

37. Országos Tudományos Diákköri Konferencia (OTDK)
KÉMIAI ÉS VEGYIPARI SEKCIÓ



Egy optimalizált immobilizálási módszer kifejlesztése a D-aminosav dehidrogenáz enzim esetében

Szerző: Iszlai András-Ernő

MSc hallgató, Nano- és Bioanyagok Kémiaja és Technológiája, másodév, Kémia és Vegyészmérnöki Kar, Babeş-Bolyai Tudományegyetem

Témavezető: Dr. Bencze László-Csaba

Egyetemi docens, Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutatóközpont, Kémia és Vegyészmérnöki Kar, Babeş-Bolyai Tudományegyetem

Konzulens: Boros Krisztina

PhD hallgató, tudományos segédmunkatárs, Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutatóközpont, Kémia és Vegyészmérnöki Kar, Babeş-Bolyai Tudományegyetem

Lezárva: 2024. május 24.

Tartalomjegyzék

1.	Elméleti bevezető	5
1.1	D-aminosavak	5
1.2.	D-aminosav dehidrogenáz (D-AADH) enzim.....	7
1.3.	Immobilizálás.....	9
1.3.1.	Általános tudnivalók	9
1.3.2.	Hordozók típusai	10
1.3.3.	Hely-specifikus immobilizálás.....	12
2.	Célkitűzések	13
3.	Anyagok és módszerek	13
3.1.	Irányított helyspecifikus mutagenézis.....	13
3.2.	Transzformálás.....	14
3.3.	Rekombináns fehérje termelése és izolálása.....	15
3.3.1.	Fehérje expresszió.....	15
3.3.2.	Ni-NTA affinitás kromatográfia	15
3.4.	Fehérjekoncentráció meghatározása	16
3.5.	Az enzimek olvadáspontjának meghatározása.....	16
3.6.	Enzimaktivitás mérése UV-Vis spektrofotometriával	17
3.6.1.	Izolált enzimek esetében	17
3.6.2.	Immobilizált enzimek esetében.....	17
3.7.	Katalitikus hatékonyság követése HPLC módszerrel	18
3.8.	Immobilizálási módszerek	19
3.8.1.	Nem-specifikus immobilizálás.....	19
3.8.2.	Hely-specifikus immobilizálás.....	21
3.8.3.	Az aktivált hordozók szubsztrát/termék elnyelése.....	23
3.8.4.	Immobilizált enzimek katalitikus hatékonyságának vizsgálata	23
3.9.	Preparatív léptékű reakció.....	23

3.9.1 Preparatív léptékű immobilizálás.....	23
3.9.2. Preparatív reakció	23
3.9.3. A termékelegy tisztítása	24
4. Eredmények és kiértékelésük.....	24
4.1. Hordozók tesztelése	24
4.2. A megfelelő távtartó kiválasztása	26
4.3. Az enzim:hordozó arány optimalizálása	27
4.4. A hely-specifikus immobilizálás.....	28
4.4.1. Irányított mutagenézis.....	29
4.4.2. Rekombináns fehérjetisztítás eredménye.....	29
4.4.3. A mutáns <i>Utd</i> -AADH enzimek olvadáspontjának meghatározása.....	30
4.4.4. A mutáns <i>Utd</i> -AADH variánsok specifikus aktivitásának meghatározása és izolált enzim reakciók vizsgálata.....	31
4.4.5. Az aktivált hordozó szubsztrát/termék adszorpciója	32
4.4.6. Az immobilizáció és határfoka	33
4.4.7. Az immobilizálás hatása a specifikus aktivitásra.....	33
4.4.8. A katalitikus hatékonyság változása az idő függvényében és az újrahasznosítás során	34
4.4.9. Az újrahasznosítás hatása a biokatalizátorok specifikus aktivitására	35
4.4.10. Az optimális biokatalizátor kiválasztása.....	36
4.5. Preparatív léptékű reakció.....	36
4.5.1. Az optimális szubsztrát:enzim arány meghatározása.....	36
4.5.2. A preparatív léptékű reakció és a biokatalizátor újrahasznosítása.....	37
5. Következtetések	39
6. Köszönetnyilvánítás	40
7. Bibliográfia	41

Tartalmi összefoglaló

Kutatómunkánk során célunk egy optimális rögzítési módszer kifejlesztése a *Utd*-AADH enzim esetében, több fajta hordozót, illetve különböző típusú, rögzítésre alkalmas kölcsönhatásokat (fizikai adszorpció, ionos kölcsönhatás vagy kovalens kötés) tesztelve. A számos kipróbált módszer közül a *Utd*-AADH enzim Purolite® ECR8415F gyantára történő kovalens rögzítése bizonyult a leghatékonyabbnak. A kapott eredményeket figyelembe véve, megpróbáltuk helyspecifikusan is immobilizálni a módosított enzimet az optimálisnak bizonyult hordozó felületére, a megfelelő távtartó molekula segítségével, alkalmazva a korábban kifejlesztett tiol-maleimid kapcsoláson alapuló módszert. A kapott biokatalizátorokat preparatív léptékű reakciókban felhasználva sikeresen állítottunk elő 200 mg enantiomertiszta D-fenilalanint 90%-os globális hozam mellett.

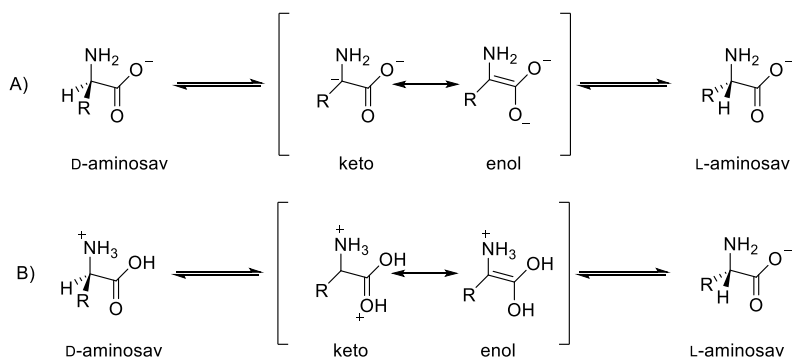
1. Elméleti bevezető

1.1 D-aminosavak

Az α -aminosavak rendelkeznek egy királis szénatommal, melynek köszönhetően esetükben fellép az enantioméria jelenléte, megkülönböztetve az L- és D-enantiomereket. Az enantiomerek szerepe és felhasználhatósága legtöbbször eltérő, például a glükóz D-izomerét a baktériumok le tudják bontani, míg az L-izomert nem [1]. Ennek következtében az ipari előállítási folyamatok egyre inkább magas enantiomertisztaságú kiindulási anyagokat igényelnek és/vagy enantiomertiszta termékek kinyerésére törekednek [2]. Jelenleg az L-enantiomerek a nagyobb érdeklődésnek örvendenek, viszont növekvő tendenciát mutat a D-sztereoizomerek ipari felhasználása is.

A L-aminosavak alapvető részét képezik az élővilág működésének, a fehérjéket felépítő 20 aminosav közül 19 L-izomer [3]. Előfordulási arányuk alsóbbrendűsége következtében a D-aminosavak háttérbe szorultak és sokkal kisebb figyelmet kaptak a múltban [4]. A biológiai homokiralitási fogalom szerint a természetes aminosavak csak L-izomerként fordulnak elő az élővilágban, ez a hipotézis viszont az analitika fejlődésével megdőlt, mivel számos eukarióta élőlényben fellelhetőek voltak különböző D-aminosavak [5]. Az utolsó pár évtizedben a tudományos közeget elkezdte foglalkoztatni ezen sztereoizomerek eredete, hogy miként fordulhatnak elő a természetben. Sokáig azt gondolták, hogy csak szennyeződés formájában vannak jelen az élő szervezetekben, azonban utólag számos fehérje szerkezetében találtak D-izomereket, megcáfolva így az említett felvetést [6].

A kutatások során több természetes folyamatot is felfedeztek, amik ezen aminosavak keletkezését idézik elő. Az egyik legfontosabb a savak és bázisok által katalizált racemizáció (**1. ábra**), mely során az optikai izomerek a keto-enol tautomerek között váltakozva alakulhatnak át tükörképükké. Az ilyen jellegű átalakulás pH-, idő- és hőmérsékletfüggő, az élővilágban főként az emésztés során adottak a körülmények a D-aminosavak kialakulására; fontos azonban megjegyezni, hogy ez egy sejten kívüli átalakulás [4].



1. ábra – A) Bázis katalizált racemizáció reakciósémája; B) Sav katalizált racemizáció reakciósémája

Beszélhetünk *in vivo* racemizációról is, mely során a D-aminosav a sejten belül, a fehérje alkotóelemeként alakul át, így például a D-aszparaginsav jelenléte kimutatható különböző szövetekben (fog, szemlencse, csont, aorta, bőr, tüdő) [6].

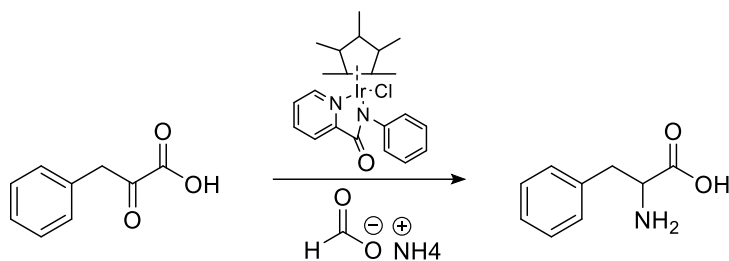
Mindemellett, a D-aminosavak fontos szerepet játszanak a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok sejtfalának felépítésében. A sejtfal peptidoglikán poliszaharid melynek hálószerkezetében a keresztkötéseket 4 aminosavból (L-alanin, D-alanin, D-glutaminsav és L-lizin vagy diaminopimelinsav) álló peptidlánc köti össze. A kémiai lízis során a lizozim ezen peptidlánc felszakításával képes a sejtfal károsítására [7, 8].

A D-aminosavak iránti növekvő érdeklődéssel egyidőben ezek ipari felhasználása is előtérbe került, napjainkban a vegyipari gyártási folyamatokban és különböző gyógyszerkészítmények előállításában van a legnagyobb szerepük. A D-alanin és L-aszpargininsav dipeptidje az Alimate mesterséges édesítőszer előállítására alkalmas, a D-fenilglicin és a D-*p*-hidroxifenilglicin félszintetikus β -laktám antibiotikumok (ampicillin, illetve amoxicillin) építő elemei, melyekből évente több mint 5000 tonnát gyártanak jelenleg [2, 9]. Emellett számos más antibiotikum előállítására használják fel őket (**1. táblázat**) [10-12]. Fontos megemlíteni, hogy a gyógyszerkészítményekben használt D-aminosavak sok esetben nem rendelkeznek a természetben előforduló L-izomerrel, emellett sokkal ellenállóbbak az enzimatis degradációval szemben, mivel a szervezetünk csak kevés olyan metabolikus utat fejlesztett ki, mely képes lebontani az ilyen típusú aminosavakat [9]. Továbbá, a D-fenilalanin prekursoraként használható a cukorbetegeknek készített Nateglinide gyógyszer készítése során [13, 14]. A mezőgazdaságban fontos szerepet játszik a D-izoleucin, mivel egy nagy keresletnek örvendő gombafaj (Foltostönkű gyűrűspereszke) növekedését segíti elő. A nyomelemanalízisben is felhasználhatóak a stabil izotópokkal jelölt D-aminosavak, például mágneses magrezonancia és Fourier transzformációs infravörös spektrometriás vizsgálatokban [15].

1. táblázat – D-aminosavat tartalmazó antibiotikumok és ezek felhasználása

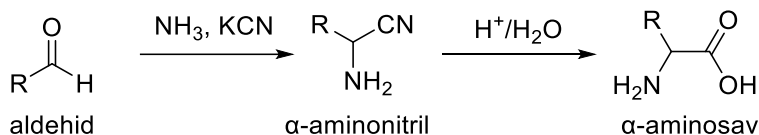
Antibiotikum	D-aminosav	Felhasználás
Daktinomicin	D-valin	Kemoterápia
Kapreomicin	D-kapreomicidin	Tuberkulózis
Polimixin	D-fenilalanin	Gram-negatív fertőzések
Daptomicin	D-alanin, D-szerin, D-aszparagin	Gram-pozitív fertőzések
Tirotricin	D-fenilalanin	Száj és garat fertőzés

A D-aminosavak előállítására számos módszert dolgoztak már ki, mint például egy irídium-komplex által katalizált redukív aminálásra alapuló módszert, mely során α -ketosavakból állítják elő az α -aminosavak racém elegyét (**2. ábra**). 37 °C-on 6 óra reakcióidő után elérhető a 68%-os hatásfok, mely nem túl magas értékű, tekintettel a katalizátor magas árára, emellett mivel racém elegy keletkezik szükséges egy újabb lépés a D-izomer izolálásához, ezáltal a leírt módszer ipari felhasználásra nem előnyös [16].



2. ábra – Az irídium komplex által katalizált redukzív aminálási reakció

Egy másik előállítási módszer a Strecker-szintézis, mely segítségével aldehideket lehet átalakítani α -aminosavakká. A folyamat két lépésben játszódik le: első lépésben az aldehidből α -aminonitrilt állítanak elő, majd második lépésben ennek hidrolíziséből kialakul az α -aminosav (3. ábra). A reakció sok lépésből tevődik össze, mindössze 40%-os hozammal rendelkezik a racém elegyre nézve és ugyancsak utómunka révén lehetséges enantiomertiszta terméket izolálni [17].



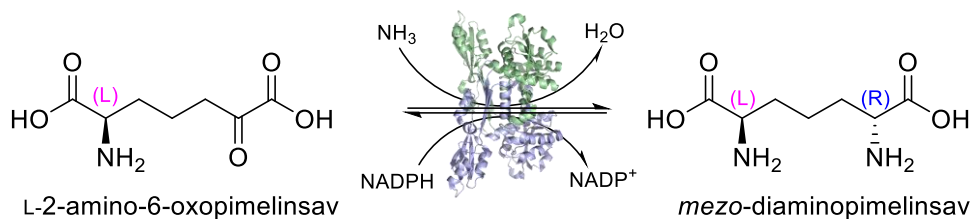
3. ábra – A Strecker-szintézis reakciósémája

1.2. D-aminosav dehidrogenáz (D-AADH) enzim

A kémiai reakciók sebességének növelésére számos katalizátor típust kifejlesztettek (mint például szerves, szervetlen katalizátorok, vagy biokatalizátorok). Az egyik fő kategóriát a biokatalizátorok képezik melyek lehetnek szabad vagy immobilizált enzimek, illetve egész sejt katalizátorok (szabad vagy immobilizált formában). Az enzimek, olyan fehérjék, melyek az élő szervezetben katalitikus funkciót töltenek be, a reakciósebesség növelését egy új reakcióút kialakításával, az aktiválási energia csökkentésével érik el. Az enzimek nagyon szelektív katalizátorok, emellett magas szubsztrát specificitással rendelkeznek. Legtöbbször csak jól meghatározott pH-n és hőmérsékleten tudják kifejteni katalitikus hatásukat, viszont ezen körülmények sok esetben könnyedén megvalósítható fiziológiai hőmérsékletet és pH-t jelentenek, valamint a kívánt katalízis általában vizes oldatban megy végbe.

A D-aminosavak előállításának számos enzimátikus módszerét ismerjük: hidantion intermediereken alapuló folyamatok [18, 19], racém elegyek rezolválása [20], transzaminálás [21]. Egy új alternatív változat az aminosav dehidrogenáz enzim által katalizált redukzív aminálás, mely során a megfelelő α -ketosav aminosavvá alakul át. Az említett enzimek felhasználása a D-aminosavak előállítására a közelmúltban korlátozott volt, tekintettel a D-izomert előnyben részesítő dehidrogenázok kisebb előfordulási arányára [22], ugyanis a jelenleg ismert 20 dehidrogenáz enzimből, mely fellelhető a természetben 19 az L-aminosavak előállítására használható fel. Az egyetlen kivétel a *mezo*-diaminopimelinsav dehidrogenáz (*mezo*-DAPDH), amely a L-2-amino-6-oxopimelinsav és a *mezo*-diaminopimelinsav reverzibilis

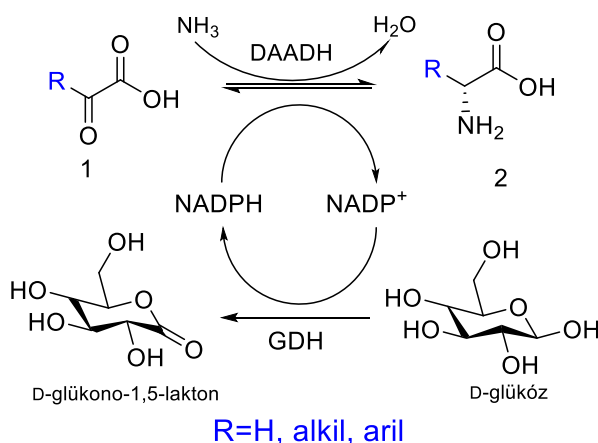
aminálását/deaminálását katalizálja (4. ábra). Mivel az enzim nagyon specifikus a *mezo*-diaminopimelinsavat tekintve, illetve a deaminálási lépés sokkal erőteljesebb, a fehérje natív formában nem felhasználható egy optimális D-aminosav előállítási módszer kidolgozására [2]. Ugyanakkor a reakció végbemeneteléhez, az enzim aktivitásához, szükséges a redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) kofaktor jelenléte.



4. ábra – A *mezo*-DAPDH enzim által katalizált aminálási/deaminálási reakció.

Annak érdekében, hogy egy megfelelő D-aminosav dehidrogenázt tudjanak előállítani, irányított evolúciós, illetve random hibát ejtő polimeráz-láncreakciós (angolul Error-prone Polymerase Chain Reaction – EP-PCR) módszerek segítségével változtatták meg a *Corynebacterium glutamicum* DAPDH szekvenciáját, ennek következtében egy nagy sztereoszelektivitású D-aminosav dehidrogenáz enzimet nyertek [9]. Az enzim szubsztrát/inhibitor megkötéséért felelős aminosavak a D-centrum esetében a 90-es és 120-as pozícióban lévő aszparaginsav, a 150-es pozícióban lévő glutamin, a 151-es pozícióban lévő glicin és a 253-as pozícióban lévő aszparagin, illetve az L-centrum esetében a 144-es pozícióban lévő triptofán, a 170-es pozícióban lévő treonin, a 196-os pozícióban lévő arginin és a 245-ös pozícióban lévő hisztidin. Ahhoz, hogy a D-sztereoszelektivitás megmaradjon, az L-centrum megkötéséért felelős aminosavak kicserélése volt szükséges [9, 14, 23]. A kapott mutáns variáns nem köti meg az L-enantiomert, ellenben képes katalizálni a ketosav D-aminosavvá történő redukatív aminálását. A kapott mutáns (BC621: Gln151Leu, Asp155Gly, Thr170Ile, Arg196Met és His245Asn) egy lépésben képes előállítani a D-aminosavat, viszont a kellő stabilitás hiányában nem ideális az ipari előállításban való implementáláshoz [22]. Ebből kifolyólag, a továbbiakban az *Ureibacillus thermosphaericus*-ból származó *mezo*-DAPDH enzim szekvenciáját is, a *CgDAPDH*-hoz hasonlóan, három szekvencia pozícióban mutálták (Thr173Ile, Arg199Met és His249Asn) létrehozva az általunk is tanulmányozott *Ureibacillus thermosphaericus* D-aminosav dehidrogenázt (*UtD*-AADH-t) [24].

Mivel a D-AADH által katalizált redukatív aminálási végbemeneteléhez szükséges a redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) kofaktor, ahhoz, hogy költséghatékony D-aminosav előállítási módszert dolgozzuk ki, a kofaktort egy másik enzim segítségével regenerálhatjuk. Esetünkben a választás a glükóz dehidrogenáz enzimre (GDH) esett, ami glükóz felhasználásával redukálja a NADP^{+} -t (5. ábra) [15, 25].



5. ábra – A D-AADH enzim által katalizált reduktív aminálás reakciósémája összekapcsolva a kofaktor regenerálással GDH enzim jelenlétében.

A D-AADH számos szubsztrátra ki volt már próbálva a szakirodalom szerint [2], dolgozatomban a továbbiakban a D-fenilalanin előállítására fogom fektetni a hangsúlyt.

1.3. Immobilizálás

1.3.1. Általános tudnivalók

Az enzim aktivitásának és szubsztráttartományának optimalizálása mellett fontos ennek stabilitására is hangsúlyt fektetni, valamint egy olyan biokatalitikus módszer kidolgozása, mely a lehető legkörülmények között a legolcsóbb egyben. Az enzimek vízben oldódó fehérjék, melynek következtében felhasználásuk utáni regenerációjuk komplikált és költséges lehet, így sok esetben egyszeri felhasználásúak, ami maga után vonja minden reakció esetén egy újabb biokatalizátor szersz hozzáadását [26]. Erre jelenthet megoldást az enzimek immobilizálása, azaz szilárd hordozóra való felvitele. A homogén katalízisből heterogén katalízisbe történő átalakítás megkönnyíti az enzim elválasztását a reakcióelegyből és annak újbóli felhasználását, ezzel egyidőben csökkenti a termék fehérje szennyezettségét [27]. Az immobilizálás sok esetben az enzim tárolási, illetve reakciós körülmények közötti stabilitásának növelésével jár és megakadályozhatja az enzim pH és hő általi denaturációját, emellett elősegítheti az enzim felhasználását szerves oldószerekben is [28].

Az enzimek immobilizációját a kialakuló kölcsönhatás függvényében két típusba sorolhatjuk: fizikai (reverzibilis) vagy kémiai (irreverzibilis) kötés. A fizikai kölcsönhatások esetén adszorpcióról beszélünk, ami létrejöhet hidrogén kötések révén, illetve ionos és Van der Waals kölcsönhatások révén is, míg a kémiai kölcsönhatás során kovalens kötés alakul ki a hordozó és az enzim között. Ezenkívül a gyakori módszerek közé tartozik az enzimek polimer hálón belüli (kovalens vagy nem kovalens kötésekkel keresztüli) bezárása (angolul entrapment), valamint az irreverzibilis térhálósítás (angolul crosslinking) is [26, 29]. A fizikailag rögzített enzim újrahasználhatósága sok esetben nagyon limitált, hiszen könnyen megtörténik a fehérje

leomosódása a hordozóról. Ami a kovalens kötődést illeti, ez sokkal stabilabb immobilizált preparátumokat eredményez, ugyanakkor a létrejött kötések merevíthetik az enzim strukturáját ezzel csökkentve az enzim aktivitását. Az irreverzibilitás miatt az enzim deaktiválódásakor a hordozó is használhatatlanná válik [26, 29].

A megfelelő hordozó kiválasztásakor több tényezőt is figyelembe kell vennünk. Az egyik legfontosabb tényező, hogy a hordozó iners komponensként viselkedve ne lépjen reakcióba sem az enzimmal, sem a reakcióelegy többi komponensével. Emellett fontos a megfelelő hidrofilitás, a jó ellenállóképesség az összennyomással, a magas hőmérséklettel és a mikróbas fertőzésekkel szemben, illetve biokompatibilitás és alacsony ár [27, 30].

1.3.2. Hordozók típusai

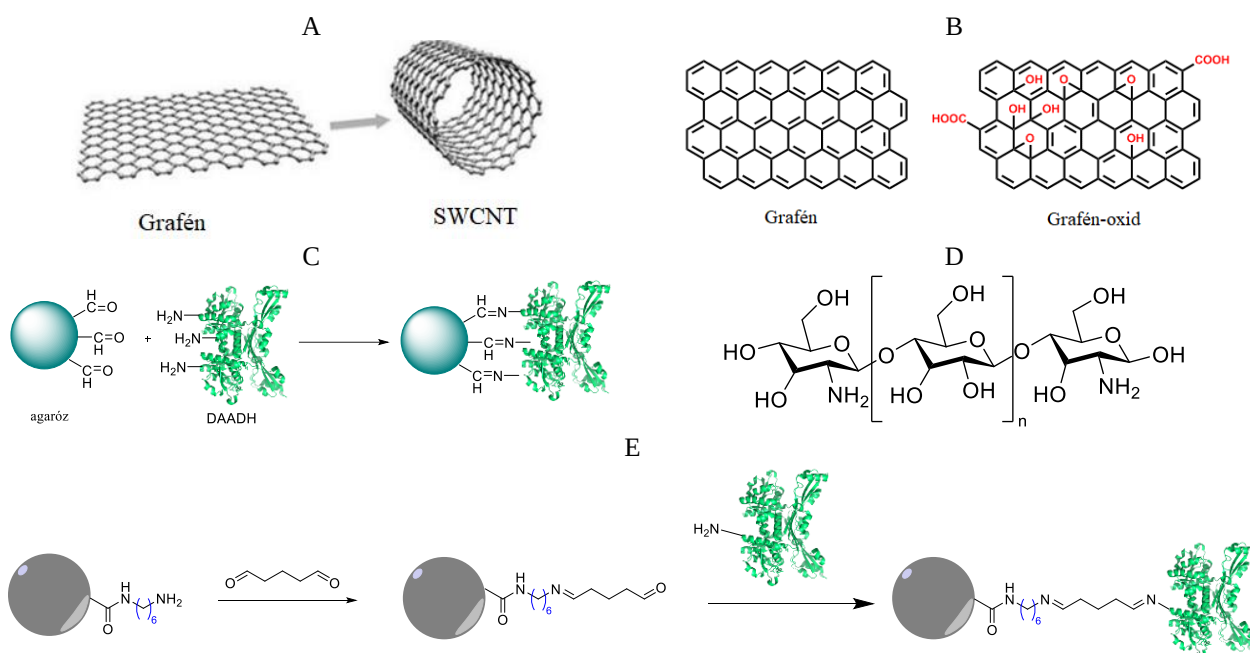
A vegyiparban fellelhető hordozók 2 fő kategóriába sorolhatóak: szerves polimerek (szintetikus és természetes) és szervetlen polimerek. Az adott hordozók különböző fizikai tulajdonságokkal rendelkeznek, amiket figyelembe kell venni az optimális vegyipari gyártási folyamat kialakításánál, mivel ezek befolyásolhatják a reaktor típusát. Ilyen tulajdonság lehet a szemcseméret és a porozitás, melyek befolyásolják a hordozó fajlagos felületét, ami pedig kapcsolatban van a felvihető enzim mennyiséggel. Ennek következtében a porózus hordozók sokkal elterjedtebbek az iparban, mivel nagyobb enzim mennyiség vihető be a reakcióba kisebb hordozómennyiség használatával. Annak ellenére, hogy a szervetlen hordozók számos előnnyel rendelkeznek (például magas fokú stabilitás fizikai, kémiai, illetve mikrobiális degradációval szemben), a legtöbb iparban is alkalmazott biokatalizátor szerves polimer hordozókra épül, mivel ezek előnyösebbnek bizonyulnak a nagyobb hidrofilitásuk miatt [30].

Továbbiakban szeretném bemutatni a dolgozat során felhasznált hordozókat és ezeknek alapvető tulajdonságait:

- Egyfalú szén nanocső (angolul single-walled carbon nanotubes - SWCNTs) – egy felcsavart egy atom vastagságú grafén réteg alkotja **(6. ábra – A)** [31]. Ezen típusú hordozók kitűnő mechanikai, szerkezeti és elektrokémiai tulajdonságokkal rendelkeznek melynek köszönhetően előszeretettel alkalmazzák őket biomakromolekulák immobilizálásához. Emellett kitűnően alkalmazhatóak mind vizes [32], mind szerves közegben [33], kereskedelemről beszerezhető $-NH_2$ vagy $-COOH$ funkciós csoporttal ellátott változatuk.
- Grafén-oxid (GO) – egy funkcionizált grafén réteg, melyre oxidáció segítségével visznek fel karboxil és hidroxil csoportokat **(6. ábra – B)**. Tulajdonságai hasonlóak a szén nanocsövek esetében tárgyaltakkal, viszont grafén esetében az előállítási költségek jóval kisebbek [34].
- Agaróz gyöngy – egy kiváló hordozó, mivel felületén nincsenek töltéssel rendelkező funkciós csoportok, ezáltal kiküszöbölhető a szubsztrát és a termék nem-specifikus kapcsolódása a hordozó

felületére. Emellett, magas porozitású, jó hidrofilitású, könnyedén funkcionálizálható, viszont használatát magas ára miatt gyakran mellőzik. Megoldást jelenthet olyan módszerek kidolgozása, melyek segítségével regenerálni lehet a hordozót az enzim deaktiválódását követően [30]. Az általunk használt glioxállal funkcionizált agaróz mikrogyöngyök az enzim felülete elhelyezkedő szabad -NH_2 csoportokkal történő Schiff-bázisok kialakítása révén rögzítik a fehérjét (6. ábra – C). Ezen folyamat nagy előnye a reverzibilitás, tehát a hordozó az enzim aktivitásának csökkenése után visszanyerhető [35]. A kialakult kötés irreverzibilissé tehető redukálószerrel segítségével.

- Kitozán – egy poliszacharid alapú (6. ábra – D) hordozó, ennek következtében magas biokompatibilitással rendelkezik. A kovalens kötés az enzim és a kitozán között könnyedén kialakítható a hordozó szabad -NH_2 csoportjain keresztül egy megfelelő távtartót (linker molekulát) alkalmazva [36].
- Purolite® ECR8415F metakrilát gyanta – Az általunk használt gyanta aminocsoporttal van funkcionizálva, melyet egy hosszú távtartóval (hexametilénnel) rögzítettek a hordozó felületére. Az enzim hozzáadása előtt glutáraldehiddel szükséges aktiválni a hordozót, hogy szabad felületi -NH_2 csoportokkal rendelkező enzimet tudjunk rá rögzíteni Schiff-bázisok kialakításával (6. ábra – E) [37].
- Mágneses nanorészecskék (MNP) – Számos pozitív tulajdonságaik között megemlítendő a magas fajlagos felületük, a jó reaktivitásuk és az elválasztás könnyedsége a reakcióelegyből. Ami a használatuk ellen szól, hogy az enzim bevonat csökkenő stabilitása következtében elveszítheti az aktivitását [38].
- HaloLink – A HaloTag™ technológia (Promega) kovalens immobilizációt biztosít egy fúziós címkén keresztül, amely a *Rhodococcus rhodocrous*-ból származó haloalkán dehalogenázt használja fel, mely a katalitikus aszparaginsavján keresztül észterkötést képez klóralkánokkal.

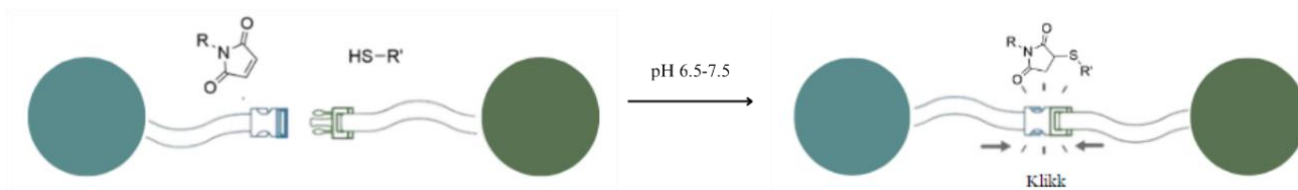


6. ábra – A) Grafén és SWCNT szerkezete [39]; B) A grafén és a grafén-oxid szerkezetének összehasonlítása; C) DAADH immobilizálásának reakciósémája glioxállal funkcionizált agaróz gyöngyökre; D) Kitozán szerkezete; E) A Purolite® ECR8415F gyantára történő kovalens immobilizálás reakciósémája

1.3.3. Hely-specifikus immobilizálás

A hely-specifikus immobilizálás lényege, hogy az enzimet nem véletlenszerűen rögzítjük a hordozó felületére, hanem előzetes lépések segítségével úgy módosítjuk az enzim felületét, hogy az csak egy adott, jól meghatározott helyen legyen képes a hordozóval való kötés kialakítására az alkalmazott módszer keretein belül. Ezen rögzítési módszer kidolgozása lényeges, hiszen a véletlenszerű immobilizálás esetében nem fektetünk hangsúlyt arra, hogy az enzimet melyik felületi pontján keresztül rögzítjük, hogy hány kötődési pont alakulhat ki az enzim és a hordozó között, viszont ezek erőteljesen befolyásolhatják az enzim működését, aktivitását.

A hely-specifikus immobilizáció során olyan kapcsolóreakciót kell választani, mely specifikusan az enzim adott pontja és a hordozó funkció csoportja között játszódik le és nagy kemoszelektivitást mutat. Fontos, hogy az adott reakció végbemenjen élettani körülmények között (semlegeshez közeli pH értékeken, szobahőmérsékleten, vizes oldatban) mivel az erős reakciókörülmények az enzim denaturálódásához vezethetnek [40]. Ilyen típusú, gyakran alkalmazott reakciók a klikk-reakciók, melyek a megfelelő oldallánccal rendelkező reagenseket pillanatok alatt, magas konverzióval és szelektivitással képesek összekötni [41]. Ilyen klikk-reakció játszódik le 6,5-7,5 pH érték között a maleimid és tiol csoportok között is (**7. ábra**), ennél magasabb pH értékek esetében viszont csökken a reakció szelektivitása és a maleimid az amino csoporttal is képes reagálni [42].



7. ábra – A maleimid-tiol klikkreakció

Ezt a reakciót felhasználva olyan enzimeket rögzíthetünk melyek rendelkeznek szabad, felületi tiolcsoporttal. Mivel a természetes aminosavak közül csak a cisztein rendelkezik tiol gyökkel, ezen aminosav jól használható kötődési pontként, lényeges viszont, hogy a hely-specifikusan immobilizálni kívánt enzim csak a kiválasztott pontokban rendelkezzen felületi ciszteinekkal [43, 44].

2. Célkritériumok

A kutatás fő célja kidolgozni egy hatékony, újrahasznosítható biokatalizátoron alapuló módszert, mely nagyban megkönnyíti az enantiomertiszta D-aminosavak előállítását költséghatékony és természetbarát módon.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Irányított helyspecifikus mutagenézis

A maleimid-tiol kapcsoláson alapuló hely-specifikus immobilizálás megvalósításához, kiválasztottunk az enzim felületén lévő szerinekből négyet, melyek ideális pozícióban, a katalitikus központtól távol, könnyen hozzáférhető felületi részen helyezkednek el, illetve kettőt a katalitikus szitus közeléből, majd ezeket pontmutáció révén ciszteinre cseréltük PCR technika segítségével, a megaprimer módszert alkalmazva.

A mutagenézishez hat különböző mutagén primert és két csendes (silent) mutáció nélküli oligonukleotidot terveztünk meg. A primerek szekvenciája és olvadáspontja az **2. táblázat**-ban található.

2. táblázat – A használt primerek szekvenciáinak és olvadáspontjainak összegzése

Primer név	Primer (5'-3')	T _m [°C]
DAADH_S2C_F	ATGATGTGCAAAATTCGCATTGGCATTGTTG	66
DAADH_S58C_F	GATGATGCCAGTGCTATAAAGATGAAATTG	63
DAADH_S92C_F	GTATTTTAATACCATTGATTGCTTTGATACCCATGC	64
DAADH_S185C_F	GAATCGCGTGCGTTGTGGTGAAAATC	65
DAADH_S192C_F	CCGGAAGTGTGTACCCGCGAAAAAC	66
DAADH_Silent_Rev	CTGGTAAACATCGGATTGCTTTCCAGATTC	64
DAADH_Silent_Fw	CCTTTTGGGGTAAAGGTGTGAGCCTG	65
DAADH_S317C_R	CAGATCTTCCGGACATTTCGGGCTC	65

A polimeráz-láncreakciókat Eppendorf Mastercycler Gradient ProS berendezéssel végeztük el. A PCR reakciók előkészítéséhez az alábbi reakcióelegy összetétel volt szükséges: 10 µL 5x Phusion Buffer, 35 µL ddH₂O, 1 µL dNTP (10 µM), 1-1 µL megaprimer (0,1 µM), ~100 µg DNS és a használt DNS-polimeráz a

Thermo Scientific oldaláról rendelt Phusion (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase) volt. Az alkalmazott protokoll a **3. táblázatban** van összegezve:

3. táblázat – A használt PCR módszer

Ismétlések száma													
1		5						25				1	
Kezdeti denaturáció		Denaturáció		Kapcsolási lépés		Kiterjesztés (megaprimer)		Kapcsolási lépés (megaprimer)		Kiterjesztés (plazmid)		Végso kiterjesztés	
T [°C]	idő	T [°C]	idő	T [°C]	idő	T [°C]	idő	T [°C]	idő	T [°C]	idő	T [°C]	idő
98	30 mp.	98	10 mp.	T _A	30 mp.	72	30 mp.	98	10 mp.	72	3,5 perc	72	10 perc

Az irányított mutagenézis eredményességét szekvenálással igazoltuk (Biomi Kft. - Gödöllő).

3.2. Transzformálás

A kapott mutáns gént kódoló plazmidokat transzformáltuk *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS sejtekbe, hősokk segítségével. A módszer lényege, hogy hirtelen és pontosan meghatározott ideig, egy adott hőmérsékletre melegítjük a kompetens sejteket és transzformálni kívánt plazmid szuszpenzióját, melynek következtében kitágul a sejtfal és ezáltal a sejt térfogata megnő, mely nyomáskülönbséggel jár (a sejten belül lecsökken a nyomás), ami egy a sejt belseje felé irányuló áramlást idéz elő, lehetővé téve a plazmid számára a beáramlást [45]. A hősokk után fontos a sejt visszahűtése, hogy a sejtfal összeszűküljön és a pórusai visszazáródjanak. Alapvetően 4 lépést különböztetünk meg: a sejtek kiolvasztása (5-10 perc), inkubálás (20 perc), hősokk (45 másodperc), inkubálás (1 óra).

A sejtek kiolvasztását követően egy 1,5 mL-es Eppendorf csőben 100 µL gázdasejtet 3 µL plazmiddal szuszpendáltunk fel, majd ezt 20 percen keresztül inkubáltuk jégen. A hősokk 42 °C-on 45 másodpercig tartott, majd 2 percig újra jégre helyeztük az elegyünket. A transzformált sejtekhez 900 µL Luria-Bertani (LB) tápoldatot adtunk majd 1 órán át inkubáltuk 37 °C-on.

Petri csészébe öntött LB agar lemezen oszlattuk el a kapott transzformált baktériumokat. A lemez 50 µg/ml karbenicillint és 34 µg/ml klóramfenikolt tartalmazott. A jól eloszlott sejt kultúrát tartalmazó lemezeket 37 °C-on 18 órán keresztül inkubáltuk.

A növesztett kolóniák esetében szükséges volt vizsgálni a rekombináns plazmid jelenlétét, ezért kiválasztottunk jól elkülöníthető kolóniákat, melyeket kolónia-PCR (cPCR) segítségével vizsgáltunk. Az LB-agar lemezen növekedett kolóniákból vett mintákat DNS-templátként használtuk és 20 µL végtérfogatú kolónia-PCR keverékbe kevertünk. A keveréket a Thermo Scientific DreamTaq Green PCR Master Mix protokollja alapján készítettük el. A DreamTaq Green PCR Master Mix felhasználásra kész oldat, amely DreamTaq DNS polimerázt, optimalizált DreamTaq puffert, MgCl₂-t és dNTP-t tartalmaz. A különböző plazmidok jelenlétére a megfelelő univerzális primerek (T7 promóter és T7 terminátor) használtuk a PCR-elegyben.

3.3. Rekombináns fehérje termelése és izolálása

3.3.1. Fehérje expresszió

A pozitív kolóniák azonosítása után kiválasztottunk egyet, amellyel beoltottuk az 50 mL, karbenicillint és klóramfenikolt tartalmazó LB tápoldatot. Ezt 18 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on 200 rpm-es rázogatás mellett. Másnap 600 mL LB oldatba 6 mL-t áttoltottunk az előkultúrából. A kultúrát 37 °C-on 200 rpm-en inkubáltuk és időközönként vizsgáltuk 600 nm-en a sejtszámot egy spektrométer segítségével. Amikor az abszorbancia (OD_{600}) elérte a 0,6-0,8 közötti értéket, indukáltuk a sejt kultúrát 0,5 mM izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranoziddal (IPTG) majd tovább inkubáltuk 25 °C-on és 180 rpm-es rázogatás mellett 16-18 órán keresztül. Annak érdekében, hogy a felesleges táptalajtól megszabaduljunk a kultúrát 4 °C-on 6000 rpm-en centrifugáltuk. A lerakodott sejteket 20 mL lízispufferrel (20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 8) reszuszpendáltunk. A megfelelő sejtfeltárás (lízis) érdekében kémiai és mechanikai lízist is alkalmaztunk. A kémiai lízis lizozim segítségével valósult meg, míg a mechanikai lízist French press segítségével végeztük el, figyelve arra, hogy a lizátum ne melegedjen túl. Ezt követően lecentrifugáltuk (4 °C-on 10000 rpm-en) a lizátumot, hogy megszabaduljunk a különböző sejtmaradványoktól.

3.3.2. Ni-NTA affinitás kromatográfia

A rekombináns fehérje izolálásához Ni-NTA (nikkel-nitrilotriecetsav) immobilizált fém ion affinitás kromatográfias módszert alkalmazunk mely lényege, hogy az immobilizált fém, esetünkben a nikkel, koordinatív kötést tud kialakítani a rekombináns fehérje His-címkéjével (6-10 egymás után kapcsolódó hisztidin aminosav) az imidazol gyűrűn keresztül.

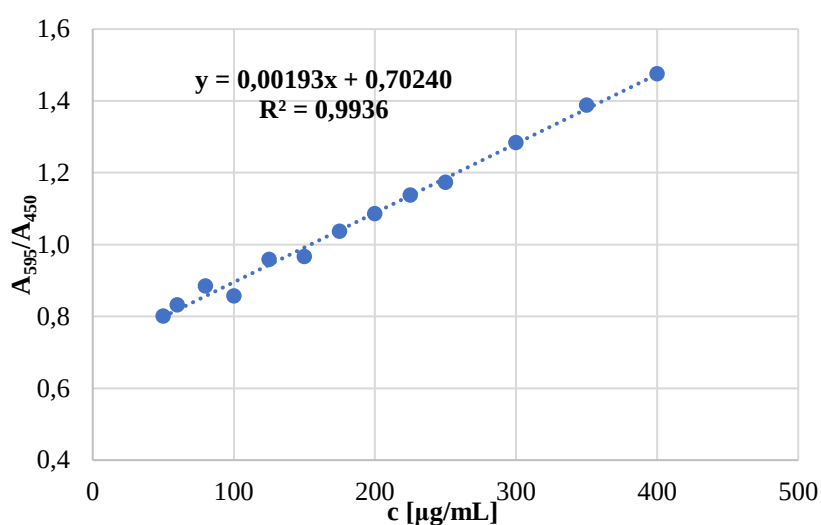
A lecentrifugált, lizátumot kétszer átvezetjük a Ni-NTA-agaróz gyantát tartalmazó oszlopon, hogy az általunk elválasztani kívánt fehérje meg tudjon kötődni rajta. A következő lépésekben különböző sóoldatokkal mossuk az oszlopot annak érdekében, hogy a nem specifikusan megkötődött fehérjéket és egyéb szennyeződések lemosunk. Erre két sóoldatot használunk: alacsonyabb só koncentrációjú (50 mM HEPES, 30 mM KCl, pH 7,5) és magas só koncentrációjú (50 mM HEPES, 300 mM KCl, pH 7,5) oldatot. Ezt követően 25 és 50 mM-os imidazol oldattal szabadultunk meg a nem specifikusan megkötött fehérjéktől. Ezt követően 250 mM-os imidazol oldattal eluáltuk a rekombináns fehérjénket. Bradford reagenssel figyeltük a mosási és elúciós lépések végbemenetelét. Minden frakcióból mely átment az oszlopon mintát vettünk és nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid-gélelektroforézis (SDS-PAGE) révén vizsgáltuk a fehérjetisztítás hatékonyságát.

Az eluált enzim frakciót dialízis zsákocskába helyeztük, majd egy éjszakán keresztül 5 L dialízis pufferben (20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 8) sómentesítettük (főként az imidazoltól való elválasztás

céljából). Ezt követően a kapott fehérje oldatot koncentráltuk, majd fehérjekoncentrációt mértünk a Bradford módszert alkalmazva.

3.4. Fehérjekoncentráció meghatározása

A fehérjekoncentráció meghatározásához Agilent UV-Vis spektrométert alkalmaztunk. A berendezés 450 és 595 nm-en vizsgálja a minták fényelnyelését. A mérésekhez egy előre kidolgozott Bradford-módszert használtunk, melynek kalibrációs görbét (8. ábra) 100 mM és 400 mM között szerkesztették meg. A görbe pontjai az 595 és a 450 nm-es abszorbanancia arányok az adott koncentrációk függvényében. Egy UV-Vis mérésre alkalmas műanyag küvettába 1 mL Bradford oldatot tettünk, majd 20 μ L mintát mértünk bele és mérés előtt 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A vakmintának desztillált vizet használtunk.



8. ábra – A Bradford-módszer kalibrációs görbéje

3.5. Az enzimek olvadáspontjának meghatározása

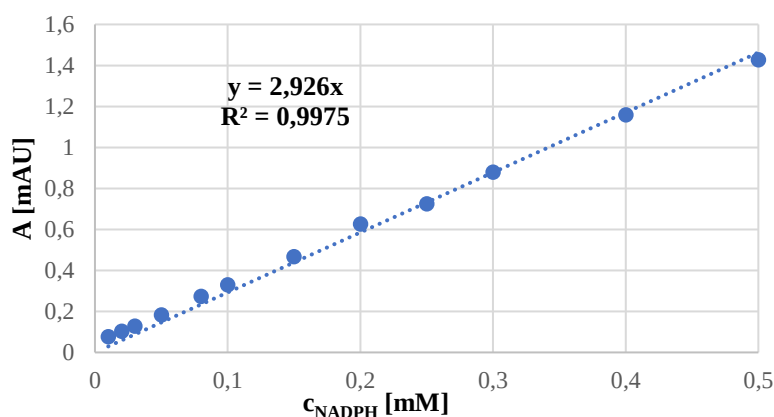
Az *Utd*-AADH mutánsok olvadáspontját BioRad CFX96 Real-Time Thermal Cycler berendezés segítségével határoztuk meg, differenciális pásztázó fluorimetria (termofluorimetria) módszert alkalmazva. A minta a következő komponenseket tartalmazta: 45 μ L *Utd*-AADH mutáns enzim (10 μ M) 50 mM-os HEPES oldatba (pH 9), valamint 5 μ L festékanyag (SYPRO Orange Protein Gel Stain, Thermo Fisher Scientific, 200×-es hígításban). A kapott mintákat áthelyeztük egy BioRad kemény fehér vázú 96 áttetsző lyukú mikrolemezbe (White-Clear-Hard Shell 96-well PCR optical plate). A vakminta 45 μ L 50 mM-os HEPES (pH 9) oldatból, valamint a festékanyagból tevődött össze. A mintatartót egy optikailag tiszta Microseal® B szigetelő fóliával zártuk le. Az olvadási görbék meghatározásához a FAM és ROX szűrőket használtuk a Bio-Rad CFX96 rendszerben, ahol az extinkciós hullámhossz 450-490 nm és 560-590 nm volt, valamint az emissziós filter 510-530 nm és 610-650 nm hullámhosszra volt beállítva. A méréseket 20-95 °C-os hőmérséklettartományon végeztük el, 1 °C-os növekedéssel. Az olvadáspont meghatározásához a

fluoreszcencia emisszió első rendű deriváltját ábrázoltuk a hőmérséklet függvényében ($-dRFU/dT$). A méréseket elvégeztük a reakció pufferben is (200 mM NH_4Cl és 100 mM NaHCO_3 , pH 9), annak érdekében, hogy vizsgáljuk az enzim stabilitását a reakciókörülmények között.

3.6. Enzimaktivitás mérése UV-Vis spektrofotometriával

3.6.1. Izolált enzimek esetében

Ahhoz, hogy megfelelő módszert dolgozzunk ki az enzim aktivitásának méréséhez elsősorban vizsgálnunk kellett a reakcióelegy komponenseinek fényelnyelését, annak érdekében, hogy meghatározzuk milyen hullámhosszon és melyik komponens fényelnyelése a legnagyobb és legizoláltabb. Esetünkben a redukált kofaktor (NADPH) 340 nm-en történő elnyelése bizonyult a legideálisabbnak, így ennek fogyását monitorizáltuk a D-AADH által katalizált reduktív aminálás során. Az eredmények kiértékeléséhez szükséges volt készíteni egy kalibrációs görbét (**9. ábra**) 0,01-0,5 mM NADPH koncentrációk között, mely segítségével meghatározható a moláris abszorpciós tényező és az optikai úthossz szorzata ($\varepsilon \cdot l = 2,926 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Ennek ismeretében kiszámítható az enzimatis reakció kezdeti sebessége, illetve a specifikus enzimaktivitás. A méréseket TECAN Spark M10 spektrométer segítségével hajtottuk végre, Corning mintatartót alkalmazva. A 200 μL végtérfogatú reakcióelegy a következőket tartalmazta: 2 mM PPA, 0,1 mM NADPH és 5 μg enzim a reakció pufferben (200 mM NH_4Cl és 100 mM NaHCO_3 , pH 9) feloldva. A mérést 35 °C-on 15 percen keresztül végeztük. Minden vizsgált minta esetében három példányban végeztük el a mérést.



9. ábra – Az NADPH kalibrációs görbéje

3.6.2. Immobilizált enzimek esetében

A méréseket hasonlóképpen végeztük el, viszont a közvetlen nyomon követés nem volt lehetséges a heterogén reakcióelegy miatt. Ezért az immobilizált biokatalizátorok specifikus aktivitásának meghatározásához, jól meghatározott időpillanatokban (1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16 perc) 50 μL mintát vettünk a reakcióelegyből, hígítottuk 200 μL végtérfogatig a reakció pufferrel, majd az egyenkénti minták

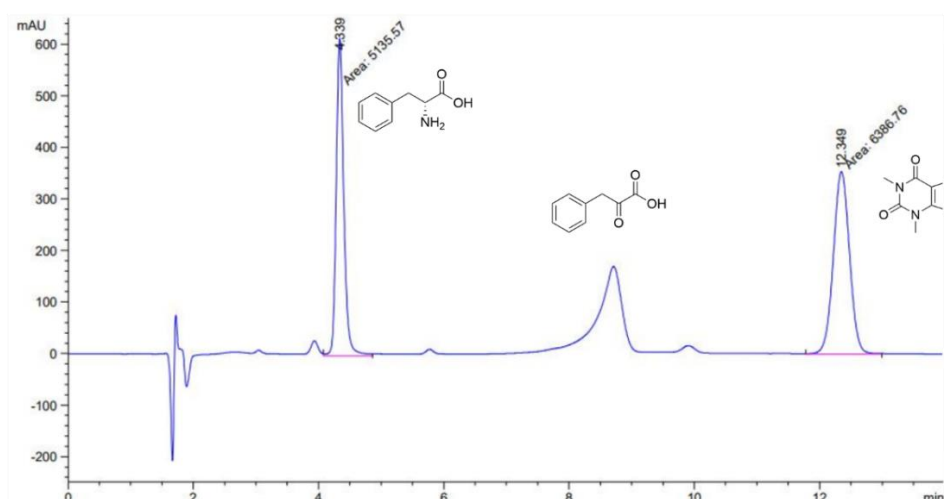
abszorbanciáját lemértük 35 °C-on, 340 nm-es hullámhosszon. A 1 mL végtérfigatú reakcióelegy a következőket tartalmazta: 2 mM PPA, 0,2 mM NADPH és 25 µg enzim (megfelelő mennyiségű hordozón) a reakció pufferben (200 mM NH₄Cl és 100 mM NaHCO₃, pH 9) feloldva. A kapott eredményeket ábrázoltuk és ugyanúgy, mint az izolált enzimek esetében kiszámoltuk a biokatalizátorok specifikus aktivitását.

3.7. Katalitikus hatékonyság követése HPLC módszerrel

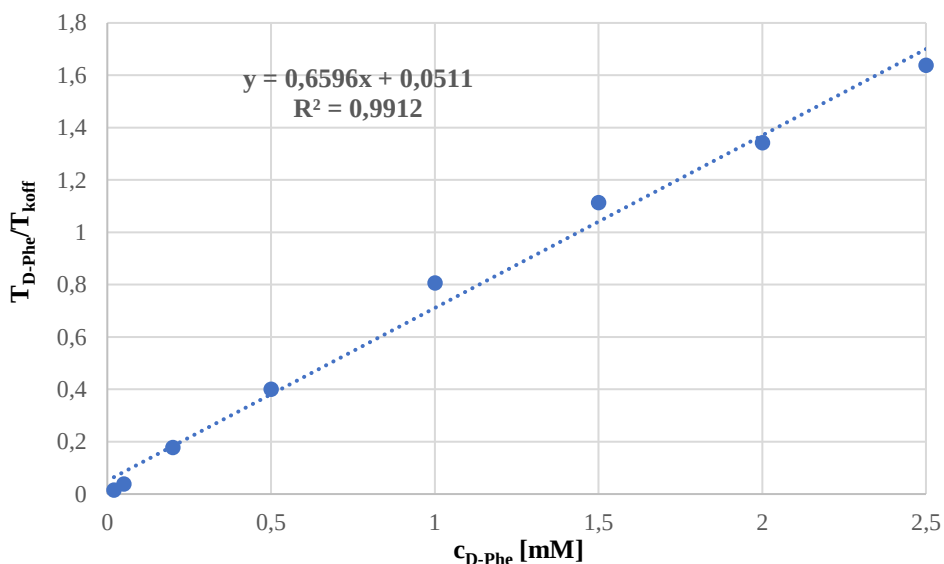
A biokatalizátorok katalitikus hatékonyságát a redukzív aminálási reakcióban teszteltük, a kapott reakció terméket fordított fázisú HPLC segítségével, egy Agilent 1200 HPLC berendezést alkalmazva vizsgáltuk. A konverzió meghatározásához egy belső standardon alapuló módszert használtunk. A mintát 100 µL reakcióelegy és 100 µL 0,2%-os koffein (belső standard) oldat összekeverésével és leszűrésével készítettük elő. A mérésekhez Phenomenex Luna C8 (2) oszlopot (150x4,6 mm; 5 µm) használtunk. A mérés 35 °C-on zajlott, az izokratikus mozgófázis 15% metanolt (A) és 85% 0,1 M-os ammónia oldatot (B) tartalmazott és 1 mL/perc hozammal áramolt az oszlopban. Mivel a fenil-piruvát fény hatására bomlik, ennek következtében nem alkalmas a reakció nyomon követésére. A D-fenilalanin keletkezésének mennyisége viszont mérhető 210 nm-es hullámhosszon a koffein jelenléte esetében. Minden mintát két példányban mértünk le. A használt metódus adatait a **4. táblázat**-ban összegeztem, a kromatogramot a **10. ábra** szemlélteti, míg az alkalmazott kalibrációs görbét a **11. ábra** mutatja be.

4. táblázat – A D-Phe és koffein elválasztására alkalmazott HPLC metódus

Szubsztrát	Retenciósi idő [perc]			Relatív válaszfactor (R _f)	Hullámhossz [nm]
	D-Phe	PPA	koffein		
PPA	4,3	7,7	12,4	0,66	210



10. ábra – A D-Phe, PPA és koffein elválasztása esetében kapott HPLC kromatogram, 1:1 (D-Phe:koffein) mólarány esetében.



11. ábra – A HPLC metódus kalibrációs görbéje

3.8. Immobilizálási módszerek

Az alább felsorolt mindegyik immobilizációs eljárás végén az enzim lemosódását spektrofotométer segítségével vizsgáltuk, fehérje koncentráció meghatározása révén a reakcióelegyben és a mosásokban.

3.8.1. Nem-specifikus immobilizálás

3.8.1.1. Kovalens immobilizálás amino-funkcionalizált SWCNT-re

10 mg amino-funkcionalizált SWCNT-t reszuszpendáltunk 3 mL diklórmétán és 20 μ L (1,2 mmol) glicerín-diglicidil-éter (GDE) oldatában. A szupszenziót szobahőmérsékleten, 1350 rpm-en 16 órán keresztül rázogattuk, majd membránszűrő (0,22 μ m) segítségével elválasztottuk a hordozót az elegytől és 3x400 μ L diklórmétánnal mostuk. A kapott előkezelt hordozót 3 mL HEPES pufferben (50 mM, 7,5 pH) szuszpendáltuk 1 mg *Utd*-AADH enzim hozzáadásával. A kapott elegyet szobahőmérsékleten, 1350 rpm-en 16 órán keresztül rázogattuk, majd szűrtük és 3x5 mL desztillált vízzel mostuk az immobilizált enzimet.

3.8.1.2. Kovalens immobilizálás karboxil-funkcionalizált SWCNT-re

10 mg karboxil-funkcionalizált SWCNT-t előkezeltünk 16,2 mg (0,2 mmol) N,N'-karbonil-diimidazollal (CDI) a karboxil csoport aktiválása érdekében. A jobb előkezelés érdekében időközönként ultrahangos fürdőbe helyeztük az elegyet. A kapott preparátumot szűrtük és diklórmétánnal mostuk, majd 5 mL desztillált vízben szuszpendáltuk, melyhez hozzáadtunk 1,3-diaminopropánt (0,12 mmol) és szobahőmérsékleten, 1350 rpm-en 16 órán keresztül rázogattuk. A következő napon a hordozót membránszűrővel elválasztottuk, mostuk desztillált vízzel és megszáritottuk. Ezt követően, hasonló módon, mint az NH_2 -funkcionalizált SWCNT esetén, GDE segítségével vittük fel az enzimet a nanocsövekre.

3.8.1.3. Kovalens immobilizálás grafén-oxidra

A grafén-oxid szerkezetében található szabad karboxilcsoportoknak köszönhetően az immobilizálást ugyanazon módszerrel végeztük el, melyet a COOH-funkcionális SWCNT esetében is használtunk.

3.8.1.4. Kovalens koimmobilizálás agaróz mikrogöngyökre

Az első enzim NaHCO_3 pufferben (100 mM, pH 10) hígított oldatát 10:1 térfogatarányban összekevertük nagy sűrűségű glioxállal funkcionizált 6BCL agaróz göngyökökkel, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk 2 órán keresztül orbitális rázogatás mellett. A szűrést követően polietilén-imin (PEI) (10 mg/mL) polimer bevonatot vittünk fel a hordozóra 1:10 tömeg:térfogat arányban ugyancsak a NaHCO_3 puffert (100 mM, pH 10) használva. A szuszpenzió szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül volt inkubálva. Ezt követően a keletkezett Schiff-bázisok redukálása céljából az elegyhez 1 mg/mL nátrium-borohidridet adtunk, majd fél órán át állni hagytuk 4 °C-on, így irreverzibilissé téve a C-N kötéseket. Ezt követően a preparátumot leszűrtük és 5×10 térfogategységnyi nátrium-foszfát pufferrel (10 mM Na_3PO_4 , pH 7) mostuk.

A második enzim 10 térfogategységnyi oldatát feloldottuk a foszfát pufferben (10 mM Na_3PO_4 , pH 7), majd ionos adszorpció révén immobilizáltuk a PEI-ágyra. Az elegyet 1 órán át szobahőmérsékleten rázogattuk. A szűrés után kapott koimmobilizátumot további 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten 10 térfogategységnyi 1,4-butándiol-diglicidil-éterrel (BDE – 30 mM, pH 7), annak érdekében, hogy a második enzim kovalens keresztkötések kialakításával rögzítve legyen a PEI-ágyhoz. Végezetül a szuszpenziót leszűrtük, és 2×5 térfogategységnyi foszfát pufferrel (10 mM Na_3PO_4 , pH 7) mostuk.

3.8.1.5. Kovalens immobilizálás kitozánra

A kitozánban megtalálható szabad aminocsoportoknak köszönhetően az immobilizálást ugyanazon módszerrel végeztük el, melyet az amino-funkcionális SWCNT esetében is használtunk.

3.8.1.6. Immobilizálás Purolite® ECR8415F metakrilát gyantára

A kovalens immobilizáció első lépésében a gyanta előkezelését végeztük el, 1 g hordozót 4-szer 1:2 tömeg:térfogat arányban (2 mL) HEPES (50 mM, 7,5 pH) pufferrel mostuk. Frissen készített 1%-os glutáraldehid (vagy biszfenol-A-diglicidil-éter, neopentil-diglicidil-éter, 1,4-butándiol-diglicidil-éter, glicerín-diglicidil-éter, poli(etilén-glikol)-diglicidil-éter, poli(dimetilsziloxán)-diglicidil-éter, lásd 19. ábra) oldatot adtunk 1:4 tömeg:térfogat arányban (4 mL) a hordozóhoz és a szuszpenziót szobahőmérsékleten 1 órán át rázogattuk 500 rpm-en. Ezt követően szűrtük és 4-szer 1:4 tömeg:térfogat arányban (4 mL) HEPES (50 mM, 7,5 pH) pufferrel mostuk. Ezután 2 (vagy 2,5; 5; 10; 50; 75; 100; 250; 500) mg enzimet tartalmazó HEPES (50 mM, 7,5 pH) puffert adtunk a hordozóhoz 1:4 tömeg:térfogat arányban (4 mL), majd az elegyet szobahőmérsékleten rázogattuk 500 rpm-en 16 órán keresztül. Ezután a preparátumot leszűrtük, majd

mostuk sómentes (50 mM HEPES, 7,5 pH) és magas sótartalmú (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 7,5 pH) pufferrel 1:2-es tömeg:térfogat arányban annak érdekében, hogy eltávolítsuk a nem-specifikusan (ionosan) megkötődött fehérjéket. Végezetül ismét mostuk a sómentes HEPES (50 mM, 7,5 pH) pufferrel.

Az adszorpciós rögzítés során ugyanúgy elvégeztük a hordozó előkezelését, majd a kötőkomponens felvitele nélkül a hígított enzimet a hordozóra pipettáztuk, hasonlóan, mint a kovalens immobilizálás esetében, majd ugyanazon oldatokkal mostuk a biokatalizátort.

3.8.1.7. Kovalens immobilizálás mágneses nanorészecskékre

0,5 g vas(II)-kloridot (FeCl_2) és 1,23 g vas(III)-kloridot (FeCl_3) feloldottunk 5 mL vízben. A kapott oldatot csepegtetve 20 mL 1 M-os NaOH oldathoz adagoltuk argon alatt. A kapott fekete csapadékot még további fél órán keresztül reagálni hagytuk, majd többször mostuk vízzel és éjszakán át liofilizáltuk. Ahhoz, hogy funkcionálizáljuk a magnetitet 189 mg 95%-os 3-aminopropil-trimetoxi-szilánt (APTES) feloldottunk 10 mL víz:etanol 1:1 térfogatarányú elegyében, majd ehhez 40 mg Fe_3O_4 -t adtunk. A szuszpenziót 1 órán keresztül argon atmoszférán kevertettük. Az aktivált hordozót mostuk 10 mL etanollal és 3×10 mL vízzel. Ezt követően 3 mL etanolban szuszpendáltuk és hozzáadtunk 176 μL GDE-t (4 ekv.). Ezt szűrtük, majd az eddigi GDE linkerén keresztül történő immobilizálásokhoz hasonlóan vittük fel az enzimet a hordozóra.

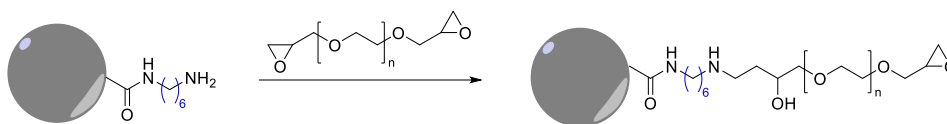
3.8.1.8. Halolinkes immobilizálás

300 μL HaloLinkTM gyanta szuszpenzióját egy 2 mL-es Eppendorf csőbe helyeztük. Annak érdekében, hogy megszabaduljunk az etanoltól, a gyantát $3 \times 1,5$ mL kapcsolópufferrel (100 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7,6) mostuk. A mosások között 1 percen keresztül 1000 rpm-en centrifugáltuk a szuszpenziót. A végső mosást követően a hordozót 300 μL kapcsolópuffer és 250 μL fúziós-enzim (0,5 mg) elegyében szuszpendáltuk fel, majd ezt szobahőmérsékleten, 1000 rpm-en 16 órán keresztül rázogattuk. Másnap a hordozó szűrése után mostuk $2 \times 1,5$ mL kapcsolópufferrel.

3.8.2. Hely-specifikus immobilizálás

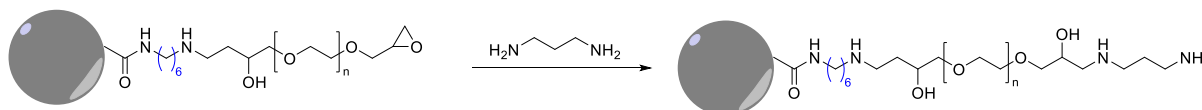
Az enzimek hely-specifikus immobilizálásához Purolite[®] ECR8415F metilakrilát gyantát használtunk hordozóként. Az enzimek rögzítése a maleimid és tiolcsoport között lejátszódó klikkreakció segítségével valósul meg, melyhez maleimid gyököt tartalmazó linkerrel kellett előkezelní a hordozót.

Első lépésben, a 3.8.1.6 alfejezetben leírtak alapján 2 g Purolite-ot bevontunk poli(etilén-glikol)-diglicidil-éterrel (PEG – CAS: 72207-80-8) (**12. ábra**), majd mostuk 4-szer 1:4 térfogatarányú (8 mL) HEPES (50 mM, 7,5 pH) pufferrel.



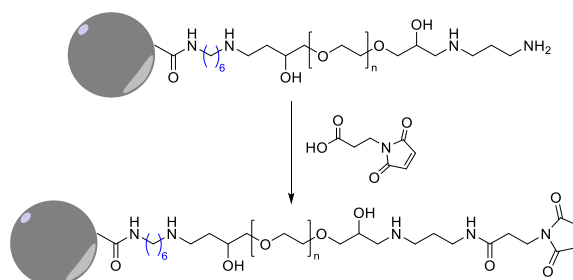
12. ábra – A hordozó PEG-gel történő aktiválásának reakciósémája

A második lépésben felületi szabad aminocsoportokat vittünk fel a hordozó felületére 9 mL 50 μ L 1,3-diaminopropánt tartalmazó elegy segítségével. A 4 órán keresztül, szobahőmérsékleten, 300 rpm-en történő inkubálást követően, a preparátumot 4-szer 1:4 térfogatarányú (8 mL) HEPES (50 mM, 7,5 pH) pufferrel mostuk.



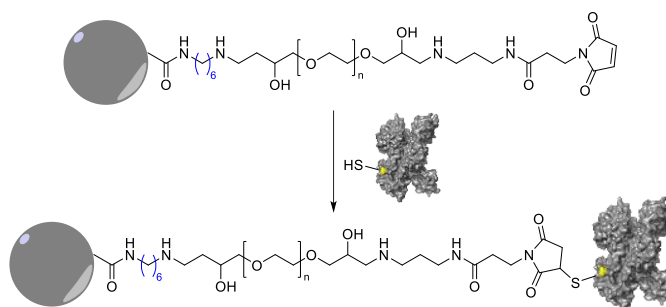
13. ábra – A hordozó 1,3-diaminopropánnal történő bevonásának reakciósémája

A maleimid felviteléhez 30 mL DMF-ben feloldottunk 70 mM *N*-hidroxi-szukcinimidet (NHS), 30 mM maleimidet és 150 mM *N*-(3-dimetil-amino-propil)-*N*-etil-karbodiimid hidrokloridot (EDAC). Az elegyet felvittük a hordozóra és egy órát rázogattuk 300 rpm-en, orbitális/vibrációs keverőplatformot használva. Ezt követően mostuk 30 mL acetonitrillel, majd 2-szer 30 mL HEPES (50 mM, 7,5 pH) pufferrel.



14. ábra – A maleimid hordozóra történő felvitelének reakciósémája

A hordozó előkezelését követően az enzimekből 1 mg-ot vittünk fel 200 mg hordozóra, majd 4 órán keresztül kevertettük 300 rpm-en. Ezután centrifugáltuk, a felülúszóból mintát vettünk (amiben meghatároztuk a fehérje koncentrációt), majd 3-szor mostuk 3 mL HEPES (50 mM, 7,5 pH) pufferrel. Minden mosásból mintát vettünk és lemértük az enzim koncentrációt, hogy megtudjuk mekkora volt a rögzítés hatásfoka.



15. ábra – Az enzim klikkreakció révén történő hordozóra való hely-specifikus rögzítésének reakciósémája

3.8.3. Az aktivált hordozók szubsztát/termék elnyelése

50 mg hordozót inkubáltunk szubsztát/termék oldattal 18 órán keresztül. A mintavétel után a hordozókat 3-szor mostuk 250 μ L reakció pufferrel (200 mM NH_4Cl , 100 mM Na_2CO_3 , 9 pH). Minden mosás esetében mintát vettünk és azoknak is lemértük a szubsztát és termék koncentrációját HPLC segítségével. Minden mintát két példányban mértünk le.

3.8.4. Immobilizált enzimek katalitikus hatékonyságának vizsgálata

A következő 1 mL végtérfogatú reakcióelegyet állítottuk össze az immobilizált enzimek aktivitásának vizsgálatára: 5 mM fenil-piruvinsav, 0,1 mM NADP^+ , 100 mM D-glükóz, 10 μ g izolált GDH enzim, 10 mg D-AADH (immobilizált) a reakció pufferben (200 mM NH_4Cl és 100 mM NaHCO_3 , pH 9) feloldva. Minden mintát két példányban mértünk le.

A konverzió reakcióidő függvényében történő előrehaladásának vizsgálata során az immobilizált enzimekkel elvégzett első reakciókból különböző reakcióidők elteltével (2-4-6-18 óra) mintát vettünk és HPLC segítségével vizsgáltuk azokat.

Az újrafelhasználhatóság követése során az immobilizált enzimeket több egymást követő reakcióciklusban használtuk fel, figyelve a konverzió változását az adott ciklusokban. Minden reakcióból 6 (vagy 18) óra elteltével vettünk mintát. A megmaradt reakcióelegyet leszívtuk a hordozóról, majd a biokatalizátort 2-szer 500 μ L HEPES (50 mM, 7,5 pH) pufferrel mostuk. A következő reakcióciklusban történő felhasználás előtt még 1-szer átmostuk 500 μ L reakció pufferrel. Minden mintát két példányban mértünk le.

3.9. Preparatív léptékű reakció

3.9.1 Preparatív léptékű immobilizálás

A preparatív reakció elvégzéséhez szükséges volt a natív enzimet és az S2C mutánst nagy mennyiségben immobilizálni kovalens nem-specifikus rögzítés valamint, a kifejlesztett hely-specifikus immobilizálás segítségével. Ezek elvégzéséhez a 3.8.1.6-os és 3.8.2-es alpontokban leírt módszert alkalmaztuk úgy, hogy 2-2 g biokatalizátort nyerjünk ki.

3.9.2. Preparatív reakció

A következő 25 mL végtérfogatú reakcióelegyet állítottuk össze a preparatív léptékű reakció elvégzéséhez: 50 mM fenil-piruvinsav, 0,1 mM NADP^+ , 100 mM D-glükóz, 250 μ g izolált GDH enzim, 1,25 mg D-AADH biokatalizátor (nem specifikusan illetve az S2C variáns hely-specifikusan immobilizálva Purolite® ECR8415F metakrilát gyantára) a reakció pufferben (200 mM NH_4Cl és 100 mM NaHCO_3 , pH 9) feloldva. A reakcióelegyet 20 órán keresztül inkubáltuk 35 °C-on, 700 rpm-es rázogatás mellett. A

szubsztrát teljes elhasználódását HPLC-vel igazoltuk. A reakciót követően elválasztottuk a biokatalizátort a reakcióelegytől és 4-szer mostuk 5 mL reakció pufferrel. A megmosott biokatalizátort további három preparatív reakcióban is újrahasznosítottuk.

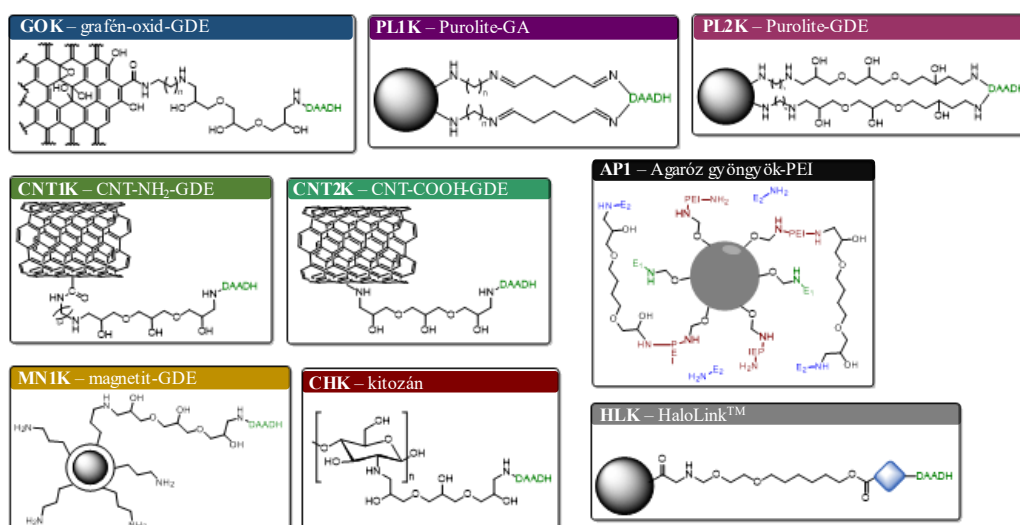
3.9.3. A termékelegy tisztítása

A szűrést és mosást követően a termékelegy és a mosások elegyét 10 %-os kénsav oldattal savaztuk 1-1,5-ös pH értékig. A kapott oldatot Dowex 50 W×4 kationos ioncserélő oszlopon vezettük át, annak érdekében, hogy a D-fenilalanint elválasszuk a többi reakcióelegyben maradt komponenstől. Ezután a kapott oldatot elpárologtattuk így kinyerve a D-fenilalanint, melynek tisztaságát igazoltunk HPLC és ^1H - és ^{13}C -NMR segítségével.

4. Eredmények és kiértékelésük

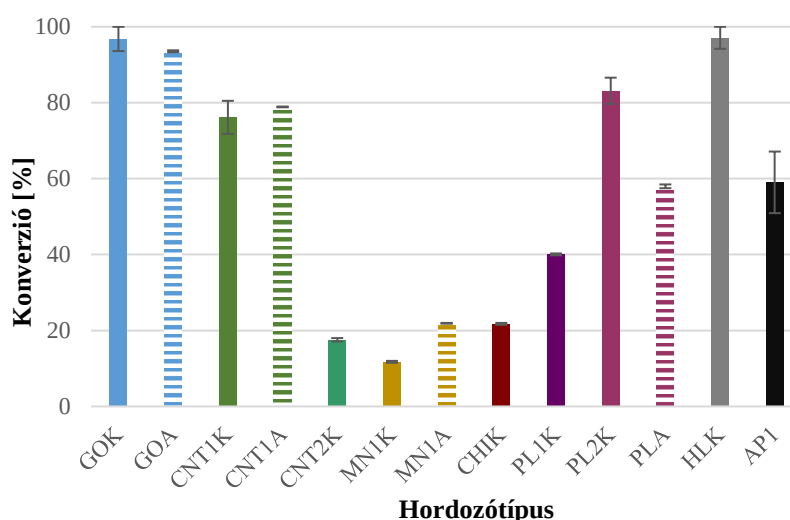
4.1. Hordozók tesztelése

Annak érdekében, hogy a lehető leghatékonyabb immobilizációs rendszert dolgozzuk ki szükséges volt a megfelelő hordozó kiválasztása. A kutatás első lépéseként a natív enzimet különböző hordozókra, különféle eljárásokat alkalmazva immobilizáltuk (16. ábra).



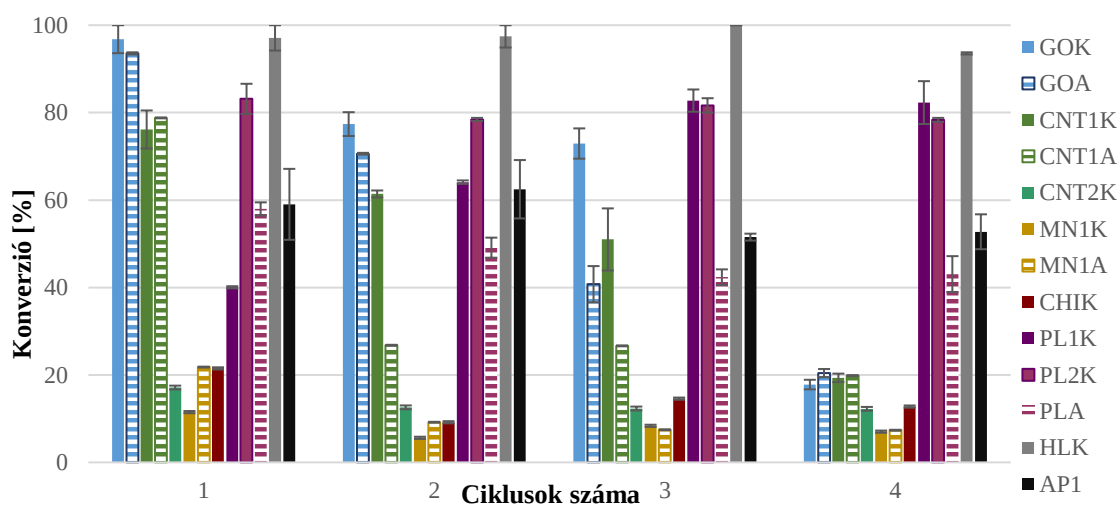
16. ábra – A tesztelt immobilizátumok, megjelenítve a hordozók szerkezetét, ahol a névjegyzékben használt K betű a kovalens csatolást jelöli

Az immobilizálás módja, azaz a hordozó és enzim között kialakuló kölcsönhatás változó a különböző hordozótípusok esetében, lehet szó kovalens csatolásról vagy ionos kölcsönhatások révén létrejött rögzítésről (adszorpció). Az immobilizált enzimek esetében először is a kidolgozott HPLC módszerrel vizsgáltuk a reakció konverzióját 16 óra után (17. ábra). Az első reakcióciklusban megfigyelhető, hogy kitűnően teljesítettek a GO-ra és CNT-re kovalensen és adszorbeálva felvitt enzimek, illetve a HaloLinkes variáns is.



17. ábra – A különböző hordozókra immobilizált enzimek esetében elért konverzió érték 16 óra reakcióidő elteltével a redukív aminálási reakcióban (csíkozott oszlop – adszorpció, teli oszlop – kovalens megkötés)

Az immobilizált enzimek esetében fontos, hogy az újrahasznosítás során ne, vagy csak keveset csökkenjen a katalitikus hatékonyságuk. Ennek érdekében 4 reakciócikluson keresztül hasznosítottuk újra a különböző módszerekkel kapott preparátumokat, hogy megfigyelhessük az aktivitásuk változását a ciklusok során (**18. ábra**).

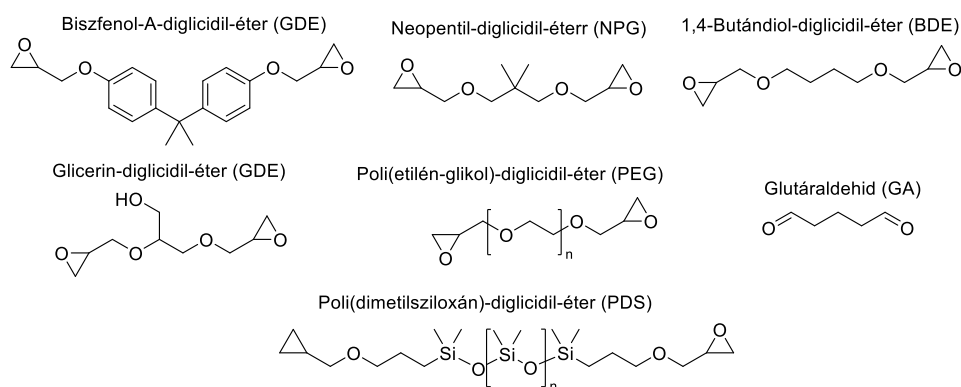


18. ábra – Az újrafelhasználhatóság tesztelése különböző hordozókra immobilizált DAADH esetében (16 óra reakcióidő utáni konverziók a redukív aminálási reakcióban)

A 4 reakcióciklusból származó eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az első ciklusban jól működő GO-ra és CNT-re immobilizált enzim aktivitása nagyot csökkent a 4. ciklus végére mely ellehetetleníti ennek felhasználását a kutatás további részében. A HL-re és AP1-re rögzített enzimek nagyon jó eredményeket produkáltak, viszont túl magas beszerzési költségeik miatt nem megfelelőek egy költséghatékony biokatalizátor előállítására. Ennek következtében a Purolite® ECR8415F metakrilát hordozóra esett a választás, mely kovalens immobilizáció esetén elég magas (80% körüli) konverzió értéket mutatott és ez nem csökkent számottevően az újrahasznosítás során.

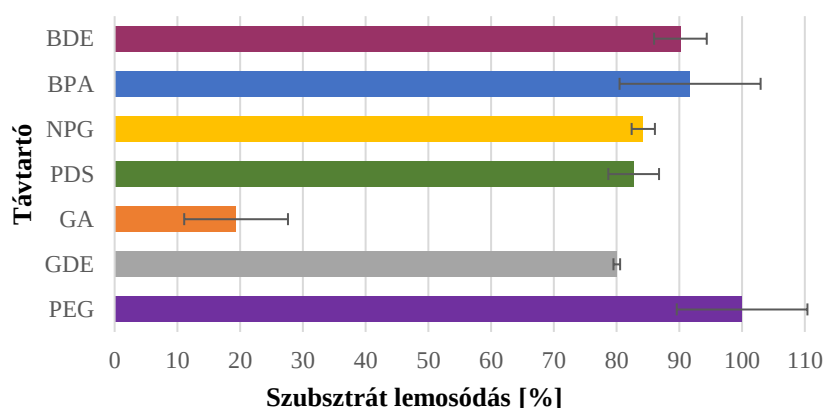
4.2. A megfelelő távtartó kiválasztása

A hordozók típusán kívül a használt kötőkomponens (linker vagy távtartó) is egy igazán meghatározó paraméter, mivel befolyásolhatja az enzim aktivitását és felelős lehet a szubsztrát/termék hordozón történő fentragadásáért, elnyeléséért [29]. Annak érdekében, hogy az immobilizálás lehetővé váljon a kiválasztott Purolite® ECR8415F metakrilát gyanta esetében szükséges ennek aktiválása. A gyanta termelője által adott protokollban a GA távtartó használata volt javasolt [37], viszont mi glicerín-diglicidil-éter (GDE) távtartóval is elvégeztük a gyanta funkcionálisítását, mivel kutatócsoportunk már többször használta más kutatások során is ezt a távtartót [46]. Teszteltük a GDE-rel és GA-del bevont hordozók esetén a PPA és D-fenilalanin elnyelését. Észrevehető volt, hogy a GA esetében a PPA 64%-ban, illetve a D-Phe 56%-ban nyelődött, míg a GDE esetében az értékek 20 és 15% voltak. A negatív eredmények következtében szükséges volt más epoxi csoportot tartalmazó távtartók kipróbálása, melyek különböző polaritással rendelkeznek (**19. ábra**).

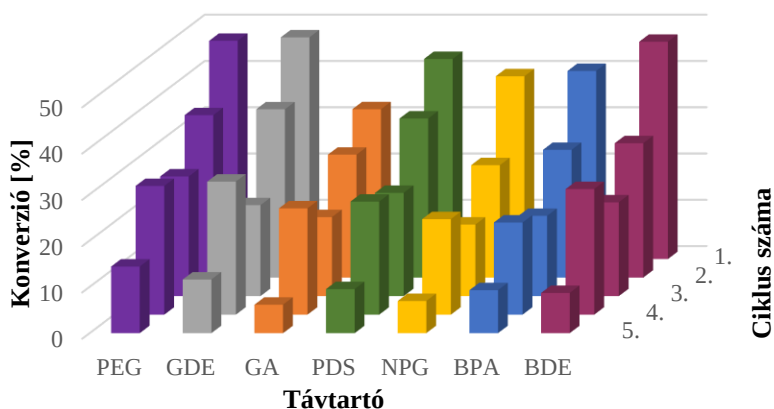


19. ábra – A tesztelt kötőkomponensek szerkezete

Az új távtartókkal megismételtük az előző szubsztrát/termék elnyelési mérést (**20. ábra**) majd ezen linkereken keresztül immobilizáltuk a D-AADH enzimet a Purolite® gyantára és nyomon követtük 5 újrahasznosítási cikluson keresztül a konverziót is (**21. ábra**).



20. ábra – A szubsztrát hordozóról történő lemosódásának mérése 24 óra inkubálást követően



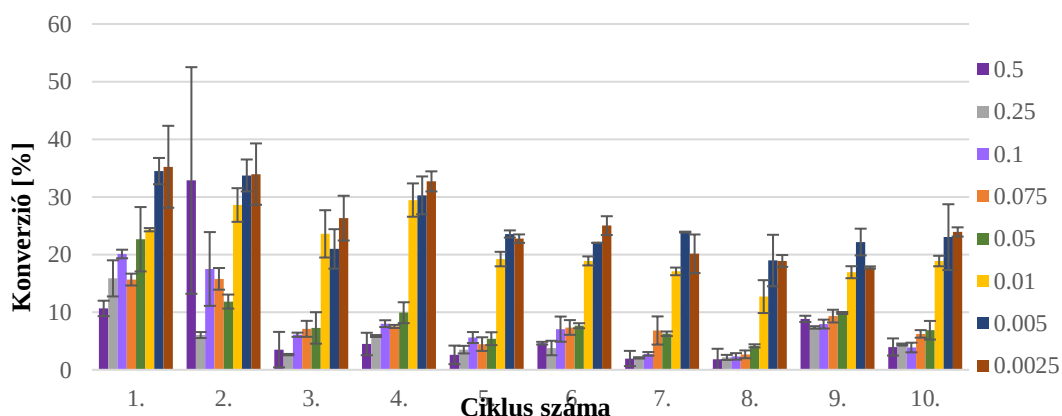
21. ábra – Az újrafelhasználhatóság tesztelése a különböző távtartókkal immobilizált enzimek esetében (4 óra reakcióidő utáni konverziók a redukzív aminálási reakcióban)

A kapott eredmények alapján a PEG használata a legkézenfekvőbb, mivel teljes mértékben lemosódik róla a szubsztrát, így nem áll fenn a nem kívánatos szubsztrát-adszorpció jelensége, valamint a reakció konverziója is ezen távtartó esetében a legnagyobb az újrahasznosítás folyamán. A továbbiakban tehát az optimalizálási lépéseket a PEG-gel aktivált Purolite® gyantára immobilizált enzimre végeztük.

4.3. Az enzim:hordozó arány optimalizálása

Az adott mennyiségű hordozóra felvitt enzimmennyiség befolyásolhatja a módszer költséghatékonyságát. Ideális helyzetben a növekvő enzimmennyiség következtében a konverzió is növekszik, mely növeli a költséghatékonyságot, mivel a hordozó sok esetben drágább, mint a rögzített enzim. Egyes esetekben azonban az enzimmennyiség növelése negatívan befolyásolhatja az enzim aktivitását, aminek magyarázata az enzim aggregálódása lehet, aminek következtében a szubsztrát nem tud hozzáférni egyes enzimek aktív szituszához [47].

Annak érdekében, hogy megtaláljuk a megfelelő enzim:hordozó arányt különböző értékeket kiválasztva (0,0025; 0,005; 0,01; 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5 enzim:hordozó [mg/g]) immobilizáltuk az enzimeket és a kapott preparátumokat 10 újrahasznosítási reakcióciklusban vizsgáltuk (22. ábra).



22. ábra – Az újrafelhasználhatóság tesztelése a különböző enzim:hordozó arány szerint immobilizált D-AADH esetében (4 óra reakcióidő utáni konverziók a redukzív aminálási reakcióban)

Az eredmények alapján kijelenthető, hogy 0,005-ös arány felett az enzim aggregálódik és jelentősen csökken az aktivitása. Mivel a 0,005 és 0,0025 arányok esetében nagyjából megegyezik a konverzió értéke, költséghatékonysági szempontból az előző az ideálisabb. Tehát az eddigi eredmények alapján a legoptimálisabb arány 5 mg enzim rögzítése 1 g hordozóra.

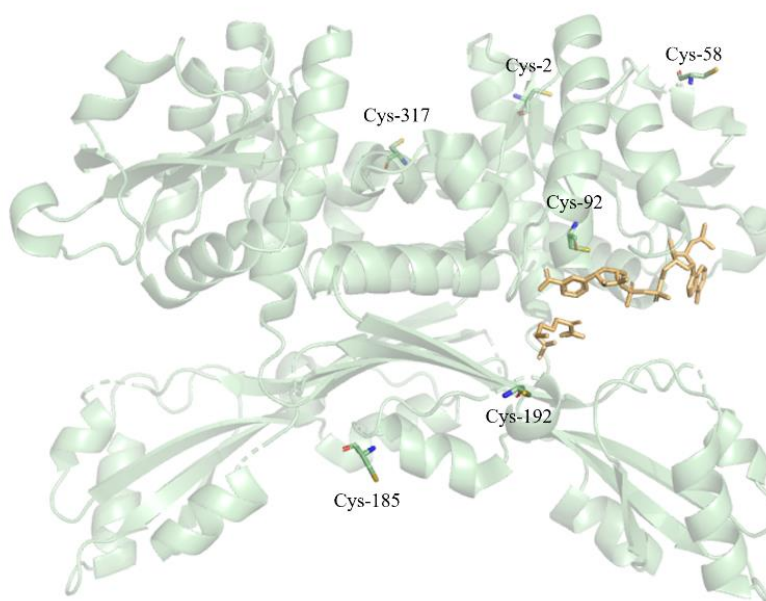
4.4. A hely-specifikus immobilizálás

Figyelembe véve a hely-specifikus immobilizálási eljárás előnyeit, alkalmaztuk a módszert az *Utd-AADH* enzim esetében is a már optimalizált paraméterek mellett (Purolite® ECR8415F hordozó, PEG-linker, 0,005:1 enzim:hordozó arány).

A D-AADH enzim nem rendelkezik felületi ciszteinekkal, ennek következtében hely-specifikus mutagenézissel kellett bevinni a kívánt aminosavat az enzim szerkezetébe. Ahhoz, hogy megtaláljuk/kiválasszuk a legmegfelelőbb mutációkat a következő lépéseket végeztük el [44]:

- A fehérje harmadlagos szerkezetének ismeretében kiválasztottunk négy olyan szekvenciaszakaszt, ami nem a katalitikus szitusz közelében található és az alapváz felületi részén helyezkedik el, illetve kettőt, ami része a katalitikus szitusznak (negatív kontroll). Ezt a PyMOL program segítségével tudtunk vizsgálni, melyhez a Protein Data Bank (PDB) oldaláról töltöttük le enzimünk megfelelő kristályszerkezetét.
- Kiválasztottuk a lehető legminimálisabb változást előidéző mutációhoz szükséges aminosavat. Cisztein esetében szerin vagy alanin mutációja volt javasolt a szakirodalom szerint.

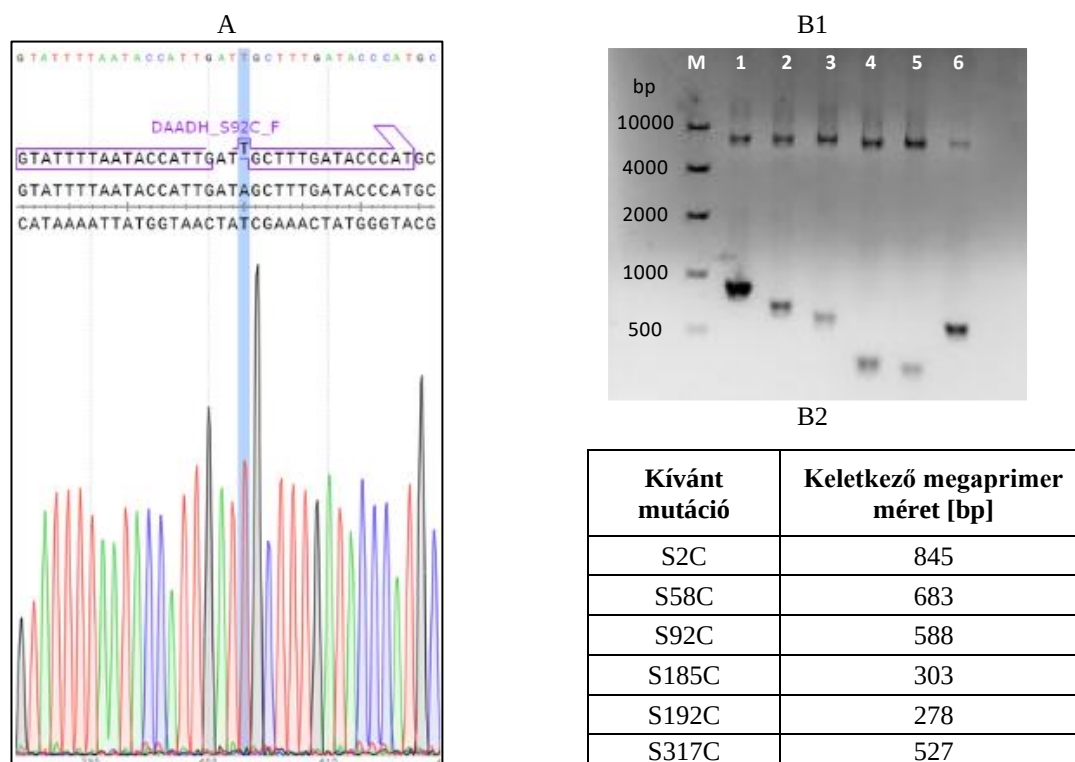
A kiválasztott pontokban elvégeztük a számítógépes mutációt szemléltetés céljából (23. ábra).



23. ábra – A pontmutációk szemléltetése az enzim szerkezetén (halvány zölddel jelölve az enzim alapváza, narancssárgával a katalitikus szitus és színessel a ciszteinek) (PDB ID: 5GZ6)

4.4.1. Irányított mutagenézis

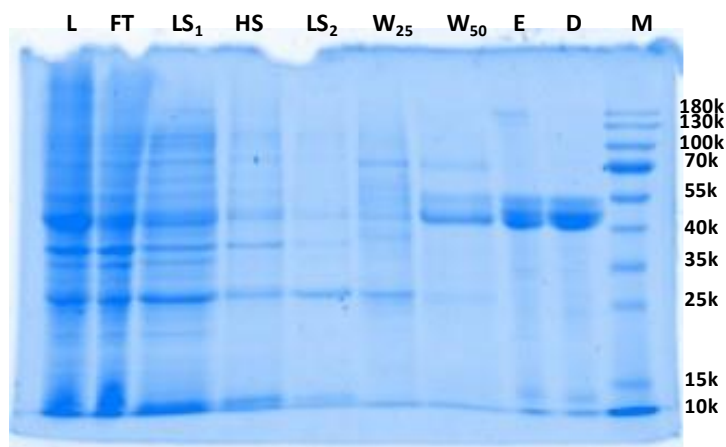
A kiválasztott mutációkhoz primereket terveztünk (z24. ábra – A), majd a végzett PCR reakció végbemenetelét 1%-os agaróz gélen való elektroforézissel ellenőriztük. A megaprimer módszerrel bevitt pontmutációk jelenlétét szekvenálással igazoltuk. Emellett cPCR segítségével határoztuk meg a rekombináns mutáns enzimeket tartalmazó plazmidok transzformálásának sikerességét (z24. ábra17. ábra – B1).



z24. ábra – A) a szekvenálási kromatogram a D-AADH S92C mutáns esetében és B1) a mutagén PCR eredménye 1%-os agaróz gélen (1-6 az egész plazmid (fent) és a megaprimer (lent), B2) A használt megaprimerek hosszainak összefoglalása

4.4.2. Rekombináns fehérjetisztítás eredménye

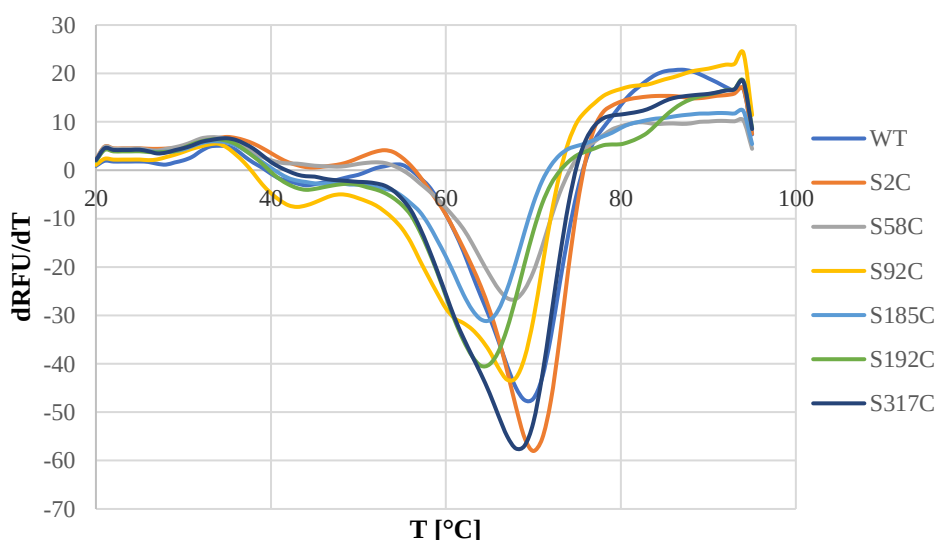
Mindegyik mutáns esetében végrehajtottuk a transzformálás és fehérjetermelés lépéseit, majd a tisztítás során Ni-NTA affinitás kromatográfia segítségével izoláltuk a rekombináns fehérjét. A tisztítás hatékonyságának ellenőrzésére gélelektroforézist (SDS-PAGE) alkalmaztunk, hogy bebizonyítsuk a rekombináns fehérjénk jelenlétét az eluált frakcióban molekulatömege alapján (25. ábra). A D-AADH enzim molekulatömege 35-40 kDa körüli érték.



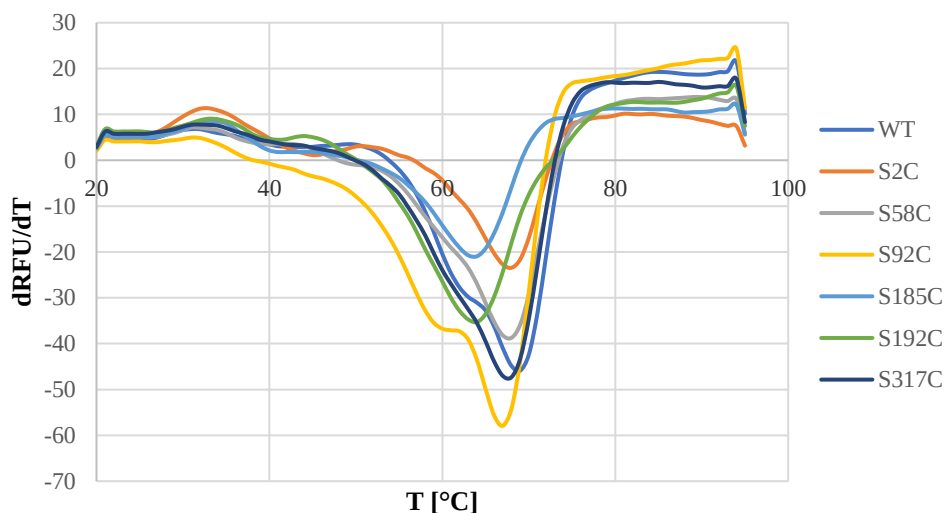
25. ábra – A D-AADH S92C mutáns Ni-NTA affinitás kromatográfiás tisztításának különböző szakaszaiban vett minták SDS-PAGE analízise (L – lizátum; FT – meg nem kötődött lizátum termékek (flow-through); LS₁ – első alacsony sótartalmú mosás; HS – magas sótartalmú mosás; LS₂ – második alacsony sótartalmú mosás; W₂₅, W₅₀ – 25 és 50 mM-os imidazolos mosás, a nem specifikusan megkötődött fehérjék lemosása; E – elúció, specifikusan megkötött fehérjék; D – dialízis utáni minta; M – marker, PageRuler Prestained Protein Ladder)

4.4.3. A mutáns *Utd*-AADH enzimek olvadáspontjának meghatározása

A fehérjék hőstabilitásának (hő-denaturációs profiljának) vizsgálata nagyon fontos, annak érdekében, hogy megtudjuk, milyen mértékben befolyásolták az általunk bevitt mutációk az enzim megfelelően hajtogatott szerkezetét. A kapott hőmérsékleti görbéket a **26. ábra** és a **27. ábra** tartalmazza, valamint az olvadáspontokat a **5. táblázat**ba összegeztem. Mivel egy hatékony immobilizált enzim alapú biokatalizátor kifejlesztésénél fontos figyelembe venni az adott fehérje stabilitását a katalizálni kívánt reakció körülményeinek esetében is, az olvadáspont vizsgálatot a reakció pufferben is elvégeztük. Jól megfigyelhető, hogy a mutációk nem okoztak nagy változást az natív enzim hőstabilitásához képest, a legkisebb eltérés az S2C, S58C mutánsok esetében figyelhető meg, míg a legnagyobb eltérés az S185C és S192C mutánsoknál következett be.



26. ábra – A D-AADH mutánsok hő-denaturációs görbéi, HEPES pufferben mérve



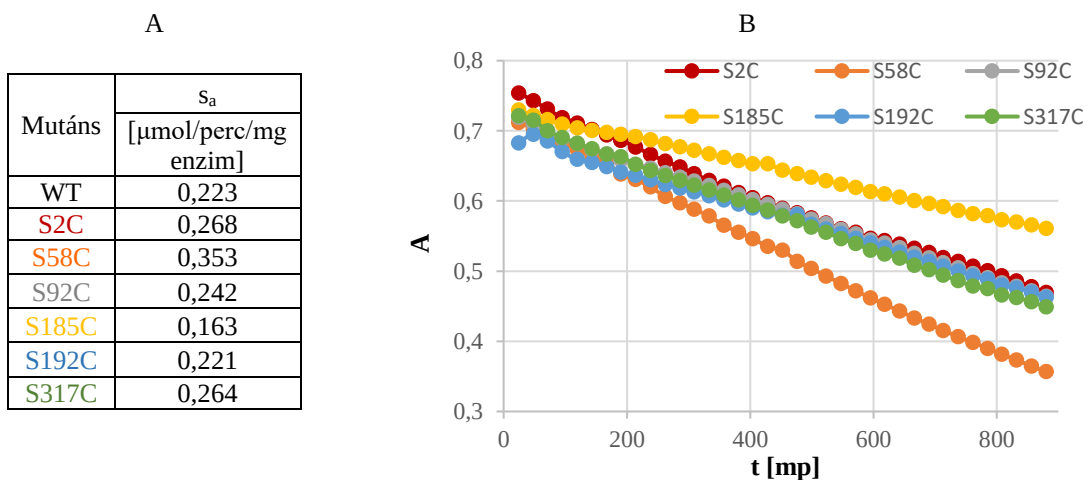
27. ábra – A D-AADH mutánsok hő-denaturációs görbéi a reakció pufferben mérve

5. táblázat – A mutáns enzimek olvadáspontjainak összehasonlítása

Mutáns	WT	S2C	S58C	S92C	S185C	S192C	S317C
T_M – HEPES puffer [°C]	69	70	68	67	65	64	68
T_M – reakció puffer [°C]	69	68	68	67	64	64	68

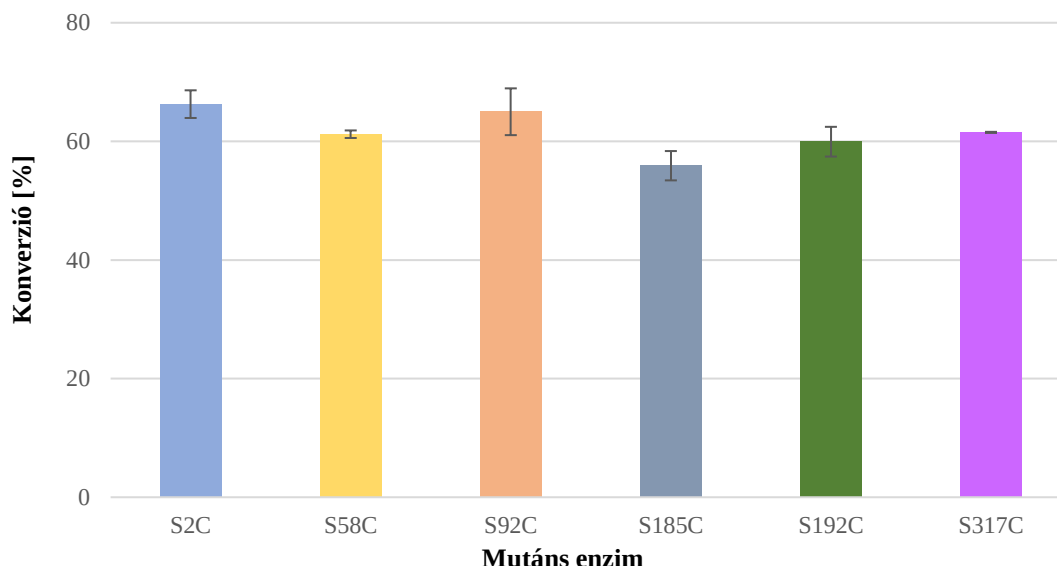
4.4.4. A mutáns *Utd*-AADH variánsok specifikus aktivitásának meghatározása és izolált enzimes reakciók vizsgálata

Az enzimek készítése után vizsgáltuk ezek aktivitását (28. ábra). A különböző tisztítási sarzsokból származó natív enzim specifikus aktivitása megközelítőleg 0,223 [μmol/perc/mg enzim], a katalizált reakció kezdeti sebességének szempontjából az S185C mutáns kivételével mindegyik módosított enzim hasonlóan vagy jobban teljesített a redukív aminálási reakció során, igazolva, hogy az elvégzett mutációk (egyet kivéve) nem befolyásolják az enzim aktivitását.



28. ábra – A) A mutáns enzimek specifikus aktivitása (s_a); B) Az abszorbanca csökkenése az idő függvényében, melynek meredekségéből kiszámolható a katalizált reakció kezdeti sebessége és a specifikus aktivitás

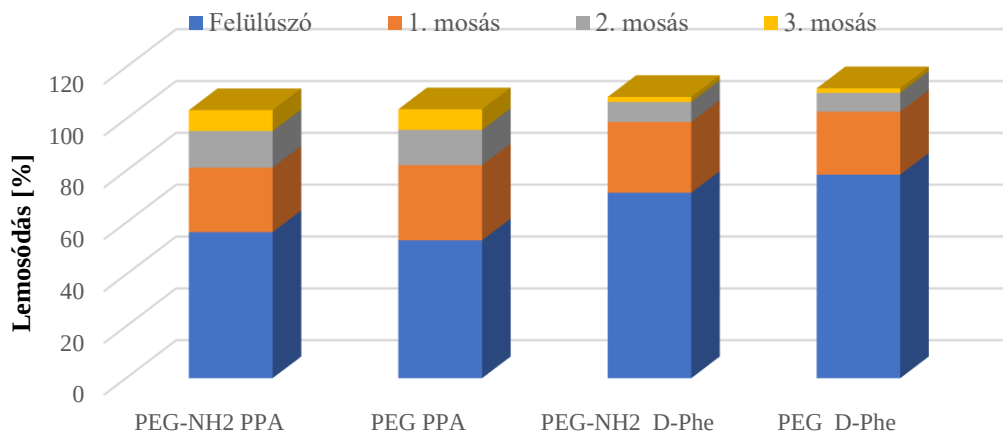
A mutáns enzimek aktivitását immobilizálás előtt teszteltük hosszabb időintervallumban is, hogy lássuk miként változik a konverzió a mutánsok között. A négy óra redukzív aminálás után kapott elegyet a kidolgozott HPLC módszer segítségével követtük nyomon (**29. ábra**). Az utóbbi két kísérlet eredményei igazolják, hogy a bevitt pontmutációk nem befolyásolják az izolált enzim katalitikus hatékonyságát és stabilitását.



29. ábra – Az izolált mutáns enzimek katalitikus hatékonyságának vizsgálata 4 óra redukzív aminálás során

4.4.5. Az aktivált hordozó szubsztrát/termék adszorpciója

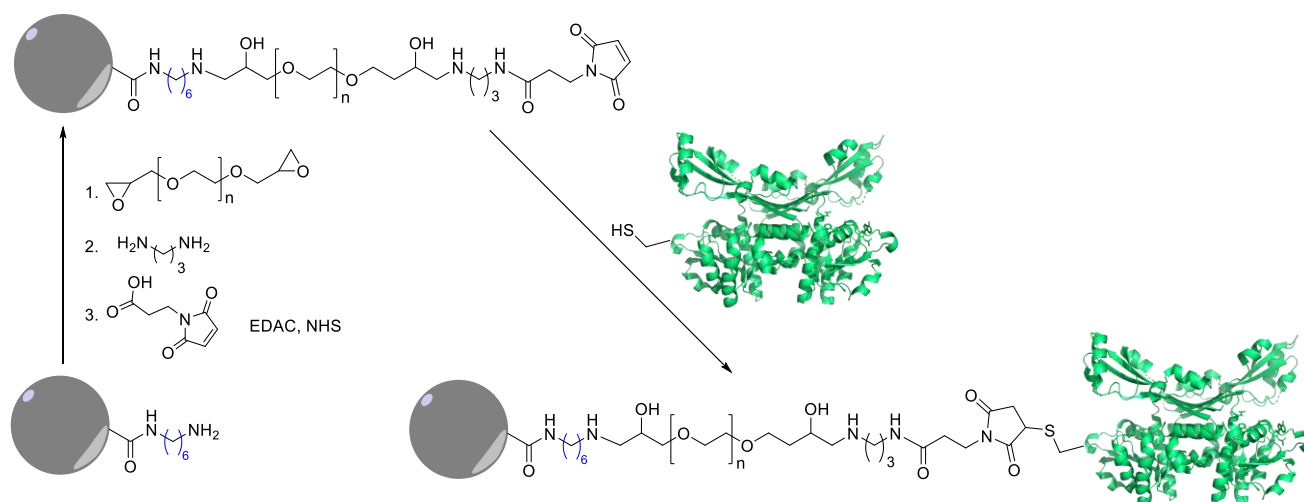
Fontos ismerni, hogy a szubsztrátot/termék milyen mértékben adszorbeálódik a hordozó felületére, mivel ez nagyban befolyásolja a biokatalitikus folyamat hatékonyságát. Az előző kísérletek során észleltük, hogy bizonyos linkerek jobban hozzájárulnak a szubsztrát/termék adszorpciójához, mint a többi, ezért mielőtt hely-specifikusan immobilizáltuk a fehérjét vizsgáltuk a diamonipropánnal módosított PEG linker. Mind a diamonipropánnal kezelt hordozó (PEG-NH₂), mind a csak PEG-gel kezelt hordozó esetében is az adszorpciót. A kapott eredmények alapján mind a szubsztrát, mind a termék lemosódik teljes mértékben a hordozókról (**30. ábra**). Az ábrán látható, hogy az összle mosódásból 40-60% (szubsztrát-termék) fennmarad a hordozón a felülúszó eltávolítása után, amit a mosások segítségével tudunk lemosni. A megfelelő procedúra kidolgozása szempontjából fontosak a kapott eredmények, hiszen tudnunk kell mennyi tisztítási folyamat szükséges a hordozó regenerálásához és a termék izolálásához. Megfigyelhető, hogy az összérték 100% felett van, aminek a magyarázata a HPLC módszer során bekövetkező mérési hiba és az integrálok kiértékelése.



30. ábra – A szubsztrát/termék lemosódása az aktivált hordozókról.

4.4.6. Az immobilizáció és hatásfoka

A 3.9.2. alfejezetben leírtak alapján immobilizáltuk tiol-maleimid kapcsolás révén rögzítettük mindegyik mutáns D-AADH enzimet (31. ábra), immobilizáció hatásfoka minden alkalommal nagyon magas, ~100%-os volt.



31. ábra – A DAADH hely-specifikus immobilizálásának reakciósémája

4.4.7. Az immobilizálás hatása a specifikus aktivitásra

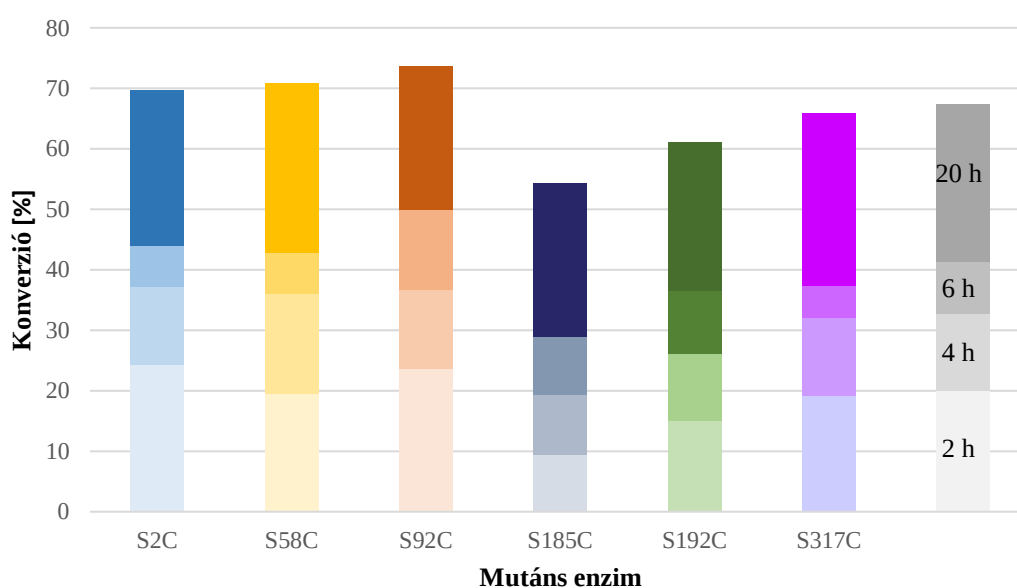
Vizsgáltuk a biokatalizátorok specifikus aktivitásának változását az immobilizálást követően. Az immobilizálás okozta aktivitáscsökkenést az 6. táblázatba összegeztem. Az aktivitáscsökkenés mértéke minden esetben jelentős volt, úgy a hely-specifikus immobilizálás esetében, mint a nem-specifikus kovalens és adszorpciós immobilizálások esetében is. Három mutáns (S2C, S192C, S317C) esetében is sikerült magasabb specifikus aktivitást elérni immobilizálás után, mint amit az adszorpcióval rögzített natív enzim esetében észleltünk.

6. táblázat – Az immobilizálás hatása a specifikus aktivitásra (S_a – specifikus aktivitás)

Biokatalizátor	S_a izolált biokatalizátor [$\mu\text{mol perc}^{-1} \text{mg}^{-1}$ enzim]	S_a immobilizált biokatalizátor [$\mu\text{mol perc}^{-1} \text{mg}^{-1}$ enzim]	Relatív S_a az izolált enzimhez viszonyítva [%]	Relatív S_a a WT-A-hoz viszonyítva [%]
WT-A	0,223	0,059	26,4	100
WT-C		0,037	16,7	62,71
S2C	0,268	0,078	29,1	132,20
S58C	0,353	0,049	13,9	83,05
S92C	0,242	0,053	21,9	89,83
S185C	0,163	0,043	26,4	72,88
S192C	0,221	0,083	37,6	140,68
S317C	0,264	0,060	22,7	101,69

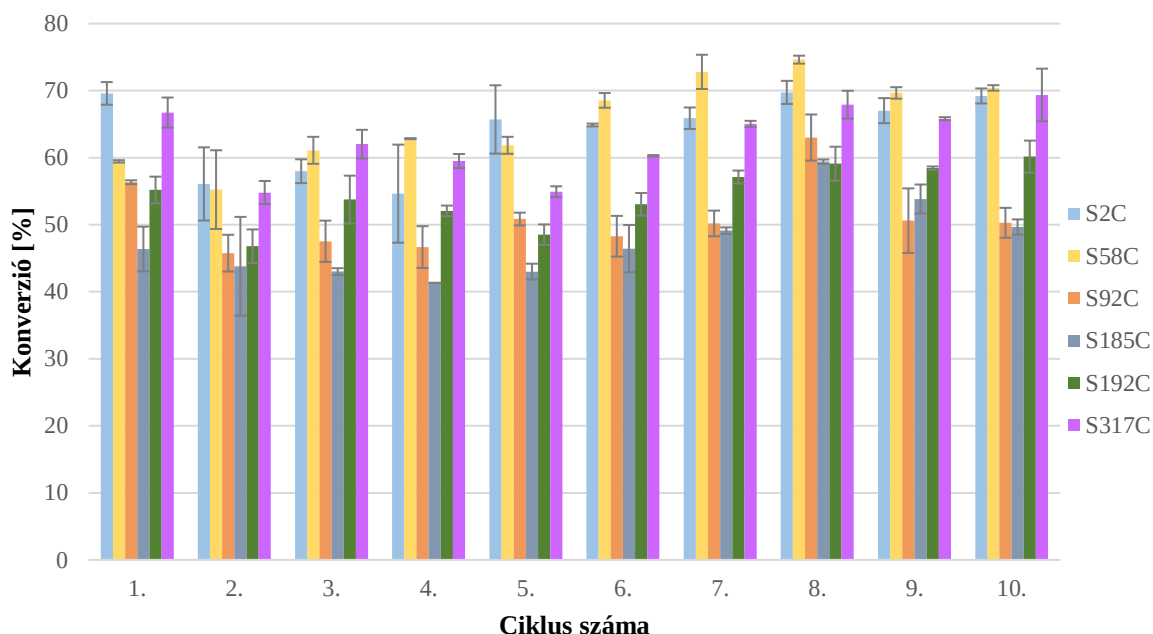
4.4.8. A katalitikus hatékonyság változása az idő függvényében és az újrahasznosítás során

A hely-specifikus immobilizálást követően vizsgáltuk mindegyik preparátum esetében a konverzió előrehaladását a reakcióidő függvényében egy reakciócikluson belül. Ehhez a reakciókból 2-4-6-20 óra elteltével mintát vettünk majd ezeket a HPLC módszer segítségével kiértékeltek (32. ábra).



32. ábra – A hely-specifikusan immobilizált mutáns enzimek esetében elért konverzió érték 2-4-6-20 óra reakcióidő elteltével a redukív aminálási reakcióban

Költséghatékonyság szempontjából nagyon fontos, hogy az adott biokatalizátor ne csak az első alkalmazás során (egy reakcióban) legyen hatékony, hanem aktivitását megtartsa számos reakciócikluson keresztül minimális csökkenés mellett. A kapott preparátumok újrafelhasználhatóságának céljából az immobilizált enzimeket egy 10 reakcióciklusból álló újrahasznosítási mérősorozaton vezettük végig. A kapott eredményeket a 33. ábra tartalmazza.



33. ábra – Az immobilizált mutáns enzimek újrafelhasználhatóságának vizsgálata (6 óra reakcióidő utáni konverziók a redukív aminálási reakcióban)

A diagramon megfigyelhető, hogy az első reakcióciklusban kiválóan működő S92C mutáns az újrahajsznosítások során gyengén teljesített, hasonlóan az S185C és S192C mutánsokhoz. Az összesített eredmények alapján a Purolite-PEG-D-AADH/S2C biokatalizátor a legalkalmasabb a további fejlesztésre, hiszen magas katalitikus hatékonyságát többnyire stabilan tartotta tíz reakciócikluson keresztül. Ezenkívül érdemes lehet továbbfejleszteni az S58C és S317C mutánsok immobilizált variánsait is, mivel hasonlóan magas idő-konverzió profilt és újrafelhasználhatóságot mutattak.

4.4.9. Az újrahajsznosítás hatása a biokatalizátorok specifikus aktivitására

Vizsgáltuk a biokatalizátorok specifikus aktivitásának változását a 10 cikusból álló újrafelhasználásukat követően. Az újrahajsznosítás okozta aktivitáscsökkenést az **7. táblázat**ba összegeztem. Az aktivitáscsökkenés mértéke minden esetben megfigyelhető volt, viszont minimálisnak tekinthető a nem-specifikus kovalens immobilizáció esetében, mivel annak amúgy is elég alacsony volt a visszamaradt S_a értéke. Az aktivitáscsökkenés mellett fontos megfigyelni mekkora aktivitással rendelkeznek a különböző biokatalizátorok az újrahajsznosítás után, hiszen a S2C 50%-os aktivitáscsökkenés mellett is a legmagasabb specifikus aktivitással rendelkezik. Ezenkívül az S58C, S92C, S192C mutánsok esetében is magasabb specifikus aktivitás figyelhető meg a reakcióciklusok után, mint amit az adszorpcióval valamint nem-specifikus kovalens kapcsolással rögzített natív enzim esetében észleltünk.

7. táblázat – Az újrafelhasználás hatása a specifikus aktivitásra (S_a – specifikus aktivitás)

Biokatalizátor	S_a immobilizált biokatalizátor [$\mu\text{mol perc}^{-1} \text{mg}^{-1}$ enzim]	S_a 10 reakcióciklus után [$\mu\text{mol perc}^{-1} \text{mg}^{-1}$ enzim]	Relatív S_a reakció ciklusok előtti értékekhez viszonyítva [%]
WT-A	0,059	0,024	40,7
WT-C	0,037	0,034	91,9
S2C	0,078	0,039	50,0
S58C	0,049	0,036	73,5
S92C	0,053	0,039	73,6
S185C	0,043	0,015	34,9
S192C	0,083	0,036	43,4
S317C	0,060	0,019	31,7

4.4.10. Az optimális biokatalizátor kiválasztása

A 4.4.-es alfejezet eredményeit összegezve kiválasztottuk a legmegfelelőbb mutáns biokatalizátort, melyet a továbbiakban felhasználtunk preparatív léptékű reakcióban. A legjobban teljesítő mutáns az S2C volt mely minden egyes vizsgálat során jól teljesített. Az eredményeket a **8. táblázat**ba összegeztem.

8. táblázat – A hely-specifikus biokatalizátorok összehasonlítása

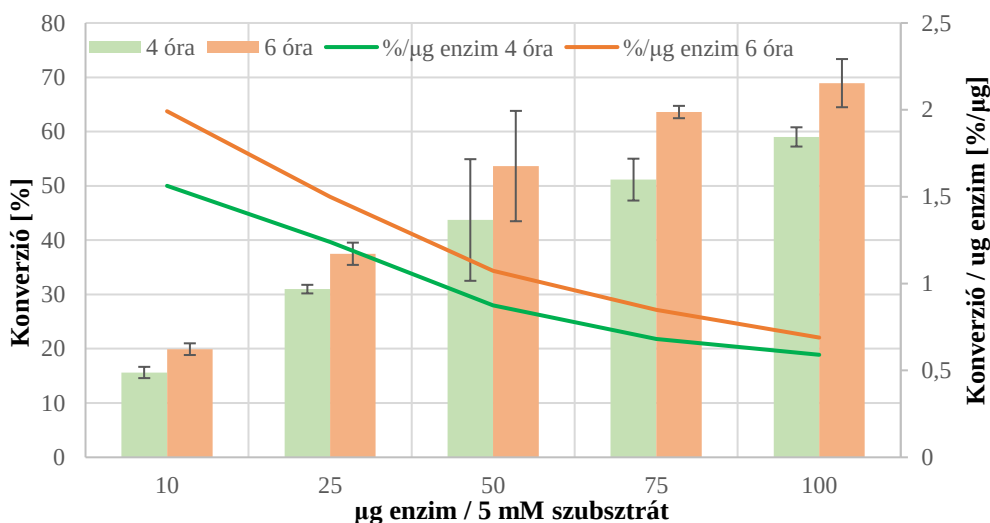
Mutáns	T_M [°C]	Specifikus aktivitás [$\mu\text{mol/perc/mg}$ enzim]			Konverzió [%]	
		Izolált	Immobilizált	Immobil. 10 ciklus után	Első ciklus	10 ciklus átlaga
S2C	68	0,268	0,078	0,039	69,595	64,076
S58C	68	0,353	0,049	0,036	59,449	65,654
S92C	67	0,242	0,053	0,039	56,337	50,954
S185C	64	0,163	0,043	0,015	46,389	47,599
S192C	64	0,221	0,083	0,036	55,187	54,420
S317C	68	0,264	0,060	0,019	66,727	62,641

4.5. Preparatív léptékű reakció

4.5.1. Az optimális szubsztrát:enzim arány meghatározása

A preparatív reakció elvégzése előtt szükséges volt meghatározni az optimális szubsztrát:enzim arányt. Ennek érdekében 4 és 6 órás redukív aminálási reakciókban vizsgáltuk az S2C mutáns esetében a katalitikus hatékonyságot úgy, hogy 5 mM állandó szubsztrátmennyiség mellett változtattuk az enzimmennyiséget 10, 25, 50, 75, 100 μg értékek között. A kapott eredményeket a **34. ábra** összegzi. Az ábrán fel van tüntetve az egységnyi enzimmennyiségre (1 μg) jutó konverzió érték is, annak érdekében, hogy szemléltetve legyen az enzim kihasználás mértéke az adott reakciókban. Fontos megemlíteni, hogy több választási lehetőségünk is van. Amennyiben a rövidebb reakcióidőt preferáljuk akkor megéri az 50 vagy 75 μg enzim/5 mM szubsztrát arányt választani, viszont ha az alacsonyabb enzimhasználat a fontos,

célszerű 10, 25 μg enzimet használni hosszabb időintervallumon. Az általunk választott 25 μg enzim/5 mM szubsztrát arány esetében a használt biokatalizátor mennyisége alacsony, viszont akár 20 óra alatt is elérhető a teljes konverzió.



34. ábra – A katalitikus hatékonyság tesztelése a különböző enzim:szubsztrát arányok esetében az immobilizált D-AADH S2C mutánst alkalmazva (4 és 6 óra reakcióidő utáni konverziók, valamint az egységnyi enzimre jutó konverzió a redukatív aminálási reakcióban)

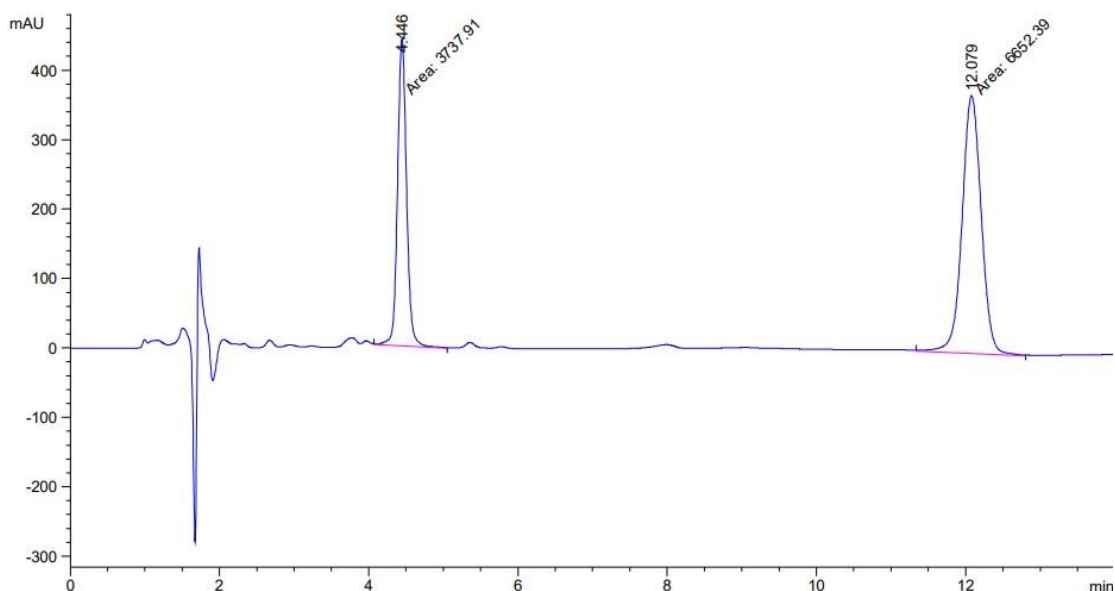
4.5.2. A preparatív léptékű reakció és a biokatalizátor újrahasznosítása

A hely-specifikusan immobilizált biokatalizátort három egymást követő preparatív léptékű reakcióban használtuk fel, míg a nem-specifikusan kovalensen immobilizált biokatalizátort egy ciklusban teszteltük. Jól látható, hogy a hely-specifikusan immobilizált biokatalizátor jobban teljesített mindhárom ciklusban, mint a nem-specifikus. Az eredmények alapján (melyeket a **9. táblázat**ba összegeztem.) sikerült kidolgozni egy olyan biokatalizátort mely újrahasznosítások során is képes megtartani katalitikus hatékonyságát és a vele kidolgozott előállítási módszer képes elérni a 90%-os globális D-fenilalanin hozamot nyújtani, azaz megközelítőleg 200 mg tiszta anyag előállítására alkalmas.

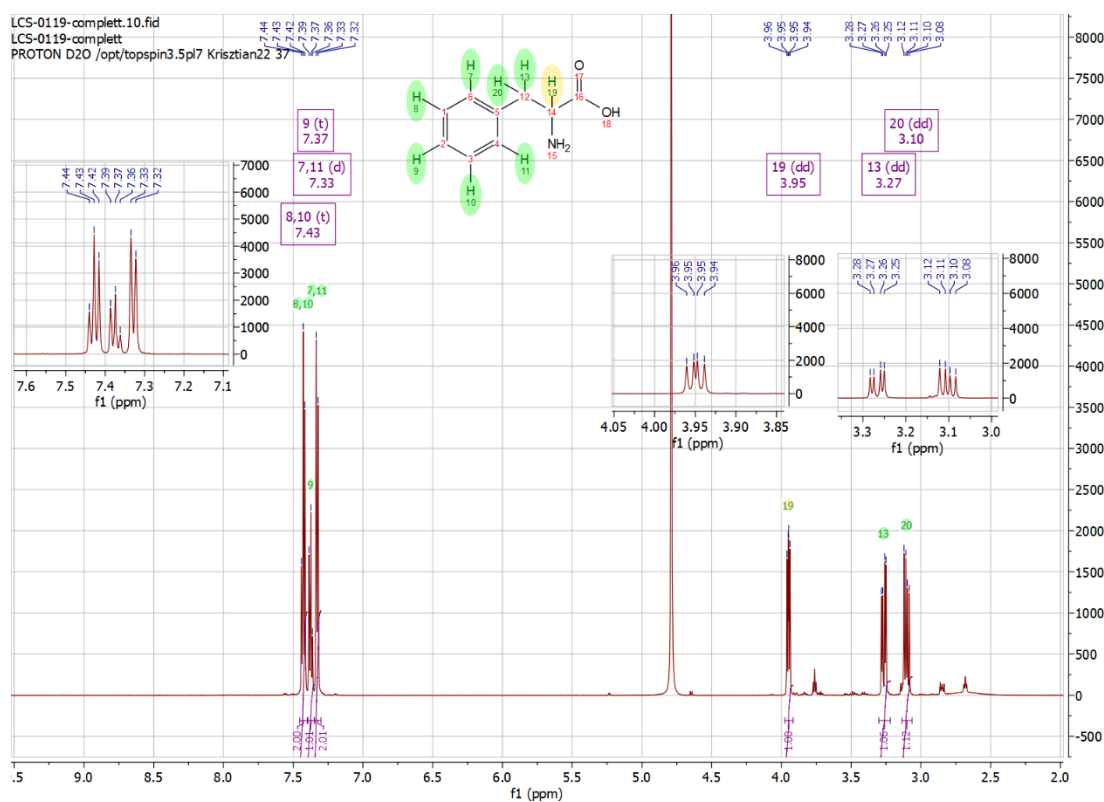
9. táblázat – A preparatív reakciók globális hozamai

Reakció	Hozam
WT-C	86,4%
S2C első reakció	88,9%
S2C második reakció	88,6%
S2C harmadik reakció	92,3%

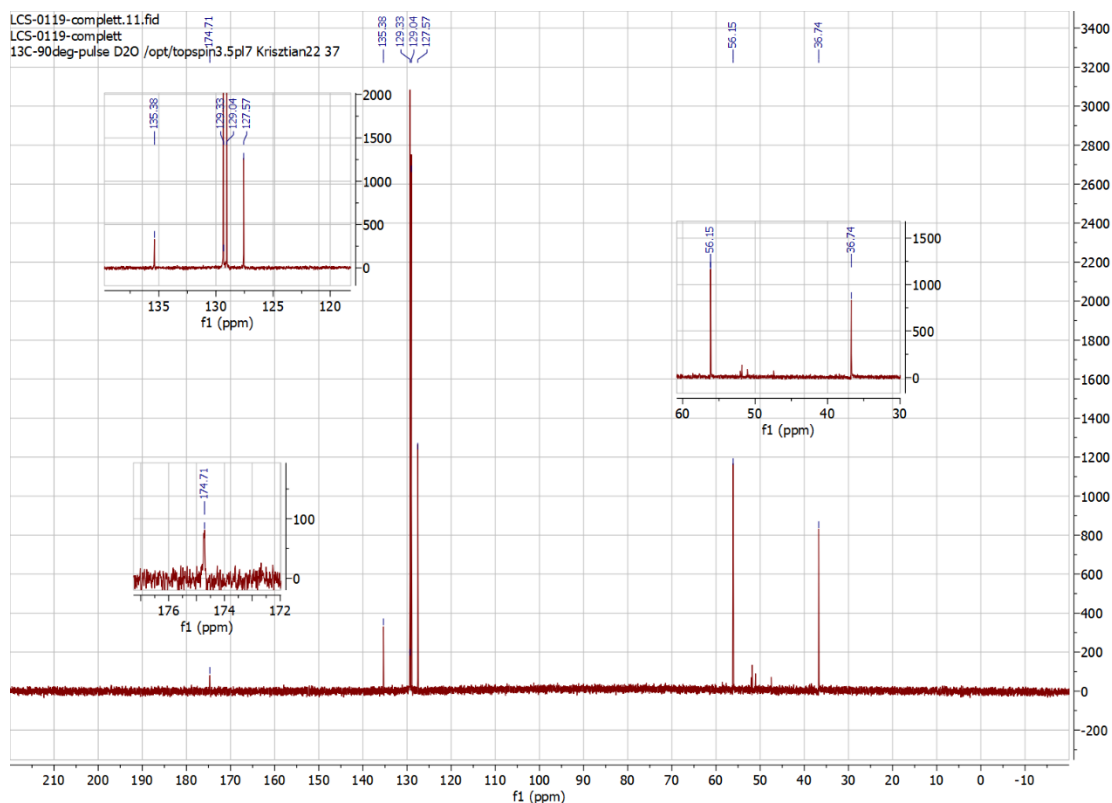
A kapott D-fenilalanint tisztaságát igazoltunk HPLC, ^1H - és ^{13}C -NMR segítségével. A kapott kromatogramok egyértelműen bizonyítják, hogy tiszta végtermékhez jutottunk.



35. ábra – A preparatív reakciótermék tisztítása után kinyert anyag HPLC kromatogramja: D-Phe (R_t : 4,34 perc) és koffein (R_t : 12,01 perc). A HPLC méréseket a 3.7-es alpontban leírtak alapján végeztük el



36. ábra – A preparatív reakciótermék tisztítása után kinyert anyag ^1H -NMR kromatogramja: ^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ = 7,43 (t, J =7,4 Hz, 2H), 7,37 (t, J =7,4 Hz, 1H), 7,33 (d, J =7,1 Hz, 2H), 3,95 (dd, J =7,9, 5,2 Hz, 1H), 3,27 (dd, J =14,5, 5,2 Hz, 1H), 3,10 (dd, J =14,5, 7,9 Hz, 1H).



37. ábra – A preparatív reakciótermék tisztítása után kinyert anyag ^{13}C -NMR kromatogramja: ^{13}C NMR (151 MHz, D_2O) $\delta = 174,71; 135,38; 129,33; 129,04; 127,57; 56,15; 36,74$.

5. Következtetések

A Purolite® ECR8415F metakrilát gyanta bizonyult a legoptimálisabb hordozónak az *Utd*-AADH immobilizálására a számos kereskedelmi forgalomban és a kutató csoporton belül elérhető hordozók közül.

A Purolite® ECR8415F gyantán PEG távtartó segítségével immobilizált *Utd*-AADH magas konverziót és újrahasznosíthatóságot mutatott, és nem jelent meg a szubsztrát/termék adszorpció problémája (az optimális enzim:hordozó arány 0,005).

Az optimális immobilizációs rendszerre alapozva hely-specifikusan is rögzítettük az *Utd*-AADH enzimet, vizsgáltuk a kapott preparátumok konverzióinak előrehaladását a reakcióidő függvényében és újrahasznosíthatóságukat. Három hatékony biokatalizátort (S2C, S58C, S317C) fejlesztettünk ki enantiomertiszta D-aminosavak szintézisére, majd tovább vizsgálva a rögzített enzimek specifikus aktivitását, az újrahasznosítás után visszamaradó aktivitást, valamint összegezve a kapott eredményeket, az S2C variánst választottuk ki mint optimális preparátum.

Preparatív léptékű reakcióban teszteltük a legjobban működő hely-specifikusan immobilizált biokatalizátort, valamint a nem-specifikusan kovalensen immobilizált natív enzimet. Az eredmények alapján jobban teljesítő hely-specifikusan immobilizált biokatalizátor segítségével 200 mg enantiomertiszta D-fenilalanint tudtunk előállítani 90%-os globális hozam mellett, több egymást követő reakció ciklus során.

6. Köszönetnyilvánítás

Ezen kutatómunka teljes terjedelemben a BBTE, Kémia és Vegyészmérnöki Karán, a Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutatóközpontban volt elvégezve.

Ezenkívül hálás vagyok témavezetőimnek, Dr. Bencze László-Csabának és Boros Krisztina doktorandusz kutatónak, a kutatás során nyújtott támogatásért.

Köszönettel tartozom az Előfutár Szövetségnek (Forerunner Federation) és a Magyar Külgazdasági és Külügyminisztériumnak az anyagi támogatásért.

7. Bibliográfia

1. Nyitrai L. and Pál G., *A biokémia és molekuláris biológia alapjai*. **2013**, Budapest: Eötvös Loránd Tudományegyetem.
2. Akita H., Hayashi J., Sakuraba H., and Ohshima T., *Artificial Thermostable D-Amino Acid Dehydrogenase: Creation and Application*. *Frontiers in Microbiology*, **2018**. 9.
3. Friedman M. and Levin C. E., *Nutritional and medicinal aspects of D-amino acids*. *Amino Acids*, **2012**. 42(5): p. 1553-82.
4. Martínez-Rodríguez S., Martínez-Gómez A. I., Rodríguez-Vico F., Clemente-Jiménez J. M., and Las Heras-Vázquez F. J., *Natural Occurrence and Industrial Applications of d-Amino Acids: An Overview*. *Chem Biodivers.*, **2010**. 7(6): p. 1531-48.
5. R. Konno H. B., A. D'Aniello, G. Fischer, N. Fujii, H. Homma, *D-AMINO ACIDS: A new frontier in amino acids and protein research - Practical methods and protocols*. **2007**, New York: Nova Science Publishers.
6. Fujii N. and Saito T., *Homochirality and life*. *Chem Rec*, **2004**. 4(5): p. 267-78.
7. Madigan M. T., Martinko J. M., Bender K. S., Buckley D. H., and Stahl D. A., *Microbial Cell Structure and Function*, in *Brock Biology of Microorganisms*, B. H. A., Editor. **2015**, Pearson Education Limited: Boston.
8. Salton M. R. J. and Kwang-Shin K., *Structure*, in *Medical Microbiology*, Baron S., Editor. **1996**, University of Texas Medical Branch at Galveston: Galveston (TX).
9. Vedha-Peters K., Gunawardana M., Rozzell J. D., and Novick S. J., *Creation of a Broad-Range and Highly Stereoselective Amino Acid Dehydrogenase for the One-Step Synthesis of d-Amino Acids*. *Creation of a Broad-Range and Highly Stereoselective Amino Acid Dehydrogenase for the One-Step Synthesis of d-Amino Acids*. *Journal of the American Chemical Society*, **2006**. 128(33): p. 10923-10929.
10. Grishin D. V., Zhdanov D. D., Pokrovskaya M. V., and Sokolov N. N., *D-amino acids in nature, agriculture and biomedicine*. *All Life*, **2019**. 13(1): p. 11-22.
11. Robbel L. and Marahiel M. A., *Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery*. *J Biol Chem*, **2010**. 285(36): p. 27501-8.
12. Velkov T., Roberts K. D., Nation R. L., Thompson P. E., and Li J., *Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics*. *Future Microbiology*, **2013**. 8(6): p. 711-24.
13. Halas C. J., *Nateglinide*. *American Journal of Health-System Pharmacy*, **2001**. 58(13): p. 1200–1205.
14. Gao X., Huang F., Feng J., Chen X., Zhang H., Wang Z., Wu Q., and Zhu D., *Engineering the meso-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum* by site saturation mutagenesis for D-phenylalanine synthesis*. *Appl Environ Microbiol*, **2013**. 79(16): p. 5078-81.
15. Akita H., Suzuki H., Doi K., and Ohshima T., *Efficient synthesis of D-branched-chain amino acids and their labeled compounds with stable isotopes using D-amino acid dehydrogenase*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2014**. 98(3): p. 1135-43.
16. Nguyen D. P., Sladek R. N., and Do L. H., *Scope and Limitations of Reductive Amination Catalyzed by Half-Sandwich Iridium Complexes Under Mild Reaction Conditions*. *Tetrahedron Lett*, **2020**. 61(32).
17. Kouznetsov V. V. and Galvis C. E. P., *Strecker reaction and α -amino nitriles: Recent advances in their chemistry, synthesis, and biological properties*. *Tetrahedron*, **2018**. 74(8): p. 773-810.
18. Slomka C., Spath G. P., Lemke P., Skoupi M., Niemeyer C. M., Syltatk C., and Rudat J., *Toward a cell-free hydantoinase process: screening for expression optimization and one-step purification as well as immobilization of hydantoinase and carbamoylase*. *AMB Express*, **2017**. 7(1): p. 122.
19. Zhou Z., Yao Z., Wang H. Q., Xu H., Wei P., and Ouyang P. K., *Improved enzymatic synthesis of N-carbamoyl-D-phenylalanine with in situ product recovery*. *Biotechnology and Bioengineering*, **2011**. 16(3): p. 611-616.

20. McCudden C. R. and Kraus V. B., *Biochemistry of amino acid racemization and clinical application to musculoskeletal disease*. *Clin Biochem*, **2006**. 39(12): p. 1112-30.
21. Pollegioni L., Rosini E., and Molla G., *Advances in Enzymatic Synthesis of D-Amino Acids*. *Int J Mol Sci*, **2020**. 21(9).
22. Akita H., Doi K., Kawarabayashi Y., and Ohshima T., *Creation of a thermostable NADP(+)-dependent D-amino acid dehydrogenase from *Ureibacillus thermosphaericus* strain A1 meso-diaminopimelate dehydrogenase by site-directed mutagenesis*. *Biotechnol Lett*, **2012**. 34(9): p. 1693-9.
23. Cirilli M., Scapin G., Sutherland A., Vederas J. C., and Blanchard J. S., *For the record: The three-dimensional structure of the ternary complex of *Corynebacterium glutamicum* diaminopimelate dehydrogenase-NADPH-L-2-amino-6-methylene-pimelate*. *Protein Science*, **2000**. 9(10): p. 2034-2037.
24. Akita H., Fujino Y., and Doi K., *Highly stable meso-diaminopimelate dehydrogenase from an *Ureibacillus thermosphaericus* strain A1 isolated from a Japanese compost: purification, characterization and sequencing*. *AMB Express*, **2011**. 1(1): p. 43.
25. Moore J. C., Savile C. K., Pannuri S., Kosjek B., and Janey J. M., 9.13 Industrially Relevant Enzymatic Reductions, in *Comprehensive Chirality*. **2012**. p. 318-341.
26. Sheldon R. A. and Woodley J. M., *Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry*. *Chem Rev*, **2018**. 118(2): p. 801-838.
27. Mohamad N. R., Marzuki N. H., Buang N. A., Huyop F., and Wahab R. A., *An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes*. *Biotechnol Biotechnol Equip*, **2015**. 29(2): p. 205-220.
28. Sheldon R. A. and van Pelt S., *Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how*. *Chem Soc Rev*, **2013**. 42(15): p. 6223-35.
29. Nguyen H. H. and Kim M., *An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization*. *Applied Science and Convergence Technology*, **2017**. 26(6): p. 157-163.
30. Brena B., Gonzalez-Pombo P., and Batista-Viera F., *Immobilization of enzymes: a literature survey*. *Methods Mol Biol*, **2013**. 1051: p. 15-31.
31. Anzar N., Hasan R., Tyagi M., Yadav N., and Narang J., *Carbon nanotube - A review on Synthesis, Properties and plethora of applications in the field of biomedical science*. *Sensors International*, **2020**. 1.
32. Toşa M. I., Paizs C., Irimie F.-D., Katona G., Poppe L., Bell E., Bencze L. C., and Bartha-Vári J. H., *Aminated Single-walled Carbon Nanotubes as Carrier for Covalent Immobilization of Phenylalanine Ammonia-lyase*. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, **2017**. 61(1).
33. Bencze L. C., Bartha-Vári J. H., Katona G., Tosa M. I., Paizs C., and Irimie F. D., *Nanobioconjugates of *Candida antarctica* lipase B and single-walled carbon nanotubes in biodiesel production*. *Bioresour Technol*, **2016**. 200: p. 853-60.
34. Sadri R., Zangeneh Kamali K., Hosseini M., Zubir N., Kazi S. N., Ahmadi G., Dahari M., Huang N. M., and Golsheikh A. M., *Experimental study on thermo-physical and rheological properties of stable and green reduced graphene oxide nanofluids: Hydrothermal assisted technique*. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **2017**. 38(9): p. 1302-1310.
35. Mateo C., Palomo J. M., Fuentes M., Betancor L., Grazu V., López-Gallego F., Pessela B. C. C., Hidalgo A., Fernández-Lorente G., Fernández-Lafuente R., and Guisán J. M., *Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins*. *Enzyme and Microbial Technology*, **2006**. 39(2): p. 274-280.
36. Shukla S. K., Mishra A. K., Arotiba O. A., and Mamba B. B., *Chitosan-based nanomaterials: a state-of-the-art review*. *Int J Biol Macromol*, **2013**. 59: p. 46-58.
37. Corporation P., *Enzyme Immobilization Resins 2021*, Purolite Corporation: Llantrisant, Wales.

38. Csuka P., Molnar Z., Toth V., Imarah A. O., Balogh-Weiser D., Vertessy B. G., and Poppe L., *Immobilization of the Aspartate Ammonia-Lyase from Pseudomonas fluorescens R124 on Magnetic Nanoparticles: Characterization and Kinetics*. *Chembiochem*, **2022**. 23(7): p. e202100708.
39. Vidu R., Rahman M., Mahmoudi M., Enachescu M., Poteca T. D., and Opris I., *Nanostructures: a platform for brain repair and augmentation*. *Front Syst Neurosci*, **2014**. 8: p. 91.
40. Camarero J. A., *Recent developments in the site-specific immobilization of proteins onto solid supports*. *Biopolymers*, **2008**. 90(3): p. 450-8.
41. Devaraj N. K. and Finn M. G., *Introduction: Click Chemistry*. *Chem Rev*, **2021**. 121(12): p. 6697-6698.
42. Hermanson G. T., *The Reactions of Bioconjugation*, in *Bioconjugate Techniques*. **2013**. p. 229-258.
43. Ghosh P. K., *Mass Spectrometry of Peptides and Proteins*, in *Introduction to Protein Mass Spectrometry*. **2016**. p. 135-219.
44. Camarero J. A., *New developments for the site-specific attachment of protein to surfaces*. *Biophysical Reviews and Letters*, **2006**. 1(1): p. 1-28.
45. Filip A. and Bencze C., *Biochimie avansată – Lucrări practice*. **2017**, Cluj-Napoca: Napoca Star.
46. Boros K., Moisa M. E., Nagy C. L., Paizs C., Tosa M. I., and Bencze L. C., *Robust, site-specifically immobilized phenylalanine ammonia-lyases for the enantioselective ammonia addition of cinnamic acids*. *Catal Sci Technol*, **2021**. 11(16): p. 5553-5563.
47. Ling X. M., Wang X. Y., Ma P., Yang Y., Qin J. M., Zhang X. J., and Zhang Y. W., *Covalent Immobilization of Penicillin G Acylase onto Fe₃O₄@Chitosan Magnetic Nanoparticles*. *J Microbiol Biotechnol*, **2016**. 26(5): p. 829-36.