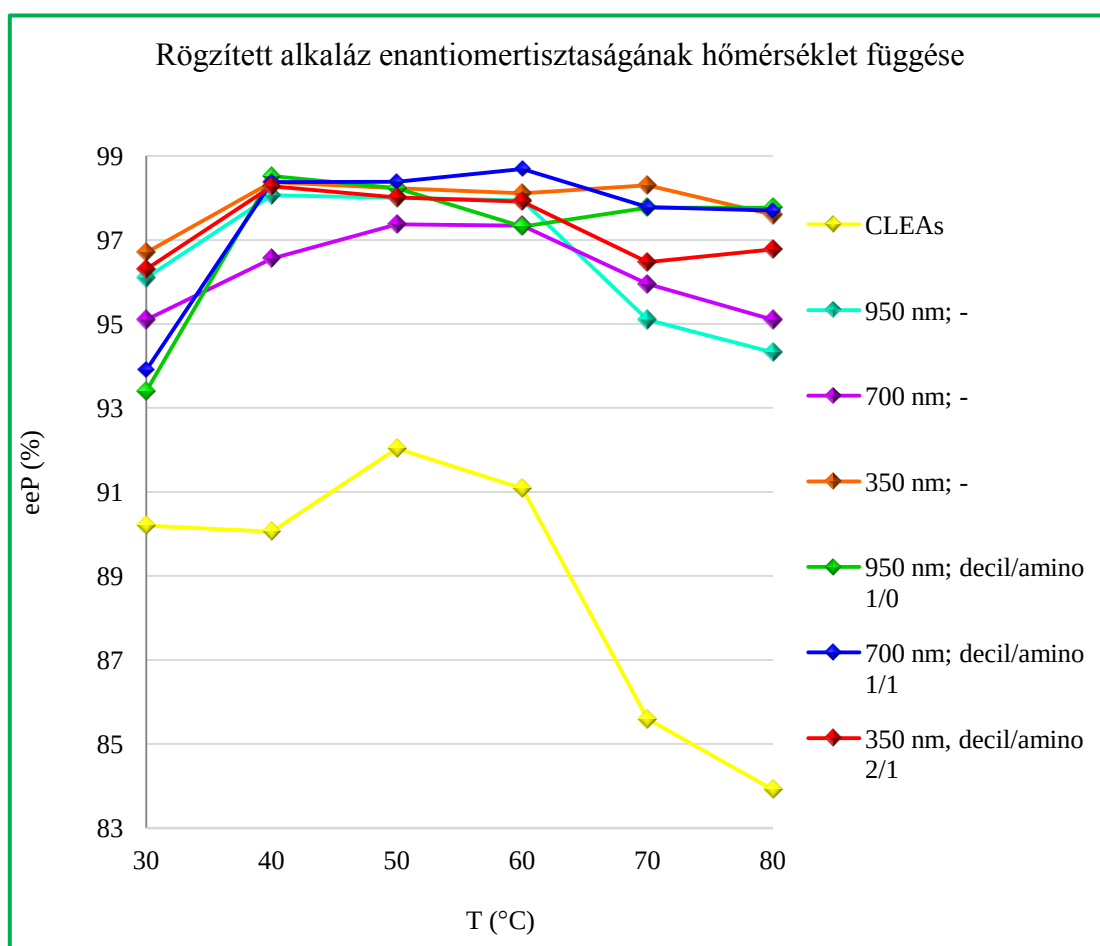
A tesztek során a lipáz esetében bemutatott elv alapján választottam ki a rögzített enzimkészítményeket.



32. ábra: Alkalázok biokatalizátor aktivitásának változása a hőmérséklet függvényében

Az enzim katalizátorok kezdeti aktivitás értékeiből látható, hogy az alkaláz készítmények közül CLEAs rendelkeznek a legkisebb kezdeti aktivitás értékkel (32. ábra). A szilika nanorészecske jelenlétében létrehozott mátrix szerkezetek már közel kétszeres aktivitással

bírnak, a legmagasabb kezdeti értékek viszont a saját funkcionizált nanorészecskék esetén figyelhetőek meg. A görbeseregéből az is látszik, hogy a hagyományos alkaláz CLEAs maximumos görbe, melynek tetőpontja 50°C -nál található. Nem ennyire szembetűnően, de hasonlóan konkáv a felületi csoportokat nem tartalmazó szilika nanorészecskés minták lefutása is (narancs, lila, türkiz görbék). Ettől eltérő jellegű, inkább telítésbe futóak a funkciós csoportokat is tartalmazó NHM rendszerek (piros, zöld, kék) ee_p görbéi, amelyeknél megfigyelhető, hogy a biokatalitikus aktivitás 40-50°C-ig nő, majd 80°C-ig stabil marad. Ezeknek a tendenciáknak az oka feltehetően az, hogy a funkciós csoportokat nem tartalmazó rendszerek, bár kezdetben nagyobb aktivitással rendelkeznek, nem képesek az enzimet magasabb hőmérsékleteken stabilizálni a szilárd részecskék kötőhelyeinek hiányában. Ezt bizonyítja a funkciós csoportot tartalmazó rendszerek stabil viselkedése. Itt ugyanis a nanorészecskék felületén lévő amino és decil csoportok képesek lehorgonyozni és stabilizálni az enzim molekulát.



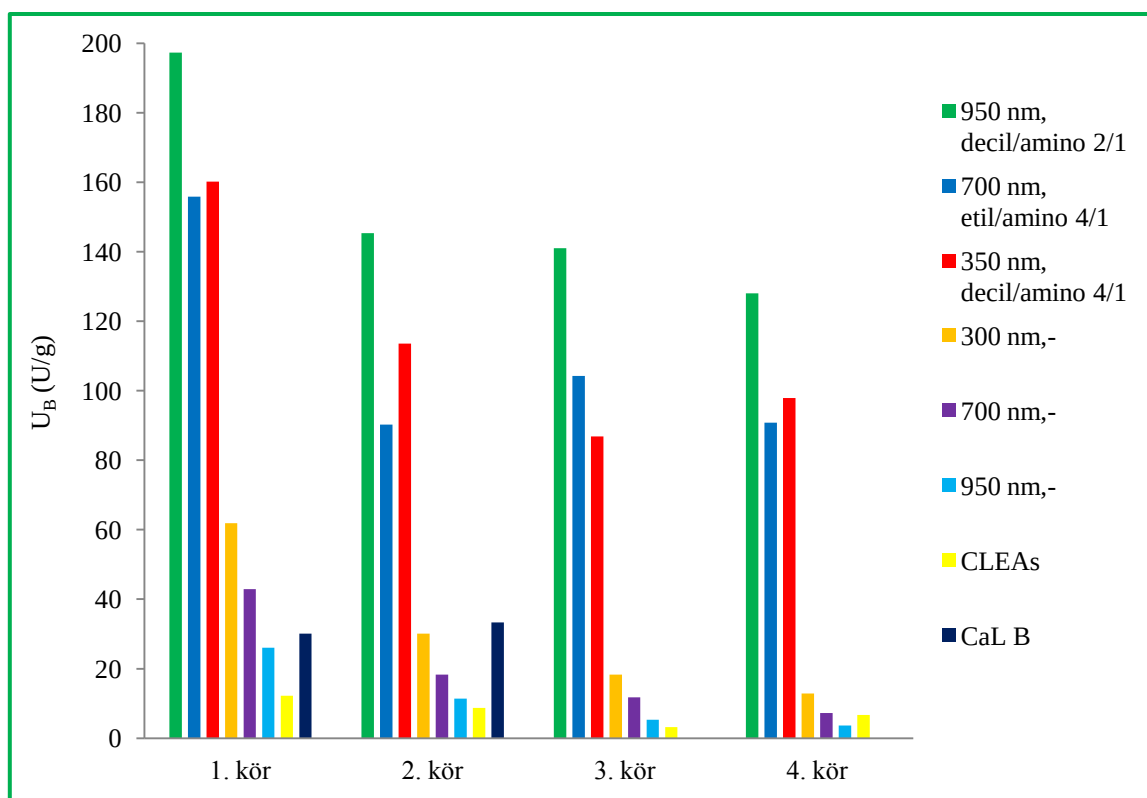
33. ábra: Rögzített alkalázok ee_p értékeinek változása a hőmérséklet függvényében

A 33. ábrán feltüntetett enantiomertisztaság értékek alakulása hasonló okokra vezethető vissza, mint a biokatalizátor aktivitás elemzése során látottaknál. Érdekes kiemelni azonban, hogy míg a lipáz esetében az enantiomertisztaságok szinte mindvégig magas értékeken voltak, addig az alkaláz esetében a hőmérséklet növelése kifejezetten kedvez az enzim szelektivitásának.

4.7. Biokatalizátorok visszaforgathatóságának vizsgálata

Az enzimrögzítés egyik legfőbb célja az értékes enzim reakcióelegyből történő visszanyerhetőségének biztosítása, amely az enzimek oldott állapotban történő felhasználásánál jóval gazdaságosabb eljárásokat tesz lehetővé. Nagyon fontos szempontok a visszanyerhető biokatalizátor mennyisége, valamint az enzim aktivitásnak és szelektitásnak változása az egyes ciklusok után, melyeket az enzim sajátságai mellett a rögzítés módja is nagymértékben befolyásolhat.

A hőstabilitási kísérletek során bemutatott, különbözőképpen rögzített lipáz enzimeket a racém 1-feniletanol 3.6. pontban leírt kinetikus reszolválásában vizsgáltam. A reakciókat azonos körülmények mellett végeztem el, a biokatalitikus paraméterek megállapításához szükséges mintákat 1 óra elteltével vettem le. Ezt követően az enzimkészítményeket eltávolítottam a reakcióelegyből, majd az oldószerrel többször átmostam, végül tömegállandóságig szárítottam. Ezután az adott biokatalizátorokat ismét tesztreakciónak vettem alá.

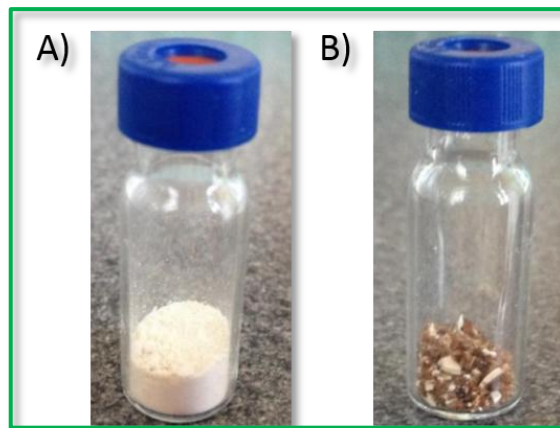


34. ábra: Rögzített lipáz biokatalizátorok visszaforgatósága

A rögzített lipáz enzimműködés reakcióelegyből történő visszanyerése során a szabad, rögzítetlen liofilizált enzim por (CaL B jelöléssel) már a második felhasználás után visszanyerhetetlennek bizonyult. A hagyományos CLEAs készítmények visszanyerhetősége is komoly tömegvesztést okozott, valamint a tömbbé összeállt, összecsomósodott CLEA a 2. kör után már átmoshatatlan volt. Az NHM készítmények jóval könnyebben visszanyerhetőek voltak, és még a negyedik kör után is magasabb aktivitás értéket mutattak, mint a referencia társaik (34. ábra).

4.8. Az NHM enzimműködés morfológiai vizsgálata

A korábbi fejezetben bemutatott aktivitás, hőstabilitás és visszaforgathatósági tesztek alapján látható, hogy jelentős különbség van a hagyományos, kereskedelmi forgalomban is kapható rögzített enzimforma, vagyis a CLEAs és az általam létrehozott NHM enzimrögzítési módszer között. Ezért ezek szerkezetét, morfológiáját összehasonlítottam digitális fényképezőgéppel és SEM készülékkel készített felvételek alapján (35. és 36. ábra).

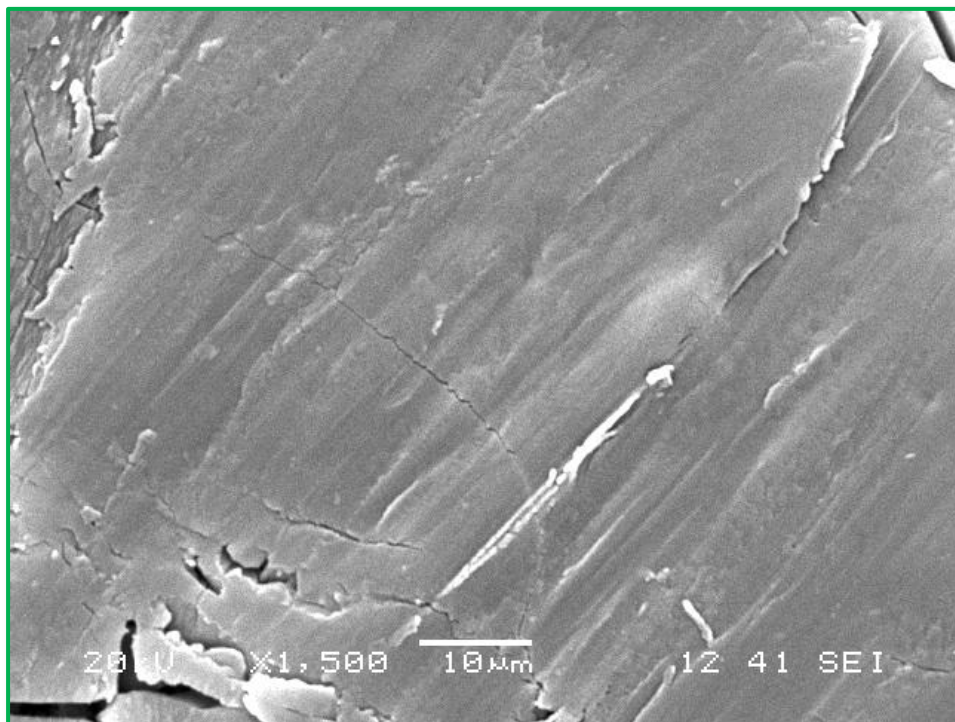


35. ábra: Felvétel az alkaláz enzim NHM módszerrel A) és hagyományos CLEA módszerrel B) készült készítményeiről

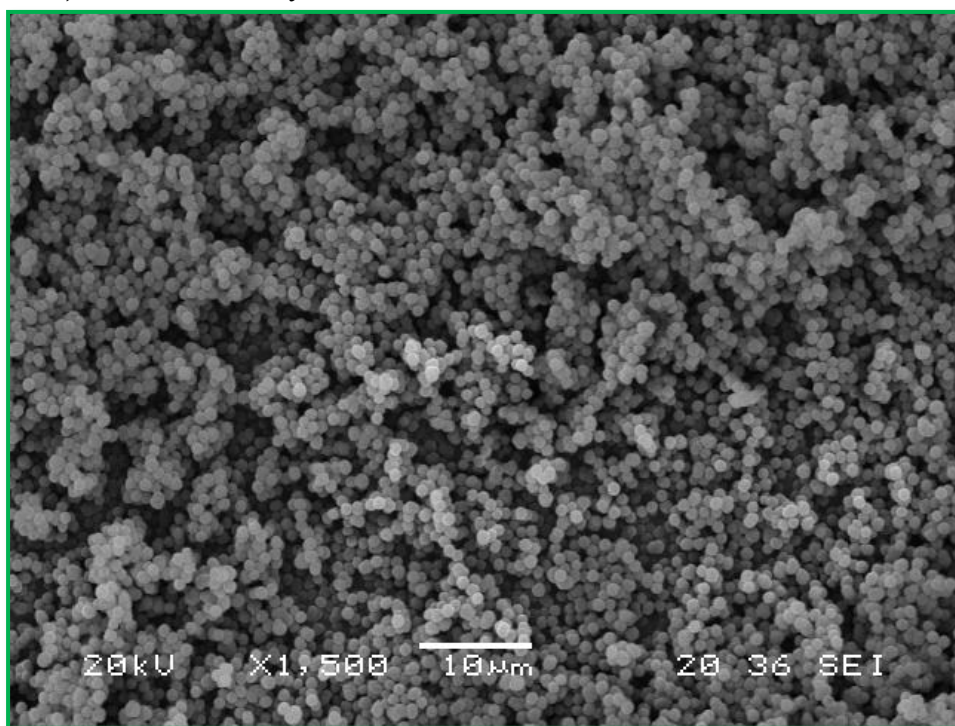
Már szabad szemmel is jól kivehető, hogy míg a NHM készítmények finom szemcsés szilárd, egységes megjelenésű porszerű preparátumok, addig a CLEAs minták nagyon heterogén, lemezes, rögös, nehezen kezelhető készítmények (35. ábra).

A két módszerrel készült mintát elektronmikroszkóppal is megvizsgáltam. A felvételeken látható, hogy a hagyományos CLEAs egy zártabb, jellegzetes struktúra nélküli, tömörszerű készítmény (36. ábra). Az NHM változat azonban hűen őrzi az alkalmazott nanorészecskék morfológiáját, szerkezetét. Mind a makroszkópikus, mind a mikroszkópos felvételek alátámasztják, hogy a nanorészecskékkel kombinált CLEAs lényegesen egységesebb homogénebb és kezelhetőbb enzimrögzítési formát eredményez, szemben a hagyományos CLEAs készítményekkel.

A) hagyományos CLEAs készítmény



B) NHM készítmény



36. ábra: SEM felvételek a hagyományos A) és NHM B) készítményekről

5. Összefoglalás

Munkám során egy új, az irodalomban még nem ismert enzimrögzítési módszert hoztam létre, amely két enzimrögzítési technika kombinálásával képes ötvözni azok előnyös tulajdonságait. Az egyik rögzítési eljárás az egyszerű, univerzális CLEAs módszer, amely során kovalens keresztkötések létrehozásával szilárd hordozó nélkül alakítjuk ki a rögzített enzimkészítményt. A másik módszer pedig a szilika nanorészecskékhez történő enzimrögzítés. A kombinált módszerrel ún. NHM rendszereket állítottam elő, amelyek hatékonyságát lipáz és alkaláz enzim rögzítésén vizsgáltam. A kísérletek során sikeresen alakítottam ki amino csoportokat, amelyeken keresztül bifunkciós epoxi vegyületekkel kovalens keresztkötések hozhatóak létre. Részletesen vizsgáltam a szilika nanorészecskék felületén kialakított reaktív kötőhelyek és inert csoportok hatását az enzimrögzítés hatékonyságára. A kovalens keresztkötések létrehozására három különböző bifunkciós epoxi vegyületet vizsgáltam. Az előállított enzimkészítményeket a racém 1-feniletanol és a racém *N*-Boc-Phe-S-Et benzilaminnal történő kinetikus resolválásában teszteltem, a reakciókat pedig királis oszlopon GC-vel (lipáz) és királis állófázisú HPLC-vel (alkaláz) követtem. A kapott eredményekből elmondható, hogy sikerült egy új rögzítési módszert létrehoznom, amellyel aktívabb biokatalizátorokat és lényegesen jobb enantiomertisztaságot értem el, mint a hagyományos CLEAs technikával. Az új típusú NHM enzimkészítmények morfológiáját is vizsgáltam, amely alapján elmondható, hogy a szilika nanorészecskék alkalmazása jelentős javulást eredményezett az enzimkészítmény homogenitásában, szerkezetében és mechanikai sajátságaiban. A nanorészecskék alkalmazásával egy sokkal hálózatosabb, átjárhatóbb rendszert sikerült létrehozni, mely befolyásolja a biokatalitikus folyamatok lejátszódását. Az új rendszer mérete viszont már bőven a mikronos nagyságrend fölött van, ezáltal ezzel a kombinált technikával lehetőség nyílik folyamatos átfolyós bioreaktorokban történő alkalmazásokra.

6. Irodalomjegyzék

- [1] K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry*, (6th ed.) **2011**, Springer, Berlin.
- [2] J. D. Rozzell, *Bioorg Med Chem*, **1999**, 7 2253-61.
- [3] A. Schmid, J. S. Dordic, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubblots, B. Witholt, *Nature*, **2001**, 409, 258-68.
- [4] M. Alcalde, M. Ferrerm, F. J. Plou, A. Ballesteros, *Trends in Biotechn*, **2006**, 24, 281-7.
- [5] S. Park, R. J. Kazlauskas, *Cur O pin Biotechn*, **2003**, 14, 432-437.
- [6] N. Ran, L. Zhao, Z. Chen, J. Tao, *Green Chem*, **2008**, 10, 361-72.
- [7] M. Biselli, U. Kragl, C. Wandrey *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Vol. 1 Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, 194–258.
- [8] M. Vellard, *Curr O pin Biotech*, **2003**, 14, 444-50.
- [9] K. M. Koeller, C. H. Wong, *Nature*, **2001**, 409, 232-40.
- [10] F. Jia, B. Narasimhan, S. Mallapragada, *Biotechnol. Bioeng*, **2013**, 9999, 1.
- [11] R. A. Sheldon, *Appl Microbiol Biotechnol*, **2011**, 92:467-477.
- [12] J. M. Guisan, *Immobilization of Enzymes and Cells, Methods in Biotechnology*, Humana Press, 2nd-ed, **2006**.
- [13] P. Torres-Salsas, A. Monte-Martinez, B. Cutino-Avila, B. Rodriguez-Colinas, M. Alcalde, A. O. Ballesteros, F. J. Plou, *Adv Mat*, **2011**, 23, 5275-82.
- [14] R. A. Sheldon, *Adv Synth and Catal*, **2007**, 349, 1289-307.
- [15] A. Sassolas, L. J. Blum, B. D. Leca-Bouvier, *Biotechn Adv*, **2012**, 30, 489-511.
- [16] R. A. Sheldon, *Org.Process Res. Dev.* **2011**, 15, 213– 223.
- [17] Z. P. Han, J. Fu, P. Ye, X. P. Dong, *Enzyme and Microbial Technology*, **2013**, 53, 79.
- [18] J. D. Byrne, J. A. Baugh, *McGill Journal of Medicine*, **2008**, 11, 1, 43–50.
- [19] Sarkadi, L., *Biokémia mérnöki szemmel*, **2007**, Typotex Kiadó.
- [20] Sevela, B., *Biomérnöki műveletek és folyamatok*, **2011**, Typotex Kiadó.
- [21] <http://www.matud.iif.hu/2013/02/05.htm>, 2014. augusztus 30. 14:45.
- [22] J. L. L. Rakels, A. J. J. Straathof, J. J. Heijnen, *Enzyme and Microbial Technology*, **1993**, 15, 12, 1051-1056.
- [23] U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, *Chem Soc Rev*, **2009**, 38, 453-68.

- [24] L. Poppe, L. Novák, *Selective Biocatalysis: A Syntetic Approach*, **1992**, VCH: Weinheim-New York.
- [25] D. Weiser, Z. Boros, G. Hornyánszky, A. Tóth, L. Poppe, *Process Biochemistry*, **2012**, 47, 428-434.
- [26] L. E. Rodgers, R. B. Knott, P. J. Holden, K. J. Pike, J. V. Hanna, L. J. R. Foster, *Physica B*, **2006**, 386, 508–510.
- [27] U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, *Chem Soc Rev*, **2009**, 38, 453–468.
- [28] H. Nouredдини, X. J. Gao, *Sol–Gel Sci Technol*, **2007**, 41, 31–41.
- [29] D. Brady, J. Jordaan, *Biotechnol Lett*, **2009**, 31, 1639-50.
- [30] R. DiCosimo, J. McAuliffe, A. J. Poulouse, G. Bohlmann. *Chem. Soc. Rev*, **2013**, 42, 6437-74.
- [31] R. Schoevart, M. W. Wolbers, M. Golubovic, M. Ottens, A. P. G. Kieboom, F. Rantwijk, L. A. M. Wielen, R. A. Sheldon, *Biotechn and Bioeng*, **2004**, 87, 754-62.
- [32] S Avrameas, *Immonochemistry*, **1969**, 6, 49-52.
- [33] W Tischer, V Kasche, *Trend sin Biotechn*, **1999**, 17, 326-35.
- [34] R. A. Sheldon, *Pure Appl. Chem*, **2000**, 72, 1233–46.
- [35] R. R. Burgess, *Protein precipitation techniques. Methods Enzymol*, **2009**, 463:331-332.
- [36] R. A. Sheldon, *Appl Microbiol Biotechnol*, **2011**, 92:467-477.
- [37] D. Weiser, A. Varga, K. Kovács, F. Nagy, A. Szilágyi, B. G. Vértessy, Cs. Paizs, L. Poppe, *ChemCatChem*, **2014**, 6, 5, 1463–1469.
- [38] D. R. Walt, V. I. Agayn, *TrAC Trends Anal. Chem*, **1994**, 13, 425 –430.
- [39] I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, K. C. Waldron, *BioTechniques*, **2004**, 37, 790– 804.
- [40] L. Q. Cao, F. Rantwijk, R. A. Sheldon, *Org. Lett*, **2000**, 2, 1361 –1364.
- [41] R. Schoevaart, M. W. Wolbers, M. Golubovic, M. Ottens, A. P. G. Kieboom, F. Rantwijk, L. A. M. van der Wielen, R. A. Sheldon, *Biotechnol.Bioeng*, **2004**, 87, 754– 762.
- [42] R. A. Sheldon, *Org.Process Res. Dev*, **2011**, 15, 213– 223.
- [43] S. Shah, M. N. Gupta, *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **2007**, 17, 921 –924.
- [44] B. L. A. Prabhavathi Devi, Z. Guo, X. B. Xu, *J. Am.Oil Chem. Soc*, **2009**, 86, 637– 642.

- [45] J. D. Cui, S. Zhang, L. M. Sun, *Appl. Biochem. Biotechnol*, **2012**, 167, 835 –844.
- [46] S. A. Ansari, Q. Husain, *Biotechn Adv*, **2012**, 30, 512-23.
- [47] P. Wang, *Curr Opin Biotechn*, **2006**, 17, 574-9.
- [48] M. L. Verma, C. J. Barrow, M. Puri, *Apl Microbiol Biotechnol*, **2013**, 97, 23-39.
- [49] K. K. Jain, *Clinica Chimica Acta*, **2005**, 358, 37-54.
- [50] J. Shi, J.C. Claussen, E.S. McLamore, A. Haque, D. Jaroch, A.R. Diggs, P. Calvo-Marzal, J.L. Rickus, D.M. Porterfield, *Nanotechnology*, **2011**, 22, 355-65.
- [51] G.K. Kouassi, J. Irudayaraj, G. McCarty, *J Nanobiotechnol*, **2005**, 3, pp. 1–9.
- [52] A.K. Johnson, A.M. Zawadzka, L. A. Deobald, R. L. Crawford, A. J. Paszczynski, *J Nanopart Res*, **2008**, 10, 1009–1025.
- [53] N. A. Kalkan, E. A. Aksoy, S. Aksoy, N. Hasirci Chitosan, *Nanotr. Conf*, **2009**.
- [54] R. Konwarh, N. Karak, S. K. Rai, A. K. Mukherjee, *Nanotechnology*, **2009**, 3; 20(22):225107.
- [55] M. Namdeo, S. K. Bajpai, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2009**, 59, 1-3, 134-139.
- [56] S. A. Ansari, Q. Husain, *Food Chem Toxicol*, **2011**, 49, 2107–2115.
- [57] S. H. Huang, M. H. Liao, D. H. Chen, *Biotechnol Prog*, **2003**, 19, 1095–1100 .
- [58] J. R. Heath, *Acc of Chem Res*, **1999**, 32, 388-42.
- [59] M. Shimomura, T. Sawadaishi, *Curr Opin Coll and Inter Sci*, **2001**, 6, 11-16.
- [60] B. K. Teo, X. H. Sun, *J of Clust Sci*, **2006**, 17, 529-32.
- [61] Y. Yu, W. Chen, *Mat. Chem. Phys.* **2003**, 82, 388.
- [62] W. Stöber, A. Fink, E. J. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, 26, 62.
- [63] S. Spange, *Prog. Polym. Sci.* **2000**, 25, 781.
- [64] H. Zou, S. Wu, J. Shen, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 3893–3957.
- [65] G. M. Yousef, A. D. Kopolovic, M. B. Elliott, E. P. Diamandis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2003**, 305, 28.
- [66] R. Bott, M. Ultsch, A. Kossiakoff, T. Graycar, B. Katz, S. Power, *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 16, 7895–906.
- [67] D. K. Apar, B. Özbek, *Food and Bioproducts Processing*, **2011**, 89, 500.
- [68] C. B. Ahn, Y. J. Jeon, Y. T. Kim, J. Y. Je, *Process Biochemistry*, **2012**, 47, 2240.
- [69] A. Houde., A. Kademi, D. Leblanc., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2004**, 118, 155-170.

- [70] www.jegyzet.hu/notes.aspx?download=1&id=1730
- [71] R. W. Teng, D. McManus, J. Aylward, S. Ogbourne, J. Johns, P. Parsons, A. Bacic, *Fitoterapia*, **2009**, 80, 233–236.
- [72] N. Miletic, R. Rohandi, Z. Vukovic, A. Nastasovic, K. Loos, *React. Funct. Polymers*, **2009**, 69, 68–75.
- [73] S. Tabatabaei, A. Shukohfar, R. Aghababazadeh, A. Mirhabibi, *Journal of Physics*, **2006**, 26, 371–374.
- [74] H. T. Lu, *Colloid Journal*, **2013**, 75, 3, 311–318.
- [75] Kemény-Deák-Komka-Vágó *Hogyan használjuk a Statistica programot?* Perfact Kiadó, Budapest **2011**.