

HETEROGÉN FÁZISÚ ENZIMES REAKCIÓK

HOMOGÉN ENZIMES REAKCIÓK:

Előnyök:


- a rendszer homogenitása,
- az enzim - izolálásán kívül –
- előkészítést nem igényel.

Gazdasági hátrányok:

- Az enzimek drágák, 1-10 \$/mg
- Csak egyszer használhatók fel, a reakció után elvesznek, illetve kinyerésük a reakcióelegyből bonyolult és drága.

Technológiai hátrány:

- szennyezik a terméket, tisztítását nehezítik.




BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 1

Az enzim immobilizáció története

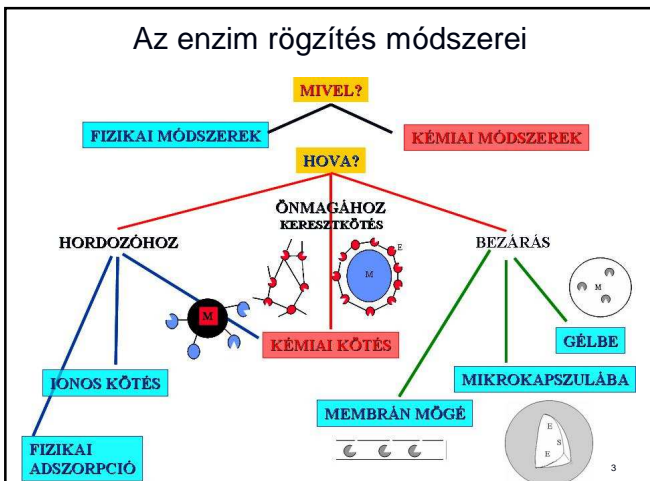
Nelson és Griffin 1916 ban véletlenül fedezte fel, hogy az elesztő invertáza aktív szénen adszorbeálódott, de megőrizte az aktivitását a szaharóz hidrolízisében.

Ipari gyakorlattá, illetve kereskedelmivé akkor vált, amikor Grubhofer és Schleith egy sor enzimet rögzítettek: karboxipeptidázt, diasztázt, pepszint és ribonukleázt. Ezeket diazotálással kötötték poli-aminoszirol gyantára kovalens kötéssel.

Az első ipari alkalmazás Chibata nevéhez fűződik, 1969-ben aminoacilázt rögzített DEAE Sephadex-re ionosan és ezt **N-acyl-D,L-aminosav** rezolválására használták.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 2



Kémiai módszerek

Kovalens kötés a reakció szempontjából nem-esszenciális aminosav-oldallánc és egy vízben nem oldódó, funkciós csoporttal ellátott hordozó mátrix között:



Hordozó:

természetes polimer: *agar, agaróz, kitin, cellulóz, kollagén,...*,
 szintetikus polimer: *poliuretán, polisztirol, nylon, ...*,
 szerves hordozók: *üveg, alumínium, szilikagél, magnetit,...*



Kémiai módszerek

Kovalens kötés kialakítása:

szabad α - vagy ω -COOH, α - vagy ω -NH₂ csoportok
 fenil, -OH, -SH vagy imidazol csoportok

Lépések:

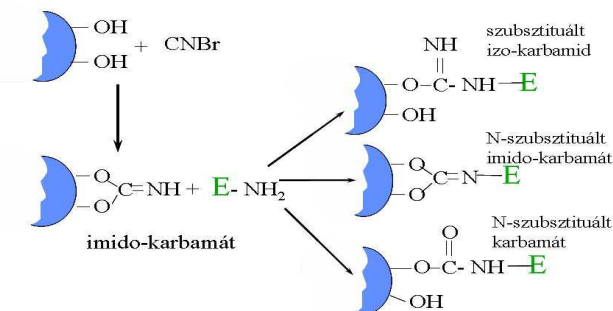
1. a hordozó aktiválása: KAR és -X (reaktív csoport) felvitele,
2. a kovalens kötés létrehozása az enzim és az aktivált hordozó között.

Az aktív centrum védelme: szubsztrát vagy analóg jelenléte

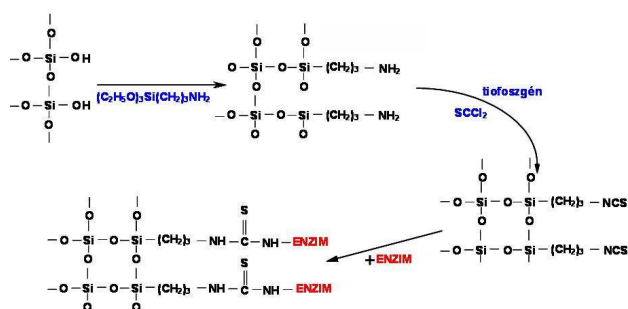


Kémiai módszerek: brómcian

MÁTRIX: vicinális -OH : cellulóz, sephadex sepharose



Kémiai módszerek: rögzítés üvegfelületre

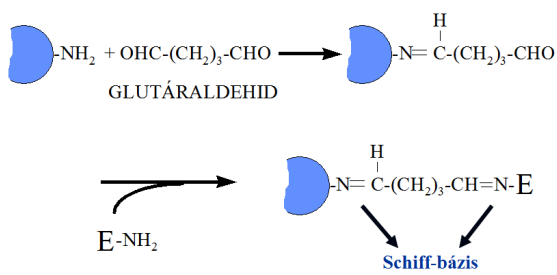


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 7

Kémiai módszerek: bifunkciós kötés

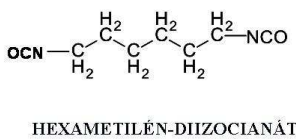
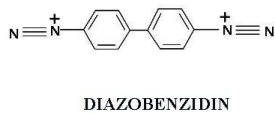
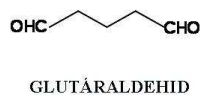
POLIFUNKCIÓS KÖTÉS

MÁTRIX: -NH_2 csoport : AE-CELLULÓZ, DEAE-CELLULÓZ, KÖLLAGÉN, KITIN, NYLON, stb



8

Kémiai módszerek: keresztkötések létrehozása



Kémiai módszerek: keresztkötések létrehozása

GLUTÁRALDEHID

OLIGO-GLUTÁRALDEHID

NH₂-ENZIM

N-ENZIM

Rendszerint inert fehérjével együtt immobilizálják (hordozó) (zselatin, albumin, kollagén, tojásfehérje).

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 10

CLEC: cross-linked enzyme crystals

Purine nucleoside phosphorylase (PNP)
 Cross-linked Enzyme crystal of PNP

Scanning electron microscopic view of CLEC laccase
 Surface area 2.456 (m²/g)

BME Alkalmazott Biotechnológi... 11

CLEA: cross-linked enzyme aggregation

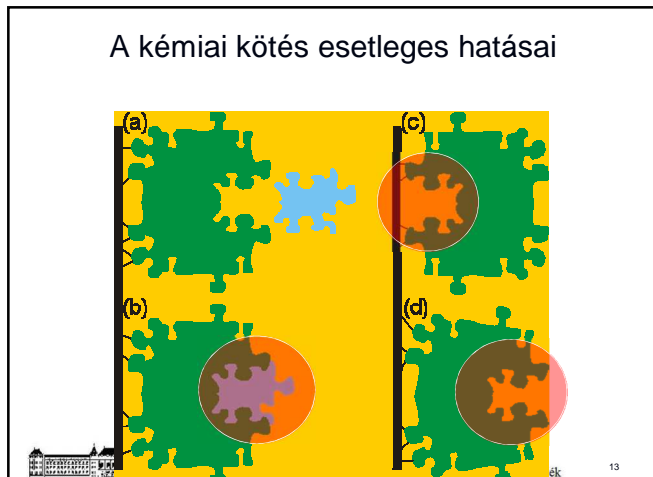
CLEA: precipitáció ((NH₄)₂SO₄ vagy BuOH) + keresztkötés
 Kombinálja a tisztítást és a rögzítést
 Glutáraldehid, de... lehet pl. dextrán-poliallehid

Előnyei:

- Egyszerű és sokféle enzimhez megfelelő módszer
- Tiszta és nem tisztított enzim preparátumokkal is végrehajtható
- Stabilitás hővel, szerves oldószerekkel és proteolízissel szemben
- Nem oldódik vizes környezetben (nem vész el kioldással az aktivitása)
- Combi CLEA: két vagy több enzim együtt immobilizálása

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 12

A kémiai kötés esetleges hatásai



FIZIKAI MÓDSZEREK

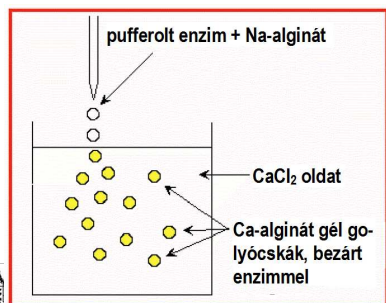
1. ADSZORPCIÓ (ioncserélőn – nem specifikus, könnyen leválik (pH))
2. GÉLBE ZÁRÁS
3. MIKROKAPSZULÁZÁS
4. MEMBRÁN „MÖGÉ” ZÁRÁS



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Fizikai módszerek: gélbe zárás

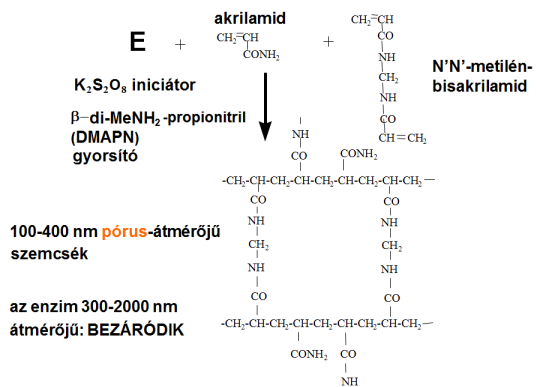
Alginát: β -mannuronsav-(1 \rightarrow 4)- α -guluronsav polimer.
Hidrofil, kolloid, egyenes láncú polimer, algákból.
Alginát képzés:



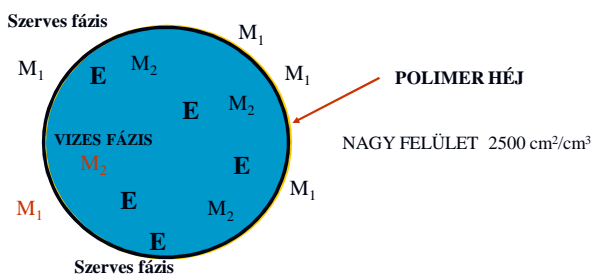
anszék

15

Fizikai módszerek: poli-akrilamid gélbe zárás

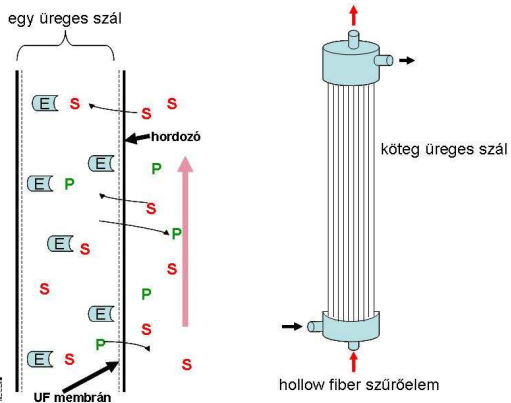


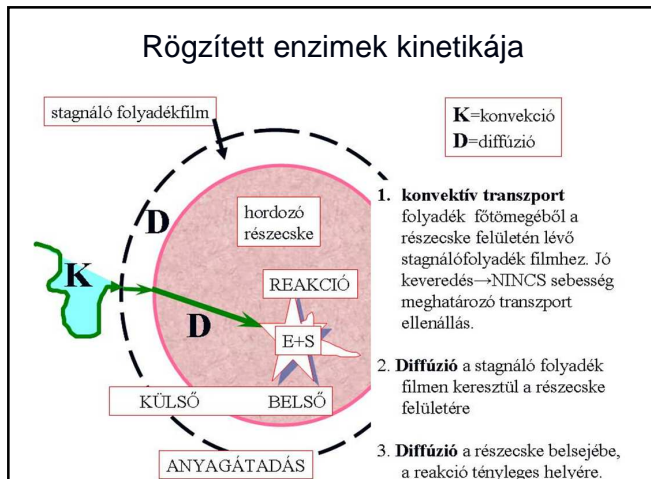
Fizikai módszerek: mikrokapszulázás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Fizikai módszerek: ultraszűrő membránok



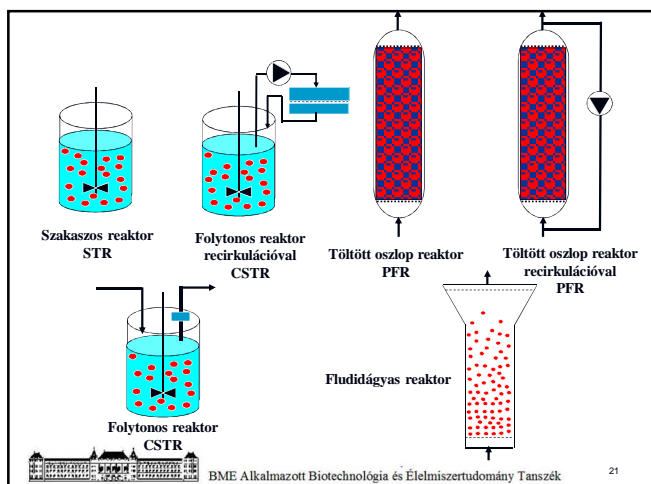


Rögzített enzimek

<p>Oldott enzimek</p> <p>Előnyök</p> <p>Hátrányok</p>	<ul style="list-style-type: none"> * Homogén rendszer * Előkészítés nincs * Csak reakció-rezsim van * Drágák 1-10-50 \$/mg * Elvesznek * A terméket szennyezik * Csak szakaszos technológia
<p>Rögzített enzimek</p> <p>Előnyök</p> <p>Hátrányok</p>	<ul style="list-style-type: none"> * nem szennyezik a terméket * Könnyen elválaszthatók * Újrafelhasználási lehetőség * Folytonos technológia is általános előnyei * Könnyű terminálás * Stabilabb lehet * a rögzítés költséges (előkészítés) * Csökken az enzim aktivitása * Diffúziós gát (transzport-rezsim is)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20



Rögzített enzimek

Aminoaciláz	D,L-aminosavak reszolválása
Glükóz izomeráz	Glükóz → fruktóz konverzió
Penicillin amidáz	Penicillin oldallánc csere
β-galaktózidáz	Tejucukor hidrolízise (savó)
Lipáz	Zsírok elszappanosítása
Nitril-hidratáz	Akrilnitril → akrilamid
Aszpartáz	L-aszparaginsav előállítás

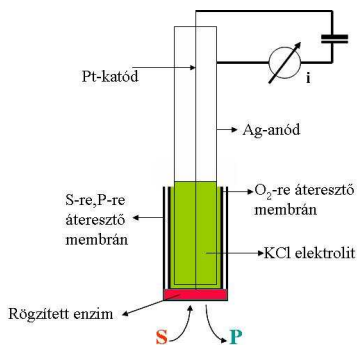


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

Enzimelektrodok: amperometria

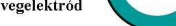
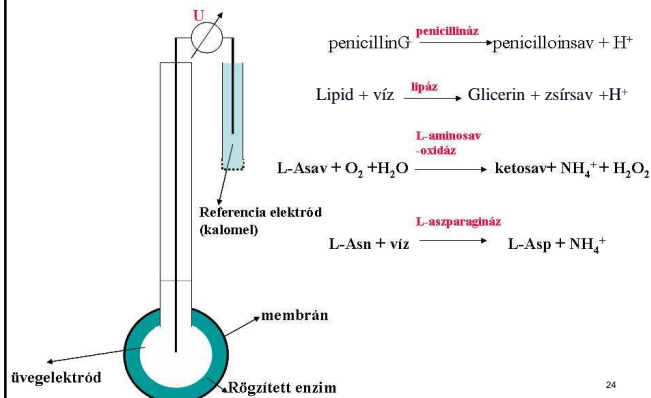
Ez voltaképpen egy oldott oxigén mérő elektród, amelyre a membránok közé glükóz-oxidázt és katalázt rögzítettek. A két enzim által termelt oxigént méri amperetriásan az elektróda.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

Enzimelektrodok: potenciometria

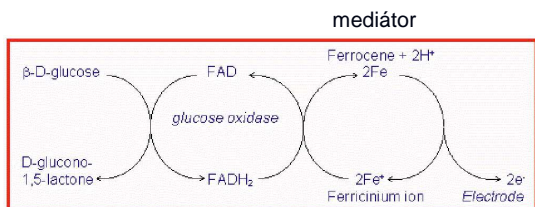


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

Enzimelektrodok: elektronátadás

Ha az enzim reakció során elektronátmenet történik (NAD-, FAD-mediált reakciók), az elektronátadás közvetlenül mérhető jellé alakítható:



BIOSZENZOR

