



## **Hisztidinjelölt enzimek szelektív rögzítési lehetőségeinek vizsgálata és optimalizálása**

**Zrinyi Anna**

*Vegyésmérnöki MSc, I. évfolyam – Analitikai és szerkezetvizsgálati szakirány*

37. OTDK Biológia Szekció

Témavezető: Dr. Bell Evelin, egyetemi adjunktus  
Konzulens: Alács Bálint, PhD hallgató

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem  
Szerves Kémia és Technológia Tanszék

2024



## Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni a témavezetőmnek, Dr. Bell Evelinnek és a konzulensemnek, Alács Bálintnak a rengeteg segítséget és támogatást, melyet olykor szavak, olykor étel formájában kaptam, valamint hogy a közös munka mindig jókedvűen telt.

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

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

# Tartalom

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Rövidítések jegyzéke.....                                                                                                    | 4  |
| 1. Bevezető.....                                                                                                             | 6  |
| 2. Célkitűzés.....                                                                                                           | 7  |
| 3. Irodalmi áttekintés .....                                                                                                 | 8  |
| 3.1. Enzimekről általánosan.....                                                                                             | 8  |
| 3.2. Enzimek rögzítése.....                                                                                                  | 10 |
| 3.2.1. Szelektív enzimrögzítés fémionaffinitás-komplexben .....                                                              | 13 |
| 3.2.2. Szelektív kovalens enzimrögzítés epoxicsoportokat és komplexált fémionokat tartalmazó kevertfelületű hordozókon ..... | 14 |
| 3.3. A felhasznált enzim, a PcPAL bemutatása.....                                                                            | 16 |
| 3.3.1. Rekombináns fenilalanin ammónia-liáz.....                                                                             | 17 |
| 3.3.2. PcPAL felhasználási lehetőségei.....                                                                                  | 18 |
| 4. Előzmények.....                                                                                                           | 20 |
| 5. Módszerek.....                                                                                                            | 22 |
| 5.1. Felhasznált anyagok .....                                                                                               | 22 |
| 5.2. Alkalmazott eszközök.....                                                                                               | 22 |
| 5.3. ChiralVision T2-150 hordozó felületmódosítása .....                                                                     | 22 |
| 5.3.1. Epoxigyűrű felnyitása különböző bisz- és monoamin párosokkal.....                                                     | 22 |
| 5.3.2. Epoxigyűrű felnyitása különböző biszaminokkal .....                                                                   | 23 |
| 5.3.3. A polimer funkcionálizálása EDTA-dianhidriddel .....                                                                  | 24 |
| 5.3.4. Fémion komplexálása a polimer hordozók felületén .....                                                                | 25 |
| 5.3.5. Enzimrögzítés és tesztreakció .....                                                                                   | 25 |
| 5.3.6. Natív enzimaktivitások vizsgálata.....                                                                                | 26 |
| 5.4. Alkalmazott vizsgálati módszerek.....                                                                                   | 26 |
| 5.5. Alkalmazott oldatok, pufferek összetétele.....                                                                          | 27 |
| 6. Eredmények és értékelésük.....                                                                                            | 29 |
| 6.1. Bisz- és monoaminok hatásának vizsgálata.....                                                                           | 30 |
| 6.2. Két további biszaminnal történő vizsgálatok.....                                                                        | 33 |
| 7. Összefoglalás .....                                                                                                       | 36 |
| Irodalmi hivatkozások .....                                                                                                  | 38 |

## Rövidítések jegyzéke

*Az OTDK dolgozatomban előforduló rövidítések*

|            |                                                                                              |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| AEO (A)    | 1,8-diamino-3,6-dioxaoktán                                                                   |
| cDNS       | ciklikus DNS                                                                                 |
| $c_t$      | adott időpontban mért szubsztrát koncentráció $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}}\right]$ |
| $c_{t_0}$  | kiindulási szubsztrát koncentráció $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}}\right]$            |
| CHB (C)    | 1,3-ciklohexánbisz(metilamin)                                                                |
| CLEAs      | keresztkötött enzimaggregátumok (cross-linked enzyme aggregates)                             |
| $\Delta t$ | eltelt idő [perc]                                                                            |
| DETA (D)   | dietiléntriamin                                                                              |
| DMF        | dimetil-formamid                                                                             |
| DNS        | dexoxiribonukleinsav                                                                         |
| EC         | Enzim Bizottság (Enzyme Comission)                                                           |
| EDA (E)    | etilén-diamin                                                                                |
| EDTA       | etilén-diamin-tetraecetsav                                                                   |
| GST        | glutation-i-transzferázt                                                                     |
| HEPES      | 2-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]etánszulfonsav                                            |
| HIV        | humán immundeficiencia-vírus                                                                 |
| HDA (H)    | hexán-1,6-diamin                                                                             |
| HS         | nagy koncentrációjú sóoldat (high salt)                                                      |
| IDA        | iminodiecetsav                                                                               |
| IMAC       | rögzített fémionaffinitás-kromatográfia (immobilized metal affinity chromatography)          |
| LS         | alacsony koncentrációjú sóoldat (low salt)                                                   |
| $m_B$      | biokatalizátor tömege [g]                                                                    |
| MBP        | maltóz-kötő fehérje                                                                          |
| PAH        | fenilalanin hidroxiláz                                                                       |
| PAL        | fenilalanin ammónia-liáz                                                                     |
| PcPAL      | <i>Petroselinum crispum</i> fenilalanin ammónia-liáz                                         |
| PKU        | fenilketonuria                                                                               |

|                    |                                                                                                    |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PMMA               | poli(metil-metakrilát)                                                                             |
| RNS                | ribonukliensav                                                                                     |
| TRISZ              | trisz(hidroximetil)-aminometán                                                                     |
| $U$                | aktivitás $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}}\right]$                                         |
| $U_B$              | biokatalitikus aktivitás $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}\times\text{g}}\right]$            |
| $U_E$              | biokatalizátoron megkötött enzim natív aktivitása $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}}\right]$ |
| $U_{\text{Enzim}}$ | a lizátum aktivitása $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}}\right]$                              |
| $U_{\text{Im}}$    | az imidazolos mosás utáni felülúszó aktivitása $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}}\right]$    |
| $U_{\text{kat}}$   | a biokatalizátoron megkötött enzim aktivitása $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}}\right]$     |
| $U_{\text{SN}}$    | a rögzítés utáni felülúszó aktivitása $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}}\right]$             |
| UV                 | ultraibolya tartomány (ultra violet)                                                               |
| V                  | reakciótérfogat [ml]                                                                               |
| VIS                | látható fény tartománya (visible)                                                                  |
| XDA (X)            | 1,4-bisz(aminometil)benzol                                                                         |
| $Y_A$              | aktivitás hozam [%]                                                                                |

## 1. Bevezető

Napjainkban a biotechnológia egyre nagyobb szerephez jut a vegyipari alapanyag és köztitermékgyártásban, az egészségügyi termékek gyártásában és a zöld technológiákban. Ez nem csak annak köszönhető, hogy a vegyipari vállalatoknak komoly környezetvédelmi előírásoknak kell megfelelniük, melyek sok esetben magas költségű tisztító műveletekkel érhetőek csak el, hanem annak is, hogy a fenntarthatóbb gazdaságpolitika lépéselőnyt nyújthat versenytársaikkal szemben.

Biokatalizátorok alkalmazásával elkerülhetők a kedvezőtlen reakciókörülmények (például magas nyomás, hőmérséklet, szélsőséges pH), nemkívánatos melléktermékek képződése, illetve mérgező katalizátorok használata. Ezeknek nem csak biztonságtechnikai, de gazdasági előnyei is lehetnek, hiszen sok esetben drága elválasztási és tisztítási műveleteket lehet vele elkerülni.

A választott organizmusban (például baktérium vagy élesztő) a katalízisért felelős rész (például enzimek) természetesen kialakult szerkezettel rendelkeznek, mely által képes regio-, sztereo-, és enantiomerszelekív katalízisre.

Az enzimek nagy hátránya azonban, hogy sejten belüli használata sok esetben mellékreakciókhoz vezethet, illetve a szubsztrát, vagy a termék be- és kijutása is problémákba ütközhet. Sejten kívüli alkalmazásukkor számos tisztítási műveleten kell átesniük, valamint a reakció lezajlása után ki kell nyerni őket a termék mellől, és ezek jelentős költségnövekedéssel járnak.

Emiatt előnyös lehet az enzimek valamilyen szilárd hordozóra történő rögzítése. Ezzel jelentősen megnő a biokatalizátor stabilitása, könnyen szeparálhatóvá válik a reakcióelegytől, újra felhasználható lesz és megnő az élettartama. Ezt kombinálva szelektív enzimtisztítási lépéssel, gazdaságosabb biokatalizátor gyártást érhetünk el.

OTDK dolgozatomban, egy jól működő biokatalizátor fejlesztést és optimalizálást mutatok be *Petroselinum crispum* fenilalanin ammónia-liáz enzim felhasználásával.

## 2. Célkitűzés

OTDK munkám célja hisztidinjelölt rekombináns *Petroselinum crispum* fenilalanin ammonia-liáz enzim szelektív rögzítése egy előzetesen felületmódosított, kereskedelembe kapható, felületi epoxicsoportokat tartalmazó PMMA polimer részecskére.

A hordozó felületmódosítása során a bifunkciós felület egyik funkciója az enzim szelektív rögzítése rögzített-fémionaffinitás-kromatográfia alapján, míg a másik funkciója a felületen maradt epoxicsoportok segítségével a kovalens rögzítés. Emellett a felület tovább optimalizálható a hidrofíli-hidrofób tulajdonságait befolyásolni képes reagensek segítségével.

A felület módosítását négyféle monoamin és hatféle biszamin segítségével végeztem el, a kutatócsoportban korábban optimalizált koncentrációban alkalmazva a reagenseket. A biszaminokon keresztül történik a rögzített-fémionaffinitás-kromatográfias csoportok kialakítása, míg a monoaminok hivatottak a felület tulajdonságait befolyásolni.

Az előállított biokatalizátorokat L-fenilalanin ammónia eliminációs reakciójában kívántuk alkalmazni és a biokatalitikus aktivitásokban, továbbá a felületen kötött enzim aktivitásában mért különbségek alapján vizsgálni az optimális körülményeket.

### 3. Irodalmi áttekintés

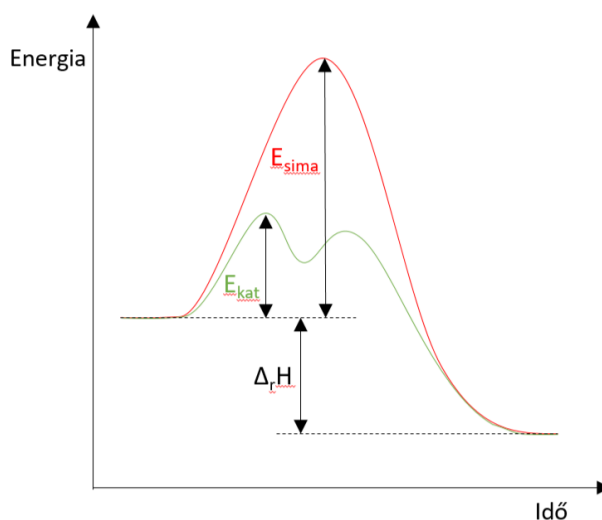
#### 3.1. Enzimekről általánosan

Az enzimek az élő szervezetek katalizátorai, melyek elsősorban aminosavakból épülnek fel. Az általuk katalizált reakciók típusa alapján a nemzetközi Enzim Bizottság (Enzyme Commission) hét fő osztályba sorolja őket (3.1. táblázat).

3.1. táblázat: Enzimek osztályozása.

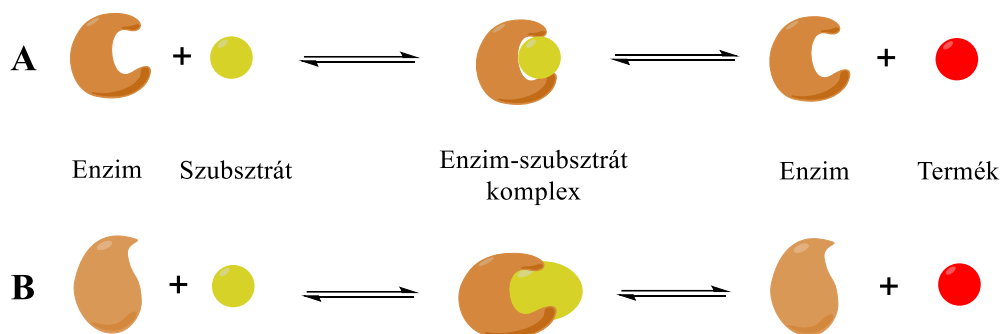
| EC szám | Enzimcsalád     | Katalizált reakció                                     | Példa                 |
|---------|-----------------|--------------------------------------------------------|-----------------------|
| EC1     | Oxidoreduktázok | redoxreakció                                    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

A katalízis során az enzimek csökkentik az adott kémiai reakció aktiválási energiáját, így azok könnyebben végbe mennek, hamarabb elérik az egyensúlyi állapotot (3.1. ábra). Fontos kiemelni, hogy az egyensúly állapotát nem befolyásolják, a termék(ek) mennyisége nem lesz magasabb alkalmazásuk hatására.



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

Több elmélet is létezik az enzimek működési mechanizmusának leírására. A legrégebbi magyarázatot *E. Fischer* dolgozta ki 1894-ben. Eszerint az enzim a „zár”, a szubsztrátum pedig a „kulcs”, azaz a reakció kiindulási anyaga tökéletesen beleillik az enzim aktív centrumába. Ugyan a szubsztrátspecifitást jól leírja, de számos más kérdésben nem ad megfelelő magyarázatot. Az indukált illeszkedés elméletét *Daniel Koshland* dolgozta ki, mely már pontosabb leírást ad a működési mechanizmusról. Ez alapján az enzim képes a szubsztráthoz idomulni, ha az térbelileg megfelelően orientált helyzetben kellően megközelíti (3.2. ábra).<sup>[1]</sup>



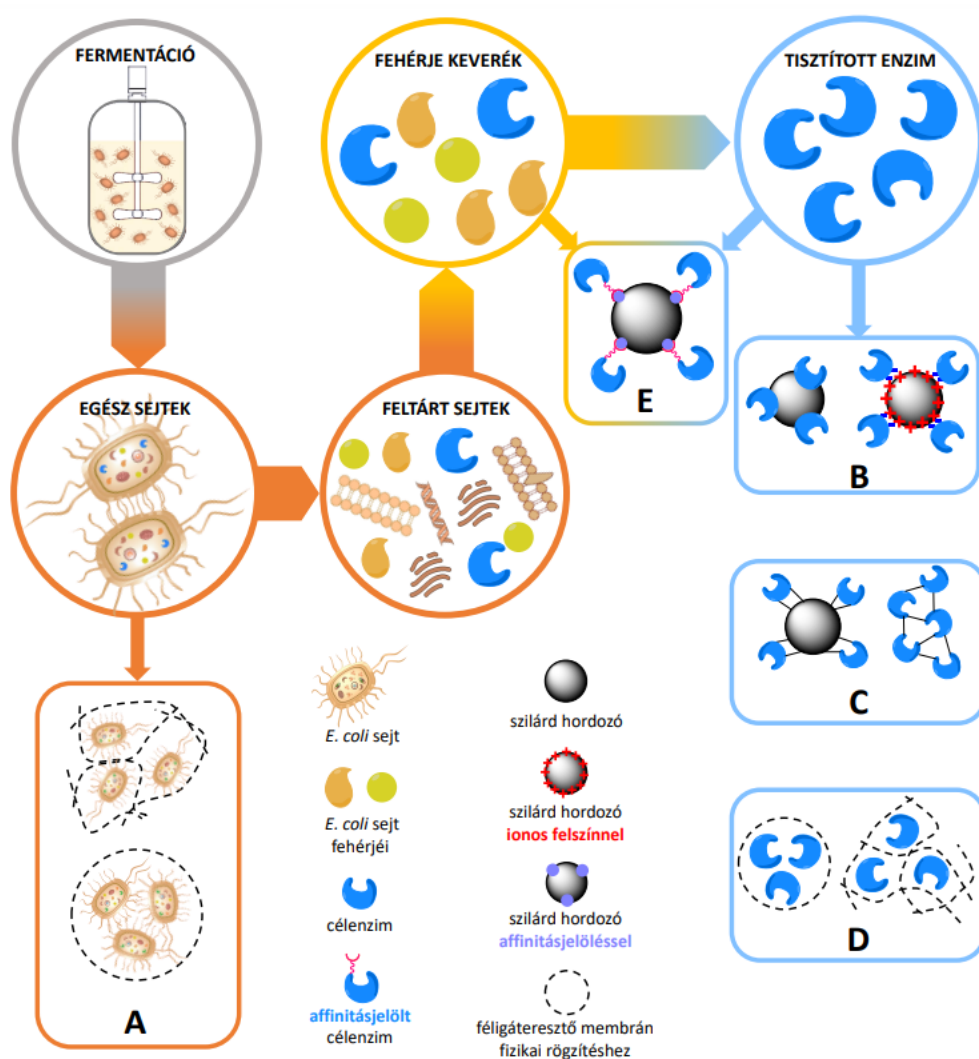
**3.2. ábra:** Kulcs/zár elmélet (A) és indukált illeszkedés (B).

Kezdetben az enzimeket természetes formájukban (élesztők, baktériumok) használták fel az élelmiszeriparban.<sup>[2]</sup> Az utóbbi évtizedekben azonban egyre szélesebb körben alkalmazzák őket például a gyógyszer-, a papír- és a mosószeriparban. Ezt számos előnyük magyarázza: az enzimek régió-, sztereo- és enantiomerszelektívek, azaz tisztább termék állítható elő velük; enyhe körülmények között alkalmazhatók és ekkor rendkívül magas az aktivitásuk; biológiailag lebomlók; magas a turnover number értékük. Előállításuk, tisztításuk, tárolásuk és kinyerésük az ismételt felhasználáshoz azonban magas költségeket von maga után.<sup>[3]</sup> Emellett stabilitásuk nem lenne megfelelő az iparban alkalmazott körülmények között (szerves oldószer jelenléte, magas hőmérséklet). Ezekre a problémákra azonban megoldást jelenthet az enzimek rögzítése. Ezen belül is, ha a módszer kellően szelektív egy lépésben lehet tisztítani és rögzíteni a kinyerni kívánt enzimet, így stabilitásuk növekszik, illetve a reakció lejátszódás után könnyebben kinyerhetők az oldatból.<sup>[4]</sup>

Az enzimek előállítása fermentációval történik, melynek két fő szakasza van. Az úgy nevezett „upstream-processing” során történik az előkészítés, valamint a szaporítás, mely a termékképzés végéig tart. A következő szakaszban a célenzimet izoláljuk, hogy minél tisztább formában tudjuk kinyerni. Ezt nevezzük „down-stream processing” műveletnek.<sup>[5]</sup>

### 3.2. Enzimek rögzítése

Korábban már említett előnye a rögzített enzimeknek, hogy sokkal stabilabbak a környezeti hatásokkal szemben: szélesebb pH- és hőmérséklet-tartományban is aktívak maradnak, valamint szerves oldószer jelenléte sem zavarja működésüket. Akár aktívabbak is lehetnek, mint szabad formában. Emellett a megfelelő módszerrel egy lépésben tisztítani is lehet őket, és többször felhasználhatók, mivel egy egyszerű szűréssel el lehet távolítani a reakcióelegyből. Ezzel együtt használatuk sokkal egyszerűbbé teszi a reaktorok felépítését és a reakció szabályozását, hiszen a biokatalizátor kiszűrésével leállítható a reakció. Megoldást jelenthet az oldódási problémákra is.<sup>[4,6]</sup>



**3.3. ábra:** Rögzített biokatalizátor előállításának lehetőségei az enzimtermelés során

A: egész sejtek rögzítése mátrixba zárással; B: enzimrögzítés fizikai adszorpciós módszerekkel; C: kovalens enzimrögzítés; D: enzimrögzítés mátrixba zárással; E: affinitás kölcsönhatásokon alapuló szelektív enzimrögzítési módszerek.<sup>[7]</sup>

A rögzített biokatalizátorok előállítása az enzimtermelés során több alkalommal is lehetséges (3.3. ábra). A termelő sejteket lehet rögzíteni közvetlenül a termelés végén. Ezzel együtt a célenzim is rögzül, így több, a fehérjetermeléshez kapcsolódó feldolgozási műveletet nem kell elvégezni. Ez gazdasági szempontból rendkívül előnyös, hiszen sokszor ezek igen költséges eljárások. A sejteket általában valamilyen polimermátrixban rögzítik, mely a szubsztrát és a termék számára átjárható (3.3. ábra A).<sup>[8]</sup> Ennek a módszernek az alkalmazása akkor a legjobb, ha az enzim a sejtmembránban helyezkedik el, és az aktív centruma megközelíthető a szubsztrát számára a sejten kívüli térből. Ellenkező esetben a sejtmembránon nehezen vagy akár egyáltalán nem tud átjutni az adott molekula. Ekkor érdemes izolálni a célenzimet a termelő sejtéből.<sup>[9]</sup>

A kinyert enzimek rögzítési technikáit általában két csoportba szokták sorolni: fizikai és kémia módszerek. Előbbiek közé tartozó adszorpciós rögzítés során az enzim másodlagos kölcsönhatásokkal kapcsolódik a hordozóhoz, melynek felszínét olykor módosítani kell, hogy megfelelően kötődjenek egymáshoz (3.3. ábra B).<sup>[10]</sup> A célenzimet polimer mátrixba is zárhatjuk, mint a teljes sejt rögzítése során. Erre például alkalmasak a szol-gél rendszerek, melyek összetételét könnyen igazíthatjuk annak megfelelően, hogy az enzim aktivitásának és a szubsztrát diffúziójának szempontjából is kedvező legyen a rendszer (3.3. ábra D).<sup>[11]</sup> További fizikai módszerek esetén ionos kötések kialakításával (3.3. ábra B) vagy affinitásalapú kölcsönhatásokkal (3.3. ábra E) kapcsolódhat az enzim a hordozóhoz. A fizikai rögzítések során létrejövő kölcsönhatások nem változtatják meg az enzim szerkezetét, ezáltal annak aktivitása megőrizhető. Azonban ezek a gyenge kapcsolódások azt is eredményezik, hogy sokkal könnyebben le is tud válni az enzim a hordozó felületéről.<sup>[10]</sup> Ezt előidézheti a pH vagy az ionkoncentráció változása, különböző detergenssek, valamint az affinitásalapú kölcsönhatásban kompetitív módon résztvevő vegyületek.

Az enzimszivárgás kiküszöbölhető kémiai módszerekkel, illetve a mátrixban rögzített biokatalizátorokhoz képest jobb diffúziós viszonyok érhetők el. Ennek egyik formája, ha az enzimet több pontban kovalens kötéssel rögzítjük a hordozóhoz (3.3. ábra C). Egyik előnye, hogy minimalizálja a konformációs változásokat, amiket előidézhet például magas hőmérséklet vagy szerves oldószer jelenléte. Ezáltal az enzim sokkal stabilabb lesz a környezeti hatásokkal szemben, ha megfelelő pozícióban rögzül. Ellenkező esetben az enzim elvesztheti az aktivitását. Ez függ az enzim felületén található csoportoktól, illetve a hordozón végzett felületmódosításoktól. Utóbbihoz gyakran alkalmaznak epoxivegyületeket, melyek több, a fehérjék felszínén megtalálható, nukleofil csoporttal (pl. lizin vagy cisztein oldalláncai) is

képesek reagálni. Az egyik hátránya ennek a módszernek, hogy a kötések lassan alakulnak ki. Ezen azonban a hordozó felületének kémiai módosításával lehet javítani.<sup>[12]</sup>

Két enzimmolekula között is kialakítható kovalens kötés, amit keresztkötött enzimaggregátumoknak (CLEAs) nevezzük (3.3. ábra C). Ekkor az oldatból szilárd csapadékként leválasztott enzimeket bifunkciós vegyületekkel (pl. glutáraldehid) kapcsoljuk össze. Egyik előnye a módszernek, hogy nagy tisztaságú enzim nélkül is megvalósítható.<sup>[13]</sup> Előállítása viszont nagy enzimigényű, mely költségessé teszi az alkalmazását. A biokatalizátor végső tömege is okozhat problémákat, mivel nehezen lehet centrifugálással elválasztani a reakcióelegytől. Azonban ezt javíthatjuk az enzim-keresztkötő vegyület arányának változtatásával, illetve a rögzítési idő növelésével.<sup>[14]</sup>

A hordozó és az enzimrögzítési módszer megfelelő kiválasztásához figyelembe kell venni az enzim tulajdonságait, a biokatalizátorra ható tényezőket az alkalmazás során, illetve az adott módszer előnyeit és hátrányait. (3.2. táblázat).

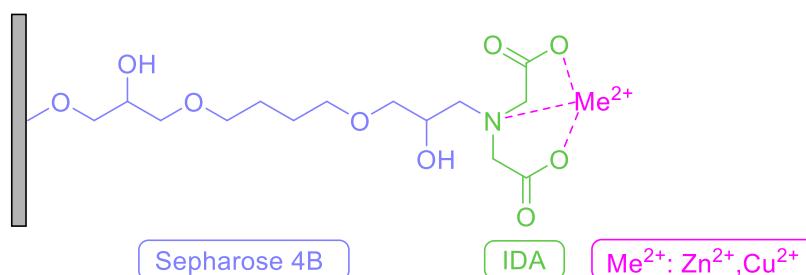
**3.2. táblázat:** Az enzimrögzítési módszerek előnyei és hátrányai.

|                   | Előny                                                                   | Hátrány                                                                                |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Fizikai módszerek | <b>Mátrixba zárás</b>                                                   |                                                                                        |
|                   | nincs enzimszivárgás, szabad konformációváltozás                        | jelentős diffúziós gát, szerves oldószer a mátrixképzés során                          |
|                   | <b>Adszorpció</b>                                                       |                                                                                        |
|                   | egyszerű kivitelezés, regenerálható hordozó, szabad konformációváltozás | gyengébb kötődés, enzimleemosódás                                                      |
|                   | <b>Ionos kölcsönhatás</b>                                               |                                                                                        |
| Kémiai módszerek  | regenerálható hordozó, szabad konformációváltozás                       | meghatározott pH és ionkoncentráció a rögzítéshez, ionos szubsztrátok megkötődése      |
|                   | <b>Affinitás kölcsönhatás</b>                                           |                                                                                        |
|                   | szelektív és orientált kötődés, regenerálható hordozó                   | összetettebb felület szükséges, kompetitív elúció veszélye                             |
|                   | <b>Keresztkötött enzimaggregátumok</b>                                  |                                                                                        |
|                   | nem igényel hordozót, könnyen megvalósítható                            | gyenge mechanikai tulajdonságok, nagy enzimigény, lehetséges inaktiválódás kicsapáskor |
| Kémiai módszerek  | <b>Kovalens rögzítés szilárd hordozóhoz</b>                             |                                                                                        |
|                   | stabil rögzítés, nincs enzimszivárgás, egyszerű felület, jobb diffúzió  | enzim konformációváltozásai nehezebben mennek végbe, inaktiválódás veszélye            |

A különböző módszereket gyakran kombinálják egymással, hogy mindkét rögzítési technika előnyeit kihasználják. Ilyenek például a komplexált fémionokat és epoxicsoportokat tartalmazó kevert felületű hordozók, melyekről a későbbiekben részletesen írok.

### 3.2.1. Szelektív enzimrögzítés fémionaffinitás-komplexben

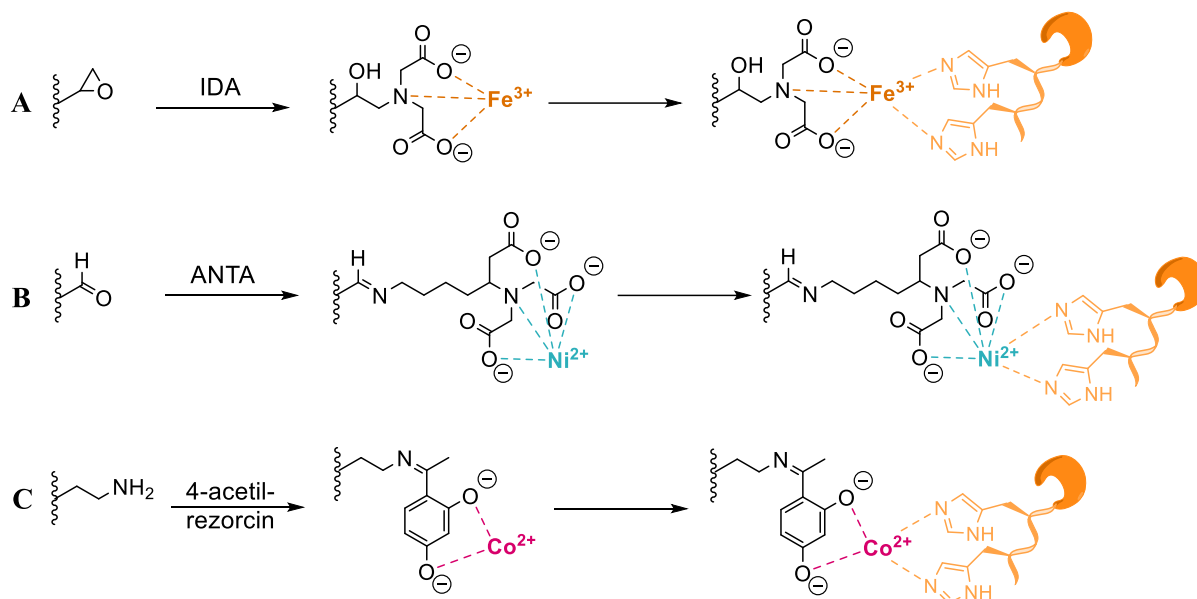
A fémionaffinitás-kromatográfiát alapvetően fehérjék tisztítására fejlesztették ki. *Porath* és munkatársai által végzett kísérletekből megállapítható, hogy hisztidin vagy cisztein csoportot tartalmazó fehérjék kötődnek a legerősebben az átmeneti fémek ionjaihoz, melyeket módosított agaróz alapú gyantához rögzítettek iminodiacetsavval. Ezek közül is a  $\text{Cu}^{2+}$  ionnal volt a legerősebb a kölcsönhatás, de más ionokkal (pl.  $\text{Zn}^{2+}$ ) is sikeres volt a fehérjék megkötése. Így lehetővé vált a különböző fehérjék szelektív és effektív tisztítása.<sup>[15]</sup> Későbbiekben  $\text{Ni}^{2+}$  és  $\text{Fe}^{3+}$  ionokkal is végeztek vizsgálatokat, mely során a hisztidinnel jelölt fehérjék kötődtek a legerősebben.<sup>[16]</sup>



3.4. ábra: *Porath* és munkatársai által használt hordozó.

A módszer kellő szelektivitással bír ahhoz, hogy egy lépésben rögzített biokatalizátorok előállítására is alkalmazzák. Ekkor a tisztítási protokoll végén elhagyják a célenzim elúcióját, és a későbbi felhasználás során kerülnek az olyan komponenseket, amik kiszorítanák az enzimet a komplexből.

A 3.5. ábra néhány lehetséges megoldást mutat az egy lépésben történő hisztidinjelölt enzimek tisztítására és rögzítésére. Az egyik leggyakrabban alkalmazott komplexképző az iminodiacetsav (IDA).<sup>[17]</sup>



**3.5. ábra:** Komplexképző felületek kialakításának lehetőségei

A: iminodiacetsav kapcsolása epoxicsoportokhoz; B:  $N\alpha,N\alpha$ -bisz(karboximetil)-L-lizin (ANTA) kapcsolása glutáraldehidhez; C: polidopamin-típusú felület kialakítása 4-acetil-rezorcinnal.

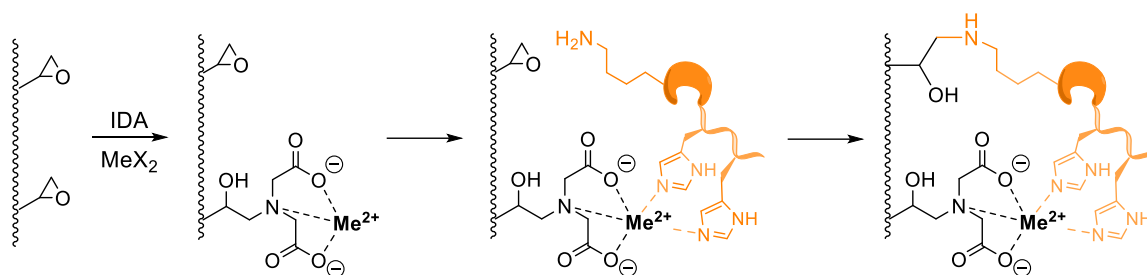
A komplexképző mellett fontos az átmeneti fém kiválasztására is nagy hangsúlyt fektetni. Jelentős hatással lehet ugyanis a hordozó kapacitására, szelektivitására és a biokatalizátor aktivitására. Emellett enzimenként is változhat, hogy melyik átmeneti fémmel alakul ki a megfelelő kapcsolat.<sup>[18]</sup> Sok esetben a nikkelt alkalmazzák, melynek kiemelkedően jó tulajdonságai vannak.<sup>[16,19]</sup>

Összeségében elmondható, hogy az IMAC módszer egy rendkívül gyors és reverzibilis rögzítési lehetőség. Elkerülhetők vele a költséges tisztítási eljárások, valamint az inaktiválódott enzimek eltávolítása után a hordozók újrahasznosíthatók.

### 3.2.2. *Szelektív kovalens enzimrögzítés epoxicsoportokat és komplexált fémionokat tartalmazó kevertfelületű hordozókon*

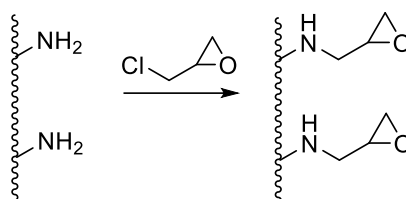
A többfunkciós hordozók felületén sokféle, fizikai és kémiai kölcsönhatásra képes funkciós csoport található. Ezek alkalmazása azért előnyös, mert a fizikai rögzítés sokszor szelektívebb, a kötődés pedig irreverzibilissé tehető kovalens kötéssel.<sup>[20]</sup>

A rögzítés első lépésében a célenzim komplexet alkot a hordozó felületén található fémionnal. Ezt a gyors folyamatot követően a kovalens kötések könnyebben ki tudnak alakulni. Az epoxicsoportok elsősorban a felülethez közelebb lévő enzimekkel fognak reakcióba lépni. Tehát nagy százalékban a célenzim rögzül, nem pedig az egyéb, oldatban megtalálható fehérjék.



**3.6. ábra:** Fémion-affinitáson alapuló szelektív kovalens enzimrögzítés folyamata.

A szelektív adszorpcióra a legalkalmasabbak a fémkötő csoportok, míg a kovalens kötés kialakításához általában epoxicsoportokat használnak. Utóbbiakat már tartalmazó hordozókat kereskedelmi forgalomban is lehet kapni, de elő is lehet őket állítani aminocsoportokon keresztül epiklórhidrinrel.



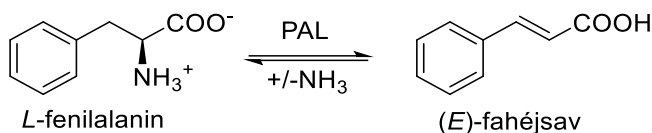
**3.7. ábra:** Felületmódosítás aminocsoportokkal és epiklórhidrinrel.

Mateo és munkatársai 2001-ben sikeresen rögzítettek hisztidinjelölt glutaril-aciláz enzimet epoxi-fémkomplex hordozókhoz. A kísérletek során  $\text{Cu}^{2+}$  és  $\text{Co}^{2+}$  ionokat alkalmaztak, melyek közül az utóbbival érték el nagyobb szelektivitást. Úgy gondolták, ez még tovább javítható, ha a hordozó felületén kis koncentrációban van jelen a komplexképző.<sup>[21]</sup> Később azonban kiderült, hogy az arányuk növelésével jobb aktivitás értékek érthetők el.<sup>[22]</sup> Optimalizálások során átlagosan 15-24 óra alatt érték el a maximális rögzített enzim mennyiséget, és ekkor kapták a legmagasabb aktivitású készítményeket is.<sup>[23]</sup>

Bár az iparban még nem alkalmazzák a módszert, de az epoxi-fémkomplex rögzítésnek ígéretes felhasználási lehetőségei vannak. Az enzimtisztítás elhanyagolása mellett, ami egy rendkívül költséges folyamat, olyan enzimekkel is el lehet végezni a rögzítést, melyek a tisztítási folyamatok (centrifugálás, dialízis, töményítés) során könnyen kicsapódnak.

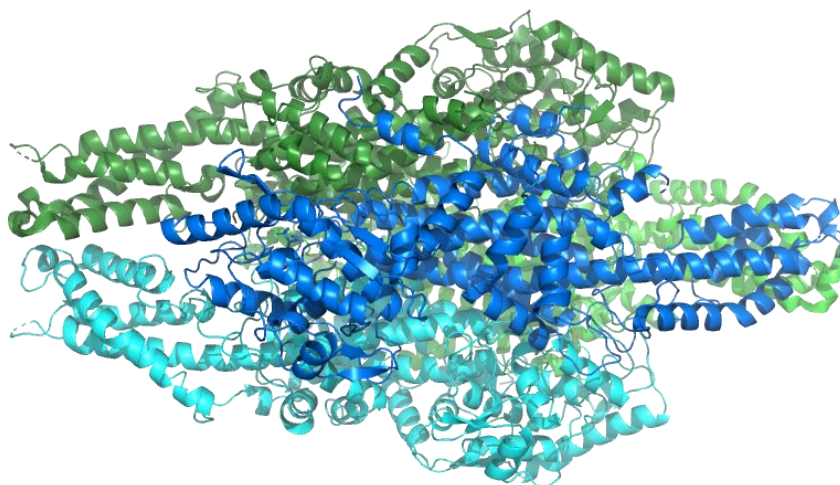
### 3.3. A felhasznált enzim, a PcPAL bemutatása

A fenilalanin ammónia-liáz a liázok (EC4) osztályába tartozik. Az enzim L-fenilalaninból ammónia eliminációjával állít elő (E)-fahéjsavat nem oxidatív módon (3.8. ábra).<sup>[24]</sup>



3.8. ábra: PAL enzim által katalizált reakció.

A PcPAL enzim a fodros metélőpetrezselyemben található meg, de egyéb növényben, élesztőben és gombában is fellelhetők PAL enzimek. Az általuk katalizált reakció a fenilpropanoidok bioszintézisének első lépése. Több másodlagos metabolit is fenilpropanoid származék: antociánok, flavonoidok, UV-védelmet nyújtó vegyületek, antibiotikus hatással rendelkező furanokumarinok, ligninek és sebgyógyulást elősegítő fenolos észterek.<sup>[25]</sup> Ezen vegyületeknek fontos szerepük van a növények fejlődésében, védelmében és a sejtek közötti kommunikációban. A PAL enzim a flavonoidok bioszintézisének egyik legfontosabb enzime, valamint a növény stresszre adott válaszában is jelentős a szerepe. A PAL izoenzimek működését indukálhatja sérülés, a növény növekedését szabályozó vegyületek, UV sugárzás, alacsony hőmérséklet, nitrogén, foszfát vagy vas alacsony szintje.<sup>[26]</sup> A flavonoidok előállítása során keletkező intermedierek az UV-sugárzás mellett kórokozók és rovarok ellen is védik a növényt. Gombákban is hasonló szerepet töltenek be a PAL enzimek. Már több fajta növényből izolálták: a korábban említett fodros metélőpetrezselyemből<sup>[27]</sup>, lúdfűből<sup>[28]</sup>, vörösgyökerű zsályából<sup>[29]</sup> és paradicsomból<sup>[30]</sup> is.<sup>[31]</sup>

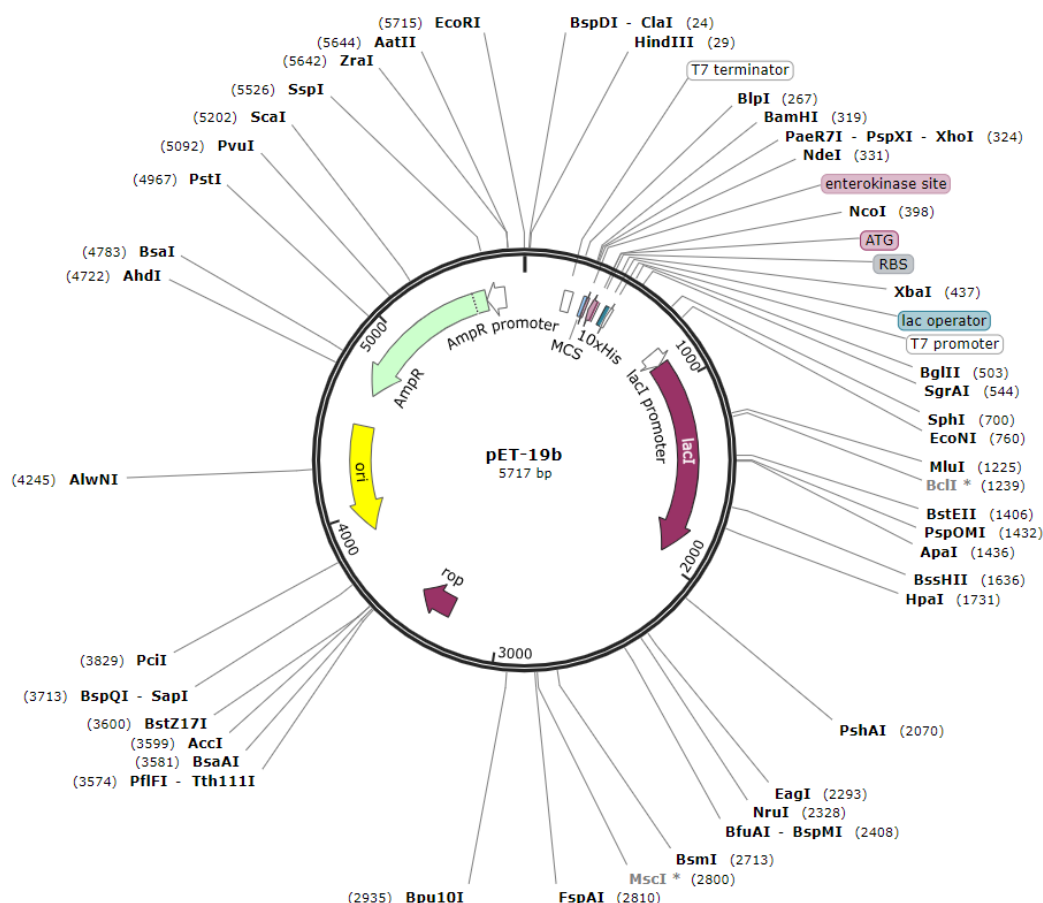


3.9. ábra: PcPAL szerkezete.

### 3.3.1. Rekombináns fenilalanin ammónia-liáz

A fehérjéket elsősorban baktériumsejtekben, élesztőben vagy emlőssejt-tenyészetekben állítják elő fehérje-túltermelési módszerekkel, melyek az expressziós rendszerek közé tartoznak. Más hasonló módszernek kisebb a jelentősége, esetlegesen hosszú időt és nagy ipari kapacitást igényelnek.

Első lépésként a fehérjét kódoló DNS-t, ami általában cDNS, expressziós vektorba kell klónozni, melyben már eleve van egy rész, ahova ez beültethető. Ezen kívül még a vektorban található valamilyen antibiotikum-rezisztencia gén, a cDNS helye előtt egy promóter-régió, illetve gyakran a tisztítás/detektáció megkönnyítésének céljából peptidek/fehérjék DNS szekvenciái is. Utóbbiakat fúziós „tag”-nek hívják, melyből affinitáskromatográfiával történő tisztításhoz három típust szoktak használni: maltóz-kötő fehérjét (MBP), glutation-i-transzferázt (GST) és több hisztidinből álló His-taget (jellemzően 6-10 egység). Az általunk használt enzim expressziós vektorát a 3.10. ábra mutatja.



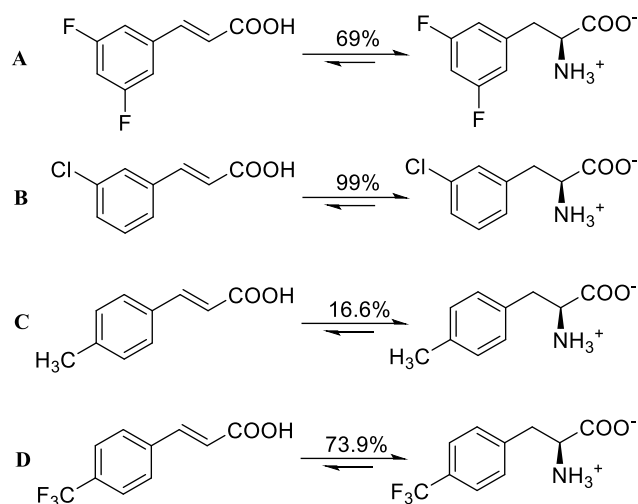
3.10. ábra: A PcPAL enzim expressziós vektora.<sup>[32]</sup>

A His-tag 6-10 egységből álló, rövid peptid, mely nem változtatja meg jelentősen a fehérje méretét. Kétértékű ionokkal (pl.  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ) koordinatív kötést képes kialakítani, mely kellően specifikus és erős a fehérje tisztítására.

A baktériumokban történő fehérjetermelés előnye, hogy olcsón, gyorsan, nagy mennyiségű fehérje állítható elő, mely még tovább növelhető a megfelelő *E. coli* törzs kiválasztásával. A leggyakrabban alkalmazott a BL-21(DE3), mely néhány bakteriális proteázra deficiens, azaz a megtermelt fehérje kevésbé degradálódik, valamint a T7-fág RNS-polimeráz enzimét is termeli, mely az általunk használt PcPAL esetén is előnyös. A termelt fehérjét kinyerhetjük a baktériumsejtek feltárásával és a sejtörmelék eltávolításával centrifugálás segítségével.<sup>[33]</sup>

### 3.3.2. PcPAL felhasználási lehetőségei

Az enzim képes szubsztituált fenilalanin származékokkal is reakcióba lépni. Golge és munkatársai fluort és klórt tartalmazó fahéjsav-származékok reakcióját vizsgálta, ahol az enantiomertisztaság 99% feletti volt. A konverzió értéke eltért a szubsztituensek számától, típusától és helyétől függően.<sup>[34]</sup> Hasonló vizsgálatot végezett el Nagy munkatársaival. Azonban ők már sok, különböző tulajdonságú szubsztrát hatását is elemezték, melyek között volt több elektron-küldő (pl.  $-\text{CH}_3$ ) és -szívó (pl.  $-\text{CF}_3$ ) csoport. Minden esetben elvégezték az ammóniaaddíciót és az -eliminációt is. A konverzió és az enantiomertisztaság alapján megállapítható, hogy *orto*- és *meta*-helyzetben a szubsztituensek elektron-küldő és -szívó tulajdonsága kevésbé befolyásolja reakciót, míg *para*-helyzetű elektron-szívó csoportok jobban kedveztek az átalakulásnak.<sup>[35]</sup> A különböző csoportokkal szubsztituált fenilalaninok fontos építőelemek lehetnek például a HIV kezelésére alkalmazott proteáz inhibitorok szintézisében.<sup>[36]</sup>



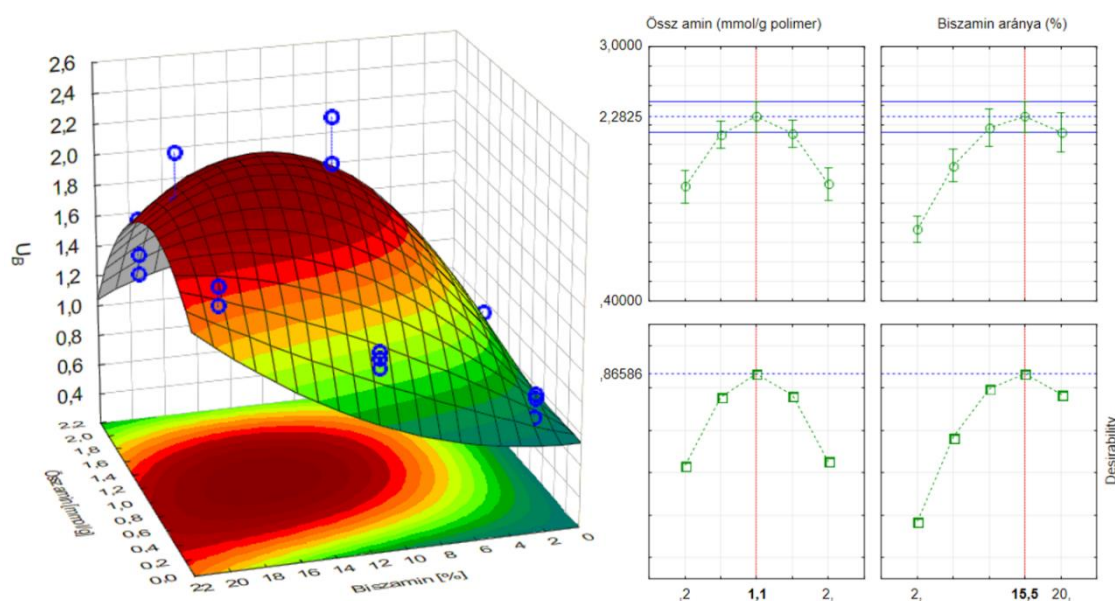
**3.11. ábra:** PAL enzim által katalizált reakciók konverziója az addíció irányába.

A,B: *Golge* és munkatársai; C,D: *Nagy* és munkatársai.

Az enzimet fel lehet használni a fenilketonuria (PKU) kezelésére is. Ez egy genetikai betegség, amikor is a szervezetben található fenilalanin hidroxiláz (PAH) enzimek csökkent aktivitással működnek. Így a fenilalanin nem alakul át teljesen tirozinná. A vegyület és metabolitjai felhalmozódnak különböző idegrendszeri problémákat okozva (pl. szellemi fogyatékoság, rohamok). Korai felismerés esetén a szigorú fenilalanin-mentes diéta enyhítheti a károkat, ezért már az újszülötteket is tesztelik a betegségre. Rágcsálókban már sikeresen használták a PAL enzimet, jelentősen csökkent a szervezetükben található fenilalanin mennyisége. Sok éves fejlesztésnek köszönhetően pár éve már elérhetővé vált egy enzimterápiás készítmény, melyben egy PAL enzim pegilált formája található és injekció formájában alkalmazzák PKU-s betegek kezelésére.<sup>[37]</sup>

## 4. Előzmények

A kutatócsoportban több éve foglalkoznak IMAC alapú szelektív enzimrögzítési eljárások kidolgozásával. Ennek kapcsán merült fel egy epoxicsoportokat tartalmazó, kereskedelmi forgalomban kapható hordozó alkalmazása ilyen rögzítési eljárásokban. Ennek során úgy módosították a hordozót, hogy biszaminon keresztül fémionok komplexálására képes csoportokat alakítottak ki a felületen. Emellett pedig monoaminnal próbálták tovább befolyásolni a felületi tulajdonságokat, mely hatással lehet a későbbi biokatalizátor aktivitására. A felületmódosítást követően megmaradó epoxicsoportok adtak lehetőséget az enzim kovalens rögzítésére. Mivel a sikeres enzimrögzítésben nagy szerepe van mind a komplexképző csoportok mennyiségének, mind pedig a megmaradó epoxicsoportok arányának, ezért fontos volt vizsgálni, hogy ezek mennyisége hogyan hat a biokatalizátor aktivitására. Ezt kísérlet tervezés keretein belül vizsgálták egy biszamin-monoamin páros alkalmazásával. Etiléndiamint és benzilamint használtak a felületmódosítás során és megállapították, hogy a legjobb kapacitású és aktivitású biokatalizátort abban az esetben kapják, ha 1,1 mmol a teljes aminos mennyiség 1 g hordozó esetén, és ezen belül is 15,5% a biszamin mennyisége (4.1. ábra).



**4.1. ábra** A négyzetes modell háromdimenziós ábrázolása (bal) a meghatározott optimum pontok (jobb).

Mivel a kutatócsoportnak akkor még nem volt lehetősége saját enzimtermelésre, ezért az optimális arány alkalmazása mellett nem tudták megvalósítani a rögzítési kísérleteket más aminosokkal friss enzimszrzs alkalmazása mellett.

Itt kapcsolódtam be a kutatásba, és a korábbiakban is alkalmazott *PcPAL* enzimmel, az eredeti tervekhez képest további két biszaminnal kiegészítve a felhasználható felületmódosító ágensek körét vizsgáltam a különböző bisz- és monoamin kombinációk hatását a végső biokatalizátorra.

## 5. Módszerek

### 5.1. Felhasznált anyagok

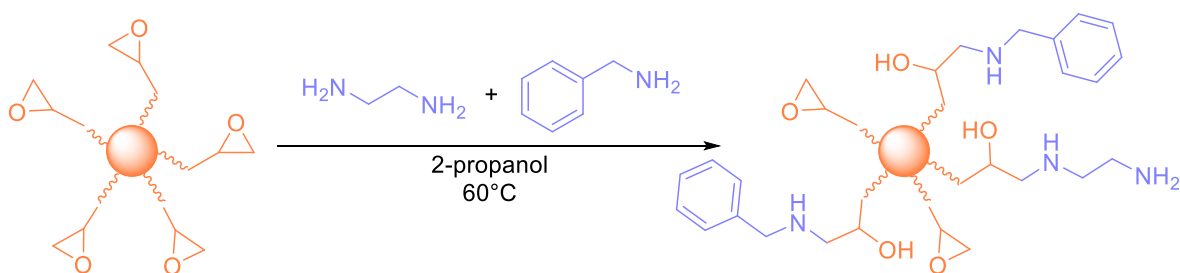
A felhasznált vegyszerek és oldószerek a Sigma-Aldrich, a Fluka, a Merck, az Alfa Aesar, a Reanal, és a Molar Chemicals termékei. A fehérjeanalízis során alkalmazott egyéb vegyszerek a Biorad és a Thermo Scientific termékei. A fehérjetermelést a kutatócsoport korábbi tapasztalatai alapján kialakított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

### 5.2. Alkalmazott eszközök

A rázások során Heidolph Vibramax 100 típusú készüléket, termosztált rázítás esetén pedig a rázó gép mellett Heidolph Thermo 1000 termosztáló készüléket használtam. Az UV spektrofotometriás mérésekhez Thermo Scientific Multiscan SkyHigh típusú microplate spektrofotométert és mintánként 300 µl térfogatú Greiner UV-Star® 96-lyukú well-plate-et alkalmaztam. Az anyagokat Binder VDL típusú vákuum-száritószekrényben szárítottam. A fehérjetisztítási vizsgálatok során Thermo IEC MicroCL 21 típusú Eppendorf centrifugát használtam.

### 5.3. ChiralVision T2-150 hordozó felületmódosítása

#### 5.3.1. Epoxigyűrű felnyitása különböző bisz- és monoamin párosokkal



5.1. ábra: Epoxigyűrű felnyitása etilén-diaminnal és benzilaminnal.

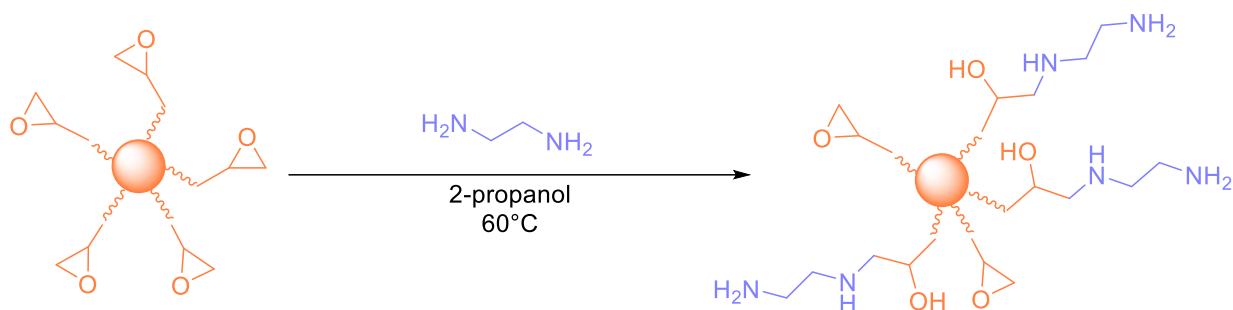
Egy 15 ml-es kisüvegbe bemértem 500 mg polimer hordozót, majd hozzáadtam 3250 µl 2-propanolt, a megfelelő biszamin törzsoldatból 855 µl-t és a monoamin törzsoldatból 930 µl-t. Termosztáló rázógépen  $60^\circ\text{C}$ -on rázattam 24 órán keresztül olyan fordulaton, hogy a gyöngyök ne ülepedjenek ki (kb. 450 rpm).

**5.1. táblázat:** A bisz- és monoamin törzsoldatok elkészítéséhez szükséges mennyiségek.

|                    |            | Jelölés | Koncentráció<br>[mM] | Tömeg<br>[mg] | Térfogat<br>[μl] | 2-Propanol<br>[μl] |
|--------------------|------------|---------|----------------------|---------------|------------------|--------------------|
| Biszamin<br>típusa | EDA        | E       | 100                  | -             | 35               | 4965               |
|                    | DETA       | D       | 100                  | -             | 54               | 4945               |
|                    | AEO        | A       | 100                  | -             | 73               | 4930               |
|                    | XDA        | X       | 100                  | 68,1          | -                | 5000               |
|                    | HDA        | H       | 100                  | -             | 104,4            | 7896               |
|                    | CHB        | C       | 100                  | -             | 120,4            | 7880               |
| Monoamin<br>típusa | Benzilamin | B       | 500                  | -             | 275              | 4725               |
|                    | Etanolamin | E       | 500                  | -             | 150              | 4850               |
|                    | Allilamin  | A       | 500                  | -             | 190              | 4810               |
|                    | Propilamin | P       | 500                  | -             | 205              | 4795               |

A 24 óra leteltével a felületmódosított hordozót háromszor mostam át 10 ml 2-propanollal. Az oldószerrel rázógépen rázattam a gyöngyöket pár percet, majd egy pipettával minimális anyagveszteség mellett leszívtam a mosófolyadékot. A gyöngyöket tartalmazó üvegeket lefedtem papírvattával, és a vákuumszáritó szekrényben tömegállandóságig szárítottam.

### 5.3.2. Epoxigyűrű felnyitása különböző biszaminokkal



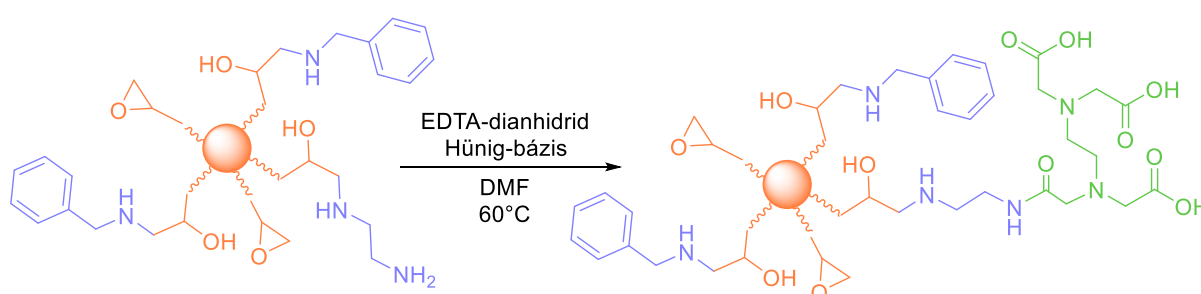
**5.2. ábra:** Epoxigyűrűk felnyitása csak etilén-diaminnal.

Egy 15 ml-es kisüvegbe bemértem 500 mg polimer hordozót, majd hozzáadtam a megfelelő mennyiségű 2-propanolt és biszamint. Termosztáló rázógépen  $60^\circ\text{C}$ -on rázattam 24 órán keresztül olyan fordulaton, hogy a gyöngyök ne ülepedjenek ki (kb. 450 rpm). Az idő letelte után háromszor mostam a gyöngyöket 10 ml 2-propanollal a fentebb leírt módon. A gyöngyöket tartalmazó üvegeket lefedtem papírvattával, és a vákuumszáritó szekrényben tömegállandóságig szárítottam.

**5.2. táblázat:** Biszamin törzsoldatok elkészítéséhez szükséges mennyiségek.

|                    |      | Jelölés | Tömeg<br>[mg] | Térfogat<br>[μl] | 2-Propanol<br>[μl] |
|--------------------|------|---------|---------------|------------------|--------------------|
| Biszamin<br>típusa | EDA  | E       | -             | 36,5             | 4965               |
|                    | DETA | D       | -             | 59,5             | 4940               |
|                    | AEO  | A       | -             | 80,5             | 4920               |
|                    | XDA  | X       | 75            | -                | 5000               |
|                    | HDA  | H       | -             | 72               | 4925               |
|                    | CHB  | C       | -             | 83               | 4915               |

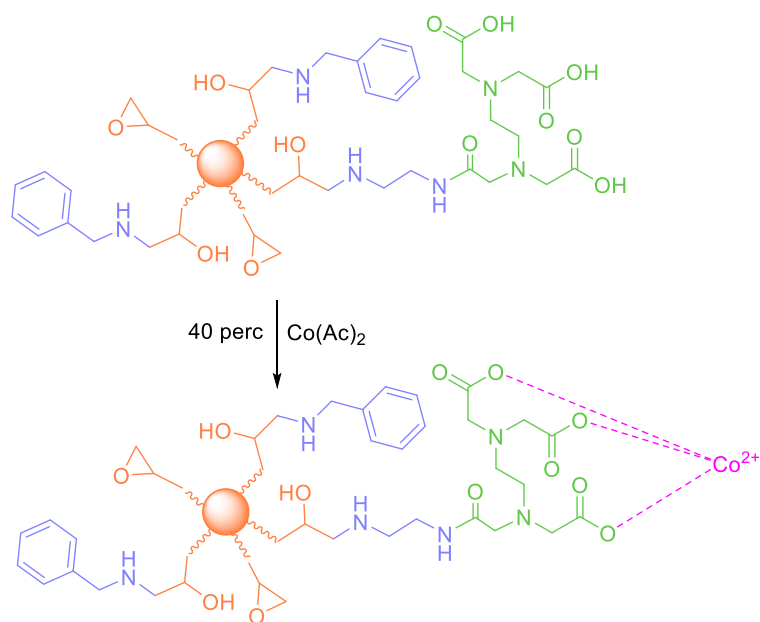
### 5.3.3. A polimer funkionalizálása EDTA-dianhidriddel



**5.3. ábra:** Felületmódosítás EDTA-dianhidriddel.

A reakciót inert körülmények között hajtottam végre. Kihevített 15 ml-es kisüvegbe bemértem az 500 mg polimer hordozót, majd hozzáadtam 2850 μl DMF-et, 2185 μl EDTA-dianhidrid törzsoldatot (40 ml DMF + 600 mg EDTA-dianhidrid) és 15 μl Hünig-bázist. Az argonnal inertizált jól lezárt reakcióelegyet termosztáló rázógépen 60 °C-on rázattam 23 órán keresztül, majd hozzáadtam 500 μl desztillált vizet. Így még 1 órán át rázattam. Az idő letelte után 2×5 ml acetonitrillel és 5 ml 2-propanollal mostam a gyöngyöket. A mintákat a fentebb említett módon tömegállandóságig szárítottam vákuumszáritó szekrényben.

#### 5.3.4. Fémion komplexálása a polimer hordozók felületén



5.4. ábra: Fémkomplex képzés.

A hordozókból kimértem 10 mg-ot egy 4 ml-es kisüvegbe, és hozzáadtam 1 ml kobalt-acetát oldatot (50 mM-os oldat desztillált vízben). Az elegyet 40 percig rázattam szobahőmérsékleten, majd háromszor átmostam a gyöngyöket 1 ml desztillált vízzel és egyszer 1 ml lízis pufferrel. Ezután elkezdtem az enzimrögzítést.

#### 5.3.5. Enzimrögzítés és tesztreakció

A rögzítés előtt a kapott lizátumot 5 percig 12000 G-n centrifugáltam, és a felülúszót használtam a továbbiakban. A fémkomplexálást követően a gyöngyökre pipettáztam 1 ml-t 8 ml lizátum és 10 ml lízis puffer keverékéből. Az elegyet 18 órán keresztül rázattam szobahőmérsékleten, majd elkezdtem a lemosást: egyszer LS és HS oldattal (1-1 ml), aztán 500 mM-os imidazol oldattal, végül háromszor 100 mM-os TRISZ-pufferrel. Az első három oldattal 10-10 percet rázattam a gyöngyöket, TRISZ-pufferrel csak pár percet. A maradék lizátum-puffer keveréket, a 18 óra utáni felülúszót és az imidazolos mosás utáni felülúszót elraktam 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe aktivitás hozam mérés céljából.

Az előállított enzimekészítmények aktivitását, szárítás nélkül közvetlenül vizsgáltam L-fenilalanin ammóniaeliminációs reakciójában, melyben fahéjsav keletkezik. Ehhez adtam hozzá 2 ml 10 mM-os L-fenilalanin oldatot, és termosztálható rázógépen 30 °C-on rázattam az elegyet. A fahéjsav mennyiségének növekedését 290 nm hullámhosszon UV-spektrofotometriás méréssel követtem fél, 1 és 2 óra után.

### 5.3.6. *Natív enzimaktivitások vizsgálata*

Az aktivitás hozam megállapításához a rögzítés során alkalmazott kiindulási fehérjekeverékből, a rögzítések után visszamaradt fehérjekeverékből és az imidazol oldatos lemosó frakciókból mértem aktivitást. Ehhez 96-lyukú well-platebe kimértem 290-290 µl L-fenilalanin oldatot, majd ezekhez adtam hozzá az enzimoldatokból 10-10 µl-t. A keletkező fahéjsav abszorbanciájának növekedését 290 nm-en 5 percen át rögzítettem 30 °C-ra termosztált platereader készülékben, és ebből az abszorbancia-növekedésből számítottam a célenzim specifikus aktivitását.

## 5.4. **Alkalmazott vizsgálati módszerek**

### Aktivitásmérés spektrofotometriás úton

A reakció során képződő (E)-fahéjsav UV-tartományban észlelhető abszorbanciát mutat, a spektrofotometria során 290 nm-en mért eredményeket kiértékelve kaptuk meg az aktivitásokat és a konverziót.

$$\text{Aktivitás (U)} = \frac{(c_t - c_{t_0}) * V}{\Delta t} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}} \right]$$

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

$$\text{Konverzió} = \frac{c_t}{c_{t_0}} \times 100 [\%]$$

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

$c_{t_0}$  = kiindulási szubsztrát koncentráció  $\left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right]$

$\Delta t$  = eltelt idő [perc]

$V$  = reakciótérfogat [ml]

$m_B$  = biokatalizátor tömege [g]

Az (E)-fahéjsav moláris extinkciós koefficiensét az adott hullámhosszon és készüléken a kutatócsoport korábban már meghatározta kalibrációval az általam használt készüléken, így én is ezt az értéket használtam a számításaim során ( $\epsilon = 9500 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

### Aktivitás hozam mérése spektrofotometriás úton

Az enzimrögzítési folyamat mosásai során a fel nem használt lizátumból, az enzimrögzítés utáni felülúszóból és az imidazolos mosás utáni felülúszóból aktivitásokat mértem az aktivitás

hozam kiszámítása céljából. Az aktivitási hozam megmondja, hogy a rögzített enzim aktivitása hány százaléka a natív enzim aktivitásának (mennyivel csökken vagy nő az adott enzimmennyiség aktivitása a rögzítés hatására).

$$\text{Aktivitás hozam } (Y_A) = \frac{U_{\text{kat}}}{U_E} \times 100[\%]$$

$$U_E = U_{\text{Enzim}} - U_{\text{SN}} - U_{\text{Im}} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}} \right]$$

$$U_{\text{kat}} = \text{A biokatalizátoron megkötött enzim aktivitása} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}} \right]$$

$$U_E = \text{Biokatalizátoron megkötött enzim aktivitása natív állapotában} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}} \right]$$

$$U_{\text{Enzim}} = \text{A kiindulási lizátum aktivitása} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}} \right]$$

$$U_{\text{SN}} = \text{A rögzítés utáni felülúszó aktivitása} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}} \right]$$

$$U_{\text{Im}} = \text{Az imidazolos mosás utáni felülúszó aktivitása} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}} \right]$$

## 5.5. Alkalmazott oldatok, pufferek összetétele

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

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

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

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

### Imidazol lemosó oldat (500 mM)

500 mM-os: LS oldatban (100 ml) bemértem az imidazolt (3,4039 g), majd miután feloldódott koncentrált sósav adagolásával 7,5-re állítottam az oldat pH-ját.

### 100 mM-os TRISZ-puffer

Desztillált vízben (100 ml) feloldottam trisz(hidroximetil)-aminometánt (1,21 g), majd az oldat pH-ját cc. sósavval 8,8-ra állítottam be.

### 10 mM-os L-fenilalanin oldat

TRISZ-pufferben (100 ml, 100 mM, pH=8,8) ultrahang segítségével feloldottam L-fenilalanint (0,0826 g, 10 mM-os oldathoz).

Fémsó oldat (50 mM)

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

Lízis puffer (50 mM TRISZ, 150 mM NaCl)

Desztillált vízbe (500 ml) feloldottam nátrium-kloridot (4,383 g) és TRISZ-t (3,028 g), majd az oldat pH-ját tömény sósav segítségével 7,5-re állítottam.

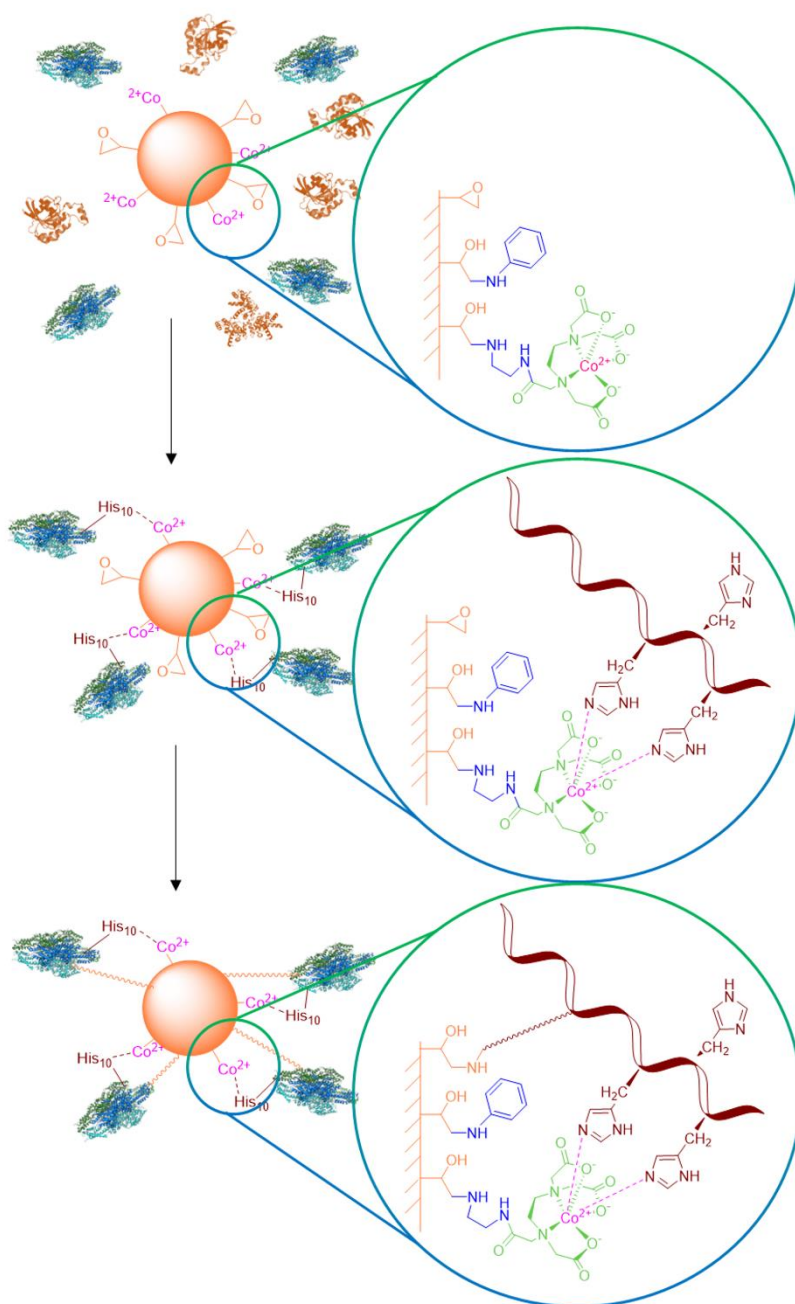
## 6. Eredmények és értékelésük

Kísérleteim során egy felületi epoxicsoportokat tartalmazó, pórusos polimer hordozó felületén alakítottam ki bifunkciós felületet, melynek egyik funkciója a rögzítettfémaffinitás-kromatográfián alapuló szelektív rögzítés, amit úgy értem el, hogy biszaminokon keresztül etilén-diamin-tetraecetsavat kapcsoltam a felülethez. A másik funkció az epoxicsoportokon keresztüli kovalens kötés, amit a felületen el nem reagált epoxicsoportokkal értem el. Ezeken túl a hordozó felületi hidrofil-hidrofób tulajdonságait is igyekeztem befolyásolni többféle monoaminnal.

A különböző módon felületmódosított hordozók mindegyikéhez a felületen rögzített EDTA funkcióhoz

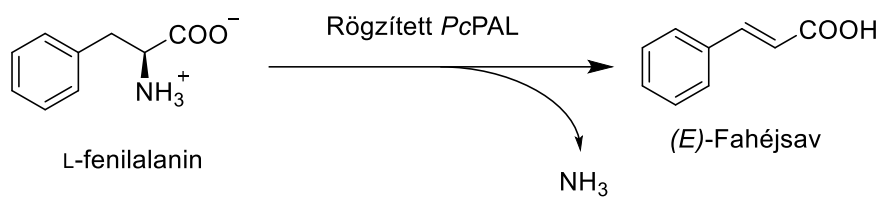
kobalt ionokat komplexáltattam, így létre is jött a szelektív enzimrögzítésre képes hordozó.

Az enzimrögzítés során 18 órás reakcióidő alatt nagyjából egy óra alatt az enzim hisztidinjein keresztül komplexálódik a kobalt ionokhoz, majd a maradék időben a szelektíven rögzült célenzim amino-, tiol- és hidroxilcsoportjai a felületen található epoxicsoportokkal kovalens kötést alakítanak ki, ezzel létrehozva kész biokatalizátort. (6.1. ábra)



6.1. ábra: Az enzimrögzítés menete.

A reakciók során minden esetben a 3.3 fejezetben bemutatott *Petroselinum crispum* fenilalanin ammónia-liáz enzimét rögzítettem, és használtam tesztreakciójában, az L-fenilalanin ammóniaeliminációs reakciójában (6.2. ábra).



6.2. ábra: A PcPAL tesztreakciója.

### 6.1. Bisz- és monoaminok hatásának vizsgálata

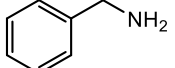
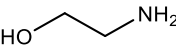
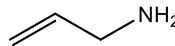
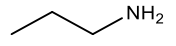
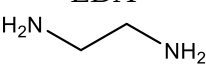
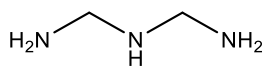
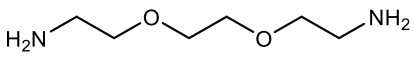
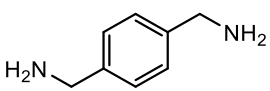
A kutatócsoportban korábban meghatározott optimális összamin mennyiséget és biszamin arányt alkalmazva vizsgáltam, hogy ezen vegyületek különböző kombinálásával milyen aktivitású biokatalizátorokat tudok előállítani. A felületmódosítások során feltételeztem, hogy az alkalmazott aminok aktivitása között nincsen akkora különbség, mely nagyban befolyásolná a megmaradó epoxicsoportok számát.

Először azt vizsgáltam, hogy a bisz- és monoaminoknak milyen hatása van a megkötött célenzim mennyiségére, illetve aktivitására. A komplexképzésnek leginkább az első folyamatban, míg a hordozó felületi tulajdonságainak mindkét lépésben jelentős szerepe lehet. Ehhez négyfajta mono- és négyfajta biszamin alkalmaztam, melyeket kereszttáblázásban, minden kombinációban kipróbáltam. Ezzel párhuzamosan vizsgáltam azt az esetet is, hogy a csak biszamminnal módosított hordozó mennyire képes megkötni az PcPAL enzimet, és milyen aktivitású biokatalizátort eredményez. Ez utóbbi kísérletek esetén a biszamin ugyanolyan mennyiségben alkalmaztam, mint a kereszttáblázások során a teljes bisz- és monoamin mennyiség. Így igyekeztem biztosítani, hogy hasonló mennyiségben maradjanak epoxicsoportok a felületen és a kovalens rögzítés hatékonysága ne változzon. Szintén referenciaként elvégeztem a rögzítést a felületmódosítás nélküli kereskedelmi hordozón is, melyen csak epoxicsoportok találhatóak, szelektivitást biztosító fémionok nem.

Az enzimrögzítést minden esetben a fermentációt és sejtfeltárást követően a sejttörmelék eltávolítása után kapott fehérjekeverékből végeztem. Így a fémionokat tartalmazó hordozó esetén érvényesülhetett a szelektivitást biztosító hatás, míg a felületmódosítás nélküli hordozó esetén a keverékben jelen lévő fehérjék kovalens kötődése statisztikusan történt.

Fontos volt, hogy a biokatalizátorok aktivitásának vizsgálata során csak a kovalensen rögzített enzimek működéséből származó aktivitást vizsgáljam, így az enzimrögzítés végén minden esetben beiktattam egy imidazol oldatos (500 mM imidazol, pH=7,5) mosást, mely kompetitív komplexképzőként képes kiszorítani azokat a PcPAL enzimmolekulákat, melyek kovalensen nem kötődtek a felülethez, csak a fémionokhoz koordináltak.

**6.1. táblázat:** Az első kísérlet során alkalmazott bisz- és monoamin párosok, illetve a csak biszaminnal módosított hordozók jelölései.

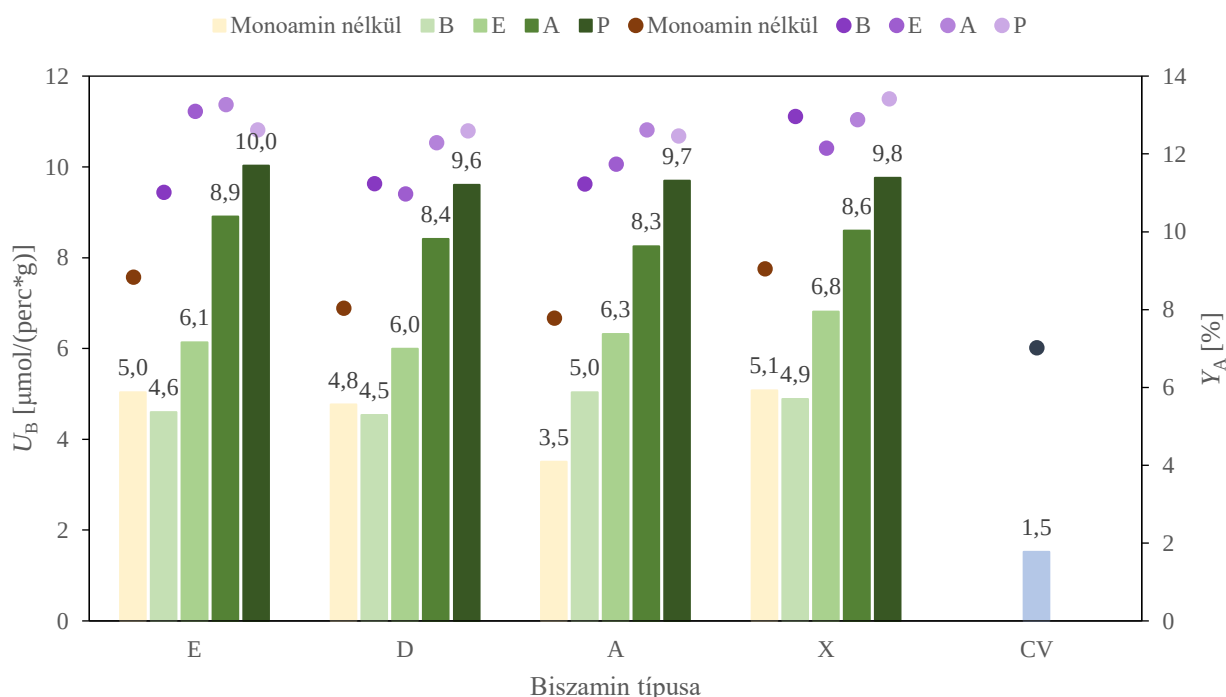
|                                                                                            | Monoamin<br>nélkül<br>- | Benzilamin<br> | Etanolamin<br> | Allilamin<br> | Propilamin<br> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EDA<br>   | E                       | EB                                                                                              | EE                                                                                               | EA                                                                                               | EP                                                                                                |
| DETA<br>  | D                       | DB                                                                                              | DE                                                                                               | DA                                                                                               | DP                                                                                                |
| AEO<br>   | A                       | AB                                                                                              | AE                                                                                               | AA                                                                                               | AP                                                                                                |
| XDA<br> | X                       | XB                                                                                              | XE                                                                                               | XA                                                                                               | XP                                                                                                |

Minden felületmódosított hordozó esetén jobb kapacitást értem el a célenzimre vonatkoztatva, mint a felületmódosítatlan polimer esetén (22%) (6.2. táblázat), a rögzítés tehát nagyobb szelektivitással történt meg a felületmódosított hordozók esetében. A legnagyobb kapacitást az allil- és propilaminnal módosított hordozók esetén értem el. Benzilamin alkalmazása mellett szinte minden esetben jelentősen csökkent a megkötött célenzim mennyisége a csak biszaminnal módosított hordozókéhoz képest.

**6.2. táblázat:** A rögzített célenzim mennyisége (%) a különböző bisz- és monoamin kombinációkkal előállított hordozók esetén. Ez a kapacitás érték a felületmódosítás nélküli hordozó esetén 22%.

|      | Monoamin<br>nélkül | Benzilamin | Etanolamin  | Allilamin  | Propilamin |
|------|--------------------|------------|-------------|------------|------------|
| EDA  | 58,3 ± 10,8        | 41,7 ± 1,2 | 46,8 ± 1,2  | 67,1 ± 2,0 | 79,4 ± 1,7 |
| DETA | 59,4 ± 3,6         | 40,5 ± 1,4 | 54,7 ± 3,9  | 68,6 ± 3,4 | 76,6 ± 6,0 |
| AEO  | 45,9 ± 6,7         | 45,4 ± 8,1 | 54,0 ± 4,2  | 65,7 ± 5,5 | 78,1 ± 6,2 |
| XDA  | 57,2 ± 9,1         | 37,8 ± 2,0 | 58,5 ± 13,9 | 67,1 ± 4,3 | 73,1 ± 6,1 |

Ugyanakkor az aktivitás hozamok esetén nem tapasztaltam jelentős eltérést a monoaminokkal is módosított hordozók között ( $Y_A$  értékek, 6.3. ábra), ebben az értékben a csak biszaminokkal módosított katalizátorok maradtak el a többitől. Ebből arra lehet következtetni, hogy bár a benzilaminos katalizátorok kevesebb enzimet kötöttek meg a katalizátor mégis hatékonyabban működött, mint a monoamint nem tartalmazó változatok. Ennek oka lehet például, hogy a reakciónak kedvez az a hidrofób felület, amit a benzol gyűrű biztosít, például úgy, hogy gyorsabb lesz a szubsztrát és a termék diffúziója a pórusokban.



**6.3. ábra:** A tesztreakciók során kapott aktivitásra jellemző értékek. Oszlopok: specifikus biokatalizátor aktivitás értékek ( $U_B$ ), pontok: aktivitás hozam értékek ( $Y_A$ ). A biszamin típusának (E,D,A,X) és monomain típusának (B,E,A,P) kódját az 6.1. táblázat tartalmazza. CV: felületmódosítás nélküli kereskedelmi hordozóval elért eredmények.

A 6.3. ábra jól mutatja, hogy minden aminos módosítás esetén jobb aktivitásokat értem el, mint a felületmódosítás nélkül alkalmazott kereskedelmi hordozó (CV) esetén, mely csak statisztikus mennyiségben kötött enzimet a fehérjekeverékből. A monoamin az esetek nagyrésztében javított a rögzített enzim működésén és a biokatalizátor aktivitásán a csak biszaminnal módosított felületűekkel szemben. Egyedül a benzilamin alkalmazása esetén nem látható akkora különbség a konverzió és az enzimaktivitás értékeiben, melynek oka az elve kisebb kötőkapacitást, amit magyarázhatunk szterikus hatásokkal: a benzol gyűrű miatt az enzim nehezebben fér oda a hordozón található epoxicsoporthoz. Így a kovalens kötés

kevésbé tud kialakulni, a komplexben megkötött enzim könnyen leválhat az imidazol oldatos mosás során.

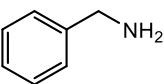
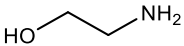
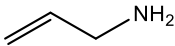
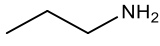
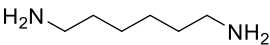
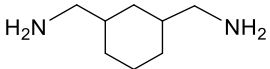
Összeségében elmondható, hogy a propilamin hatása a legkedvezőbb: magas konverzió értékek mellett az enzimek aktivitása is kiemelkedő. A rövid szénlánc nem árnyékolja le az epoxicsoportokat, könnyen kialakulhat a kovalens kötés. Emellett kissé hidrofóbá teszi a hordozó felületét, mely az L-fenilalaninnak kedvezhet, emellett pedig az enzim hidrofób oldalláncú aminosavaival is kialakíthat kedvező kölcsönhatásokat.

Aktivitás szempontjából nincs nagy különbség a monoaminok között: a rögzítés során hasonló százalékban maradt meg az PcPAL enzimek aktivitása. Azonban a konverzió és az enzimaktivitás értékek jól rámutatnak az egyes monoaminok hatására, illetve arra, hogy a biszamin típusa nincs jelentős hatással a biokatalizátor működésére.

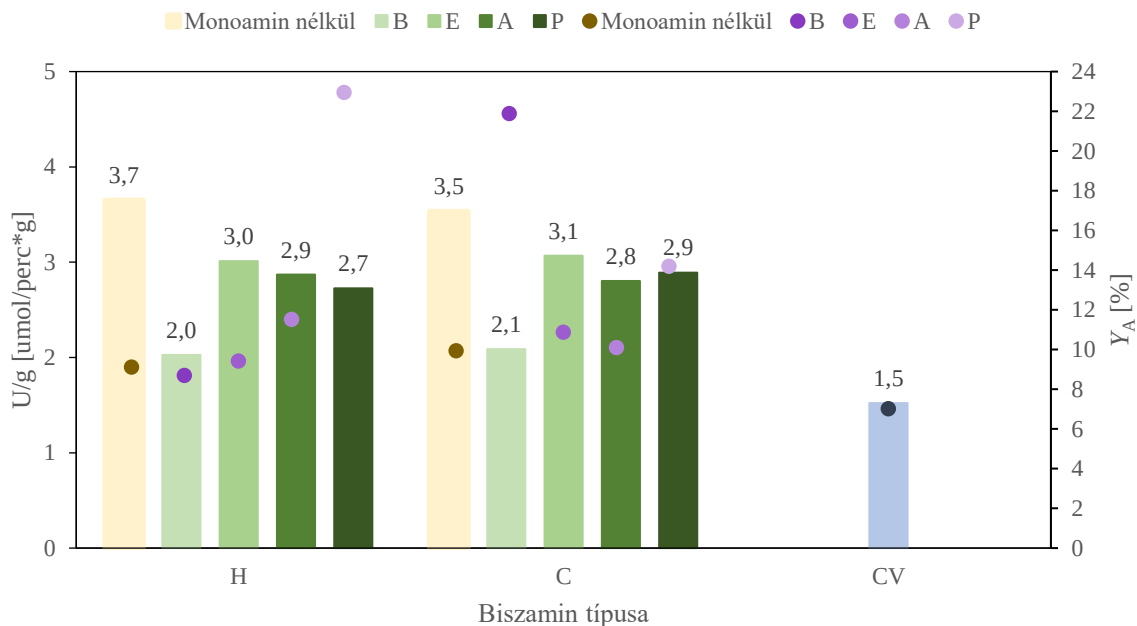
## 6.2. Két további biszamminal történő vizsgálatok

Az első kísérlet során jól látszódott, hogy a biszamin típusa nem befolyásolja jelentősen a biokatalizátor aktivitását. Ennek az igazolására végeztem el a felületmódosítást két másik biszamminal (HDA, CHB) is ugyanazokkal a monoaminokkal párosítva őket.

**6.3. táblázat:** A második kísérlet sorozat során alkalmazott bisz- és monoamin párosok, illetve a csak biszamminal módosított hordozók jelölései.

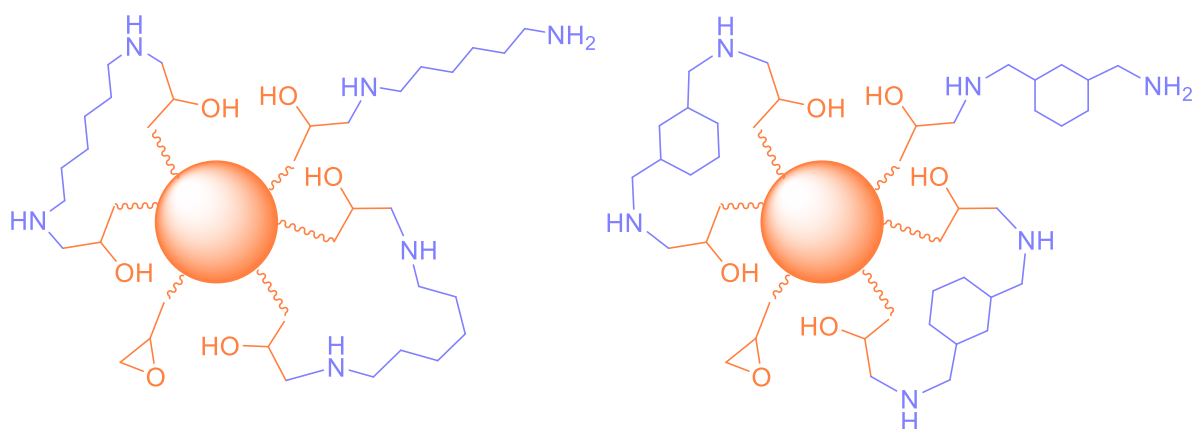
|                                                                                                   | Monoamin<br>nélkül<br>- | Benzilamin<br> | Etanolamin<br> | Allilamin<br> | Propilamin<br> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>HDA</b><br> | H                       | HB                                                                                                | HE                                                                                                 | HA                                                                                                 | HP                                                                                                  |
| <b>CHB</b><br> | C                       | CB                                                                                                | CE                                                                                                 | CA                                                                                                 | CP                                                                                                  |

Ezen kísérletek során azt tapasztaltam, hogy alig volt különbség a különböző monoaminokkal módosított hordozók között, valamint a kapott kapacitások és biokatalizátor aktivitás értékek nem sokban tértek el a felületmódosítás nélkül alkalmazott kereskedelmi hordozóval elért eredményekétől (6.4. ábra). Ez arra enged következtetni, hogy a teljes enzimkötődési folyamat inkább statisztikusan történt és elveszett a szelektivitást biztosító hatás.



**6.4. ábra:** A tesztreakciók során kapott aktivitásra jellemző értékek. Oszlopok: specifikus biokatalizátor aktivitás értékek ( $U_B$ ), pontok: aktivitás hozam értékek ( $Y_A$ ). A biszamin típusának (H,C) és monomain típusának (B,E,A,P) kódját az 6.3. táblázat tartalmazza. CV: felületmódosítás nélküli kereskedelmi hordozóval elért eredmények.

Ennek oka lehet, hogy mind a hexán-1,6-diamin, mind pedig az 1,3-ciklohexánbisz(metilamin) annyira flexibilis, hogy a konformáció változásnak köszönhetően képes mindkét aminocsoportjával elreagálni a felületi epoxicsoportokkal, így nem marad szabad aminocsoport, melyen keresztül a szelektivitást biztosító, fémiont komplexáló EDTA bevihető lenne (6.5. ábra).



**6.5. ábra:** A hexán-1,6-diamin, mind pedig az 1,3-ciklohexánbisz(metilamin) lehetséges reakciója a felületi epoxicsoportokkal.

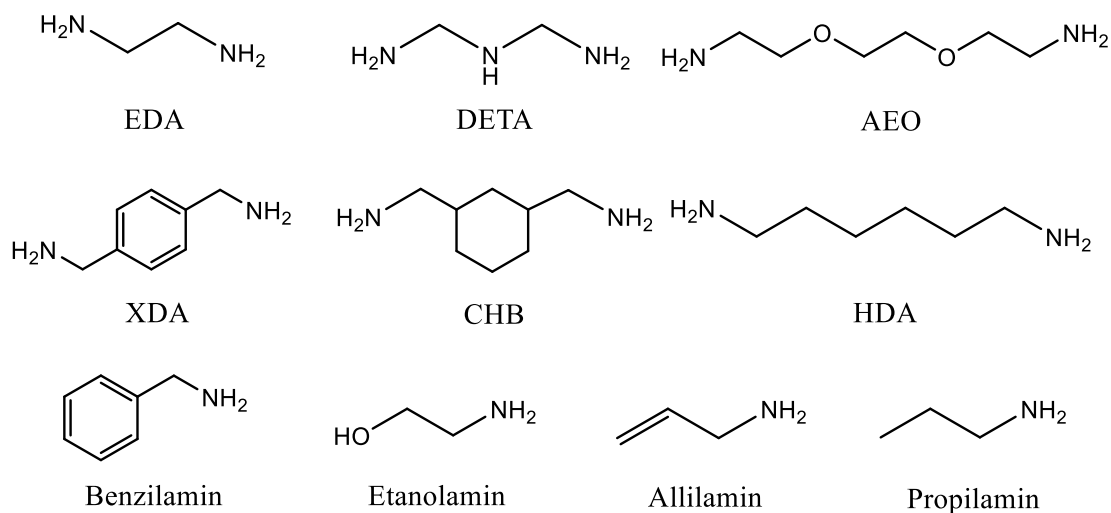
Ezt támasztja alá az is, hogy a biszamin mennyiségének a növelésével (amikor nem alkalmaztunk monoamint) nőtt a megkötött célenzim mennyisége és a biokatalizátor aktivitása is (6.4. táblázat). Ezeben az esetekben feltételezhető, hogy több szabad aminocsoport maradt, melyen keresztül az EDTA-dianhidrid képes volt a felületre kapcsolódni.

**6.4. táblázat:** A rögzített célenzim mennyisége (%) a különböző bisz- és monoamin kombinációkkal előállított hordozók esetén. Ez a kapacitás érték a felületmódosítás nélküli hordozó esetén 22%.

|     | Monoamin<br>nélkül | Benzilamin  | Etanolamin  | Allilamin   | Propilamin  |
|-----|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| HDA | 41,0 ± 6,2         | 23,3 ± 1,6  | 39,1 ± 23,0 | 24,9 ± 0,5  | 21,1 ± 19,8 |
| CHB | 37,4 ± 8,5         | 14,3 ± 11,8 | 29,1 ± 6,4  | 29,3 ± 10,0 | 20,4 ± 0,7  |

## 7. Összefoglalás

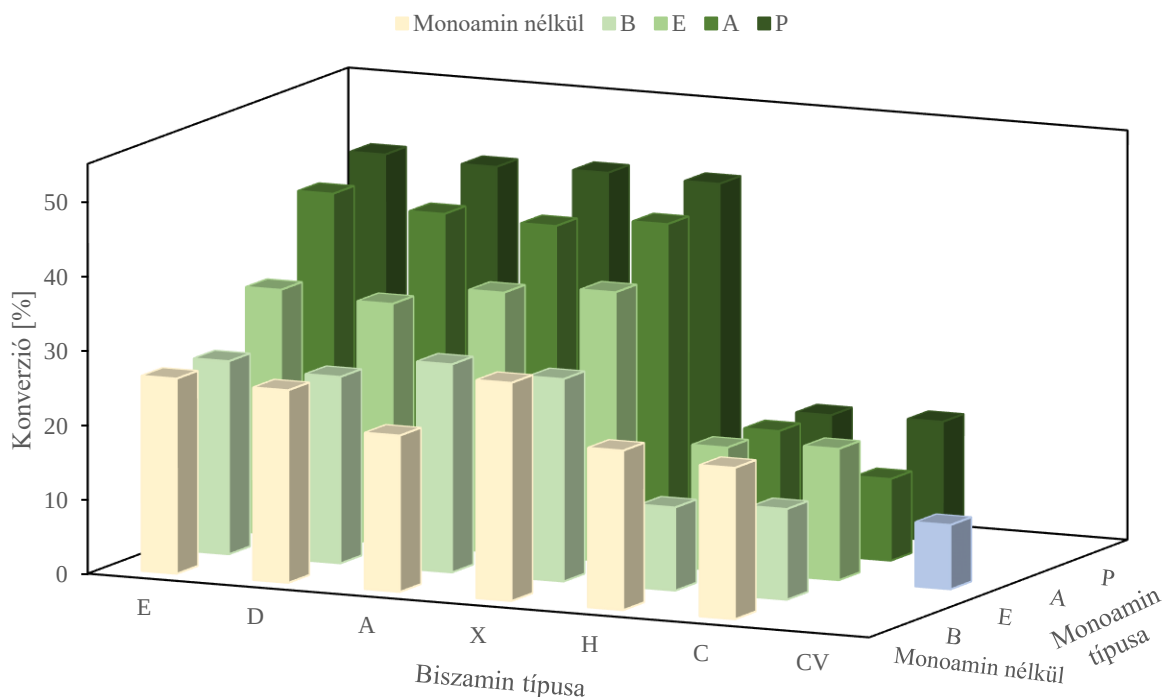
Kutatómunkám célja volt, hogy vizsgáljam a különböző típusú bisz- és monoaminok hatását a célenzim rögzülésére, illetve az elkészült biokatalizátor aktivitására egy szelektíven és kovalensen történő enzimrögzítési módszer során. Ehhez hatfajta bisz- és négyfajta monoamint alkalmaztam, melyeket minden kombinációban kipróbáltam, valamint csak biszaminokkal is elvégeztem a felületmódosítást (7.1. ábra).



7.1. ábra: Az alkalmazott bisz- és monoaminok.

Az eredményekből jól látható, hogy a monoaminnak van jelentős szerepe a célenzim rögzülésében és a megkötődés utáni aktivitásában. Különösen jó eredményeket kaptam rövid szénláncú aminok (propilamin, allilamin) alkalmazása során, melyek az enzim és a szubsztrát szempontjából kedvezően változtatták meg a hordozó felületének hidofil-hidrofób tulajdonságát. Ezzel szemben a biszamin típusa kevésbé befolyásolja a végső biokatalizátor minőségét. Ugyan a második kísérlet ezt nem támasztotta alá, de ez magyarázható a két biszamin flexibilitásával. Az első négyhez képest a HDA és CHB sokkal könnyebben visszahajolhatnak a hordozó felületéhez rögzülés után, és a rajtuk található másik aminocsoport is reagálhat egy epoxicsoporttal. Így az EDTA-dianhidrid csak kis mértékben vagy egyáltalán nem tud megkötődni, majd a fémionnal komplexet képezni. Fémkomplex hiányában az enzim csak kovalens kötést tud kialakítani a maradék epoxicsoporttal, ám mivel a szelektivitást adó tulajdonságot így elveszítjük számos más, a keverékben található egyéb, fehérje is közel tud kerülni a hordozó felszínéhez. A CHB és HDA biszaminok visszakapcsolódását erősítheti meg az is, hogy monoamin nélkül, nagyobb biszamin koncentráció alkalmazásakor magasabb

aktivitást mutatott a biokatalizátor. Ekkor már több szabad aminocsoport maradhatott, amihez tudott kötődni az EDTA-dianhidrid.



**7.2. ábra:** Az elvégzett kísérletek során kapott konverzió értékek 2 órás reakcióidő után.

A későbbiekben mindenképp elvégzek egy visszaellenőrzést annak érdekében, hogy megvizsgáljam, tényleg az a bisz- és monoamin arány az optimális, amelyet korábban a kutatócsoport megállapított a most meghatározott legjobb aminpár esetén is. Ehhez az etiléndiamin és propilamin párosítást használnám. Előbbi mellett gazdasági megfontolások állnak, hiszen a jól működő biokatalizátorok esetén a biszamin minősége nem befolyásolta jelentősen az eredményeket. Utóbbit pedig a vele elért magas aktivitás értékek miatt választottam.

Mindemellett szeretném megismételni a HDA és CHB biszaminokkal végzett kísérleteket. Így biztossá válna, hogy ezek a vegyületek valóban nem alkalmasak az ilyen típusú felületmódosításra. A továbbiakban egyéb monoaminok hatását is tervezem vizsgálni. Különösen érdekes lehet egy hosszabb szénláncú, például oktilamin alkalmazása, vagy annak meghatározása, hogy a monoamin szénláncának növekedésével hogyan változik a biokatalizátor aktivitása, meddig tart a pozitív hatás, és mekkora szénatomszám felett lesz már inkább negatív hatása egy vizes rendszerben végzett reakció esetén. Továbbá egy másik típusú enzimmel is vizsgálnám az alkalmazott bisz- és monoaminok hatását. Ezzel kiderítve, hogy ugyanazok a felületmódosítások kedveznek-e más biokatalizátorok esetében is, vagy teljesen más lesz a megfelelő.

## Irodalmi hivatkozások

- [1] Sevella Béla, *Biomérnöki Műveletek És Folyamatok*, **2011**.
- [2] E. Katchalski-Katzir, D. M. Kraemer, *J Mol Catal B Enzym* **2000**, 10, 157–176.
- [3] P. V. Iyer, L. Ananthanarayan, *Process Biochemistry* **2008**, 43, 1019–1032.
- [4] O. Barbosa, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, *Biotechnol Adv* **2015**, 33, 435–456.
- [5] Pécs Miklós, *Fermentációs Feldolgozási Műveletek*, **2011**.
- [6] C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb Technol* **2007**, 40, 1451–1463.
- [7] Dr. Bell Evelin, *Fém-Fehérje Komplex És Átmenetifém Katalizátorok Fejlesztése És Alkalmazása*, **2021**.
- [8] J. M. Guisan, F. López-Gallego, L. Betancor, C. Mateo, V. Grazu, G. Fernandez-Lorente, J. Rocha-Martin, J. M. Bolivar, K. Ovsejevi, C. Manta, F. Batista-Viera, *Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press, Totowa, NJ, **2013**.
- [9] E. Kranen, C. Detzel, T. Weber, J. Jose, *Microb Cell Fact* **2014**, 13, DOI 10.1186/1475-2859-13-19.
- [10] T. Jesionowski, J. Zdarta, B. Krajewska, *Adsorption* **2014**, 20, 801–821.
- [11] D. Weiser, F. Nagy, G. Bánóczy, M. Oláh, A. Farkas, A. Szilágyi, K. László, Á. Gellért, G. Marosi, S. Kemény, S. Kemény, L. Poppe, *Green Chemistry* **2017**, 19, 3927–3937.
- [12] C. Mateo, V. Grazu, J. M. Palomo, F. Lopez-Gallego, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Guisan, *Nat Protoc* **2007**, 2, 1022–1033.
- [13] E. Araya, P. Urrutia, O. Romero, A. Illanes, L. Wilson, *Food Chem* **2019**, 288, 102–107.
- [14] R. A. Sheldon, S. van Pelt, *Chem Soc Rev* **2013**, 42, 6223–6235.
- [15] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature* **1975**, 258, 598–599.
- [16] J. Porath, B. Olin, *Biochemistry* **1983**, 22, 1621–1630.
- [17] Y.-M. Ko, C.-I. Chen, C.-J. Shieh, Y.-C. Liu, *Biochem Eng J* **2012**, 61, 20–27.
- [18] Y.-M. Ko, C.-I. Chen, C.-C. Lin, S.-C. Kan, C.-Z. Zang, C.-W. Yeh, W.-F. Chang, C.-J. Shieh, Y.-C. Liu, *Biochem Eng J* **2013**, 79, 200–205.
- [19] G. Cao, J. Gao, L. Zhou, Z. Huang, Y. He, M. Zhu, Y. Jiang, *Biochem Eng J* **2017**, 128, 116–125.
- [20] O. Barbosa, R. Torres, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, *Biomacromolecules* **2013**, 14, 2433–2462.
- [21] C. Mateo, G. Fernández-Lorente, E. Cortés, J. L. Garcia, R. Fernández-Lafuente, J. M. Guisan, *Biotechnol Bioeng* **2001**, 76, 269–276.
- [22] C.-I. Chen, C.-W. Chen, C.-W. Huang, Y.-C. Liu, *J Memb Sci* **2007**, 298, 24–29.
- [23] C.-X. You, P.-H. Huang, S.-C. Lin, *Process Biochemistry* **2020**, 99, 179–186.
- [24] H. J. Gilbert, M. Tully, *J Bacteriol* **1982**, 150, 498–505.
- [25] H. Ritter, G. E. Schulz, *Plant Cell* **2004**, 16, 3426–3436.
- [26] A. D. Sarma, Y. Sreelakshmi, R. Sharma, *Phytochemistry* **1998**, 49, 2233–2243.
- [27] E. Logemann, M. Parniske, K. Hahlbrock, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, 92, 5905–5909.
- [28] F. C. Cochrane, L. B. Davin, N. G. Lewis, *Phytochemistry* **2004**, 65, 1557–1564.
- [29] J. Song, Z. Wang, *Mol Biol Rep* **2009**, 36, 939–952.
- [30] J. Guo, M.-H. Wang, *Mol Biol Rep* **2009**, 36, 1579–1585.
- [31] F. Xu, G. Deng, S. Cheng, W. Zhang, X. Huang, L. Li, H. Cheng, X. Rong, J. Li, *Molecules* **2012**, 17, 7810–7823.
- [32] [https://www.snapgene.com/plasmids/pet\\_and\\_duet\\_vectors\\_\(novagen\)/pET-19b](https://www.snapgene.com/plasmids/pet_and_duet_vectors_(novagen)/pET-19b)

- [33] Wunderlich Lívius, *Molekuláris Biológiai Technikák*, **2021**.
- [34] A. Gloge, J. Zoń, Á. Kövári, L. Poppe, J. Rétey, *Chemistry - A European Journal* **2000**, 6, 3386–3390.
- [35] E. Z. A. Nagy, S. D. Tork, P. A. Lang, A. Filip, F. D. Irimie, L. Poppe, M. I. Toşa, C. J. Schofield, J. Brem, C. Paizs, L. C. Bencze, *ACS Catal* **2019**, 9, 8825–8834.
- [36] S. Bartsch, U. T. Bornscheuer, *Protein Engineering, Design and Selection* **2010**, 23, 929–933.
- [37] M. Lah, M. McPheron, *Mol Genet Metab* **2021**, 133, 250–256.