

HETEROGÉN FÁZISÚ ENZIMES REAKCIÓK

HOMOGEN 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.



Az enzim immobilizáció története

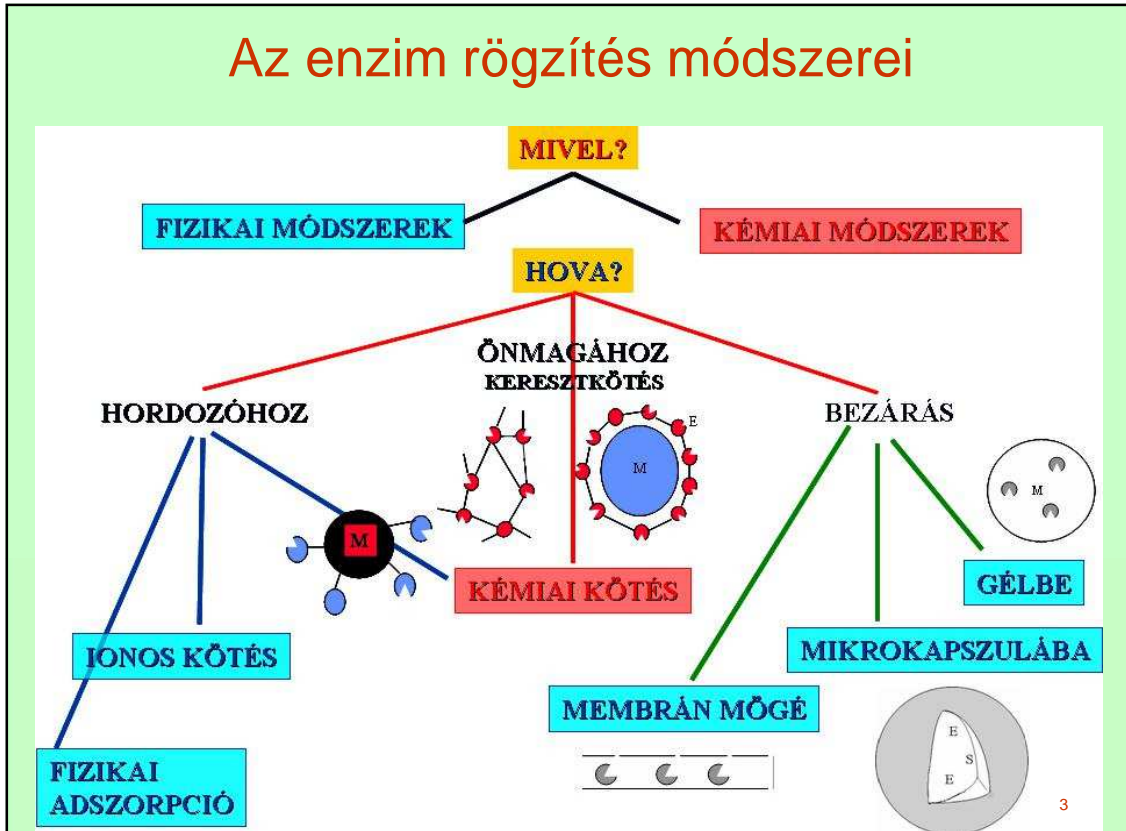
Nelson és Griffin 1916-ban véletlenül fedezte fel, hogy az élesztő invertáza aktív szénen adszorbeálódott, de megőrizte az aktivitását a szaharóz hidrolízisében.

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

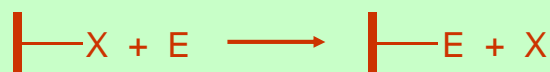


Az enzim rögzítés módszerei



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, ...*

szervetlen 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:

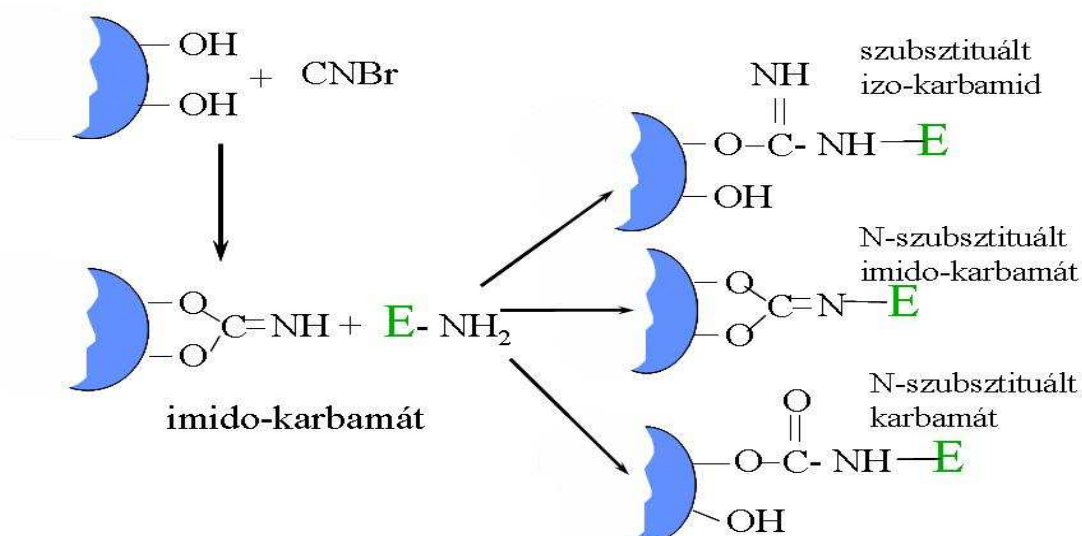
1. a hordozó aktiválása: KAR és -X (reaktív csoport) felvitele,
2. a kovalens kötés létrehozása az enzim és az aktivált hordozó között.

Az aktív centrum védelme: szubsztrát vagy analóg jelenléte

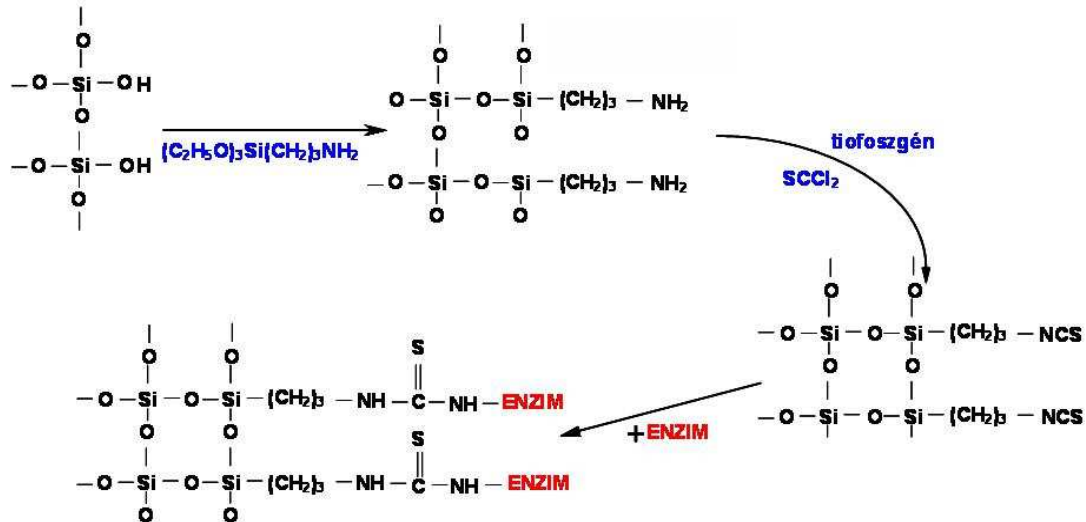


Kémiai módszerek: brómcian

MÁTRIX: **vicinális -OH :** cellulóz, sephadex
sepharose



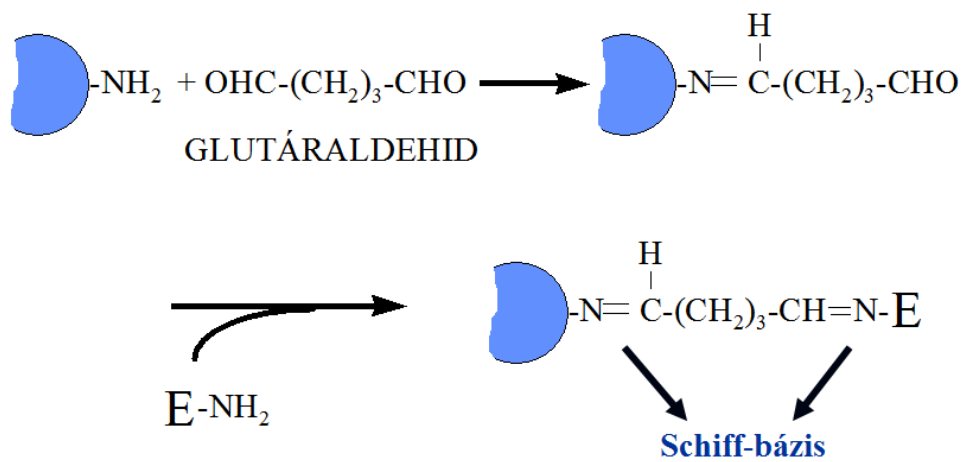
Kémiai módszerek: rögzítés üvegfelületre



Kémiai módszerek: bifunkciós kötés

POLIFUNKCIÓS KÖTÉS

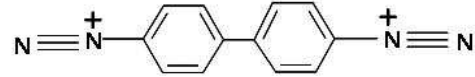
MÁTRIX: $-\text{NH}_2$ csoport : AE-CELLULÓZ, DEAE-CELLULÓZ, KOLLAGÉN, KITIN, NYLON, stb



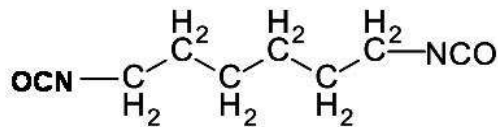
Kémiai módszerek: keresztkötések létrehozása



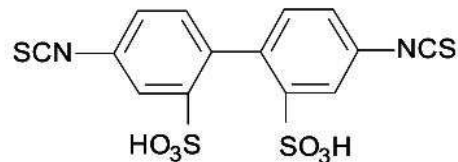
GLUTÁRALDEHID



DIAZOBENZIDIN

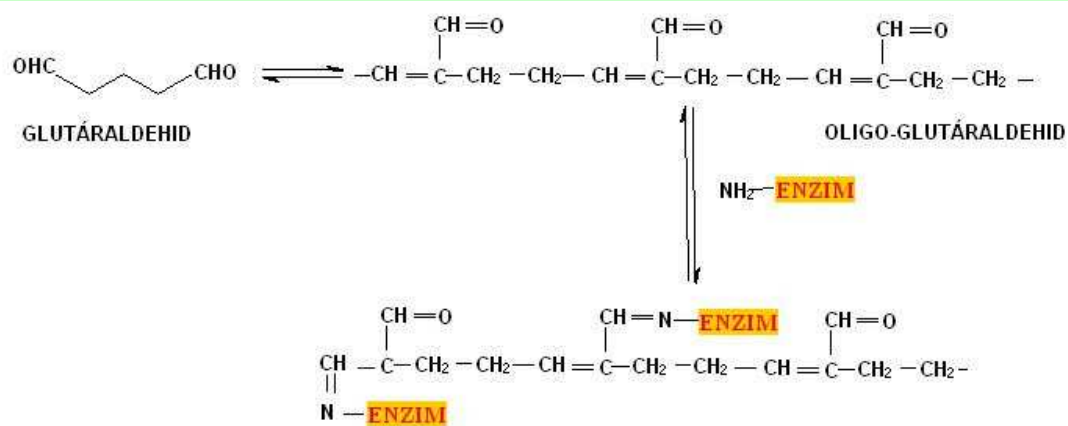


HEXAMETILÉN-DIIZOCIANÁT



4,4'-DIIZOCIANÁTO-BIFENIL-
-2,2'-DISZULFONSÁV

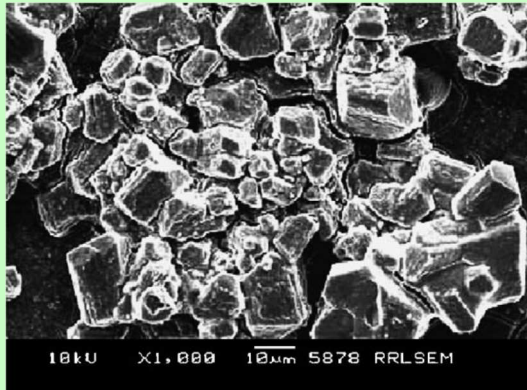
Kémiai módszerek: keresztkötések létrehozása



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



CLEC: cross-linked enzyme crystals



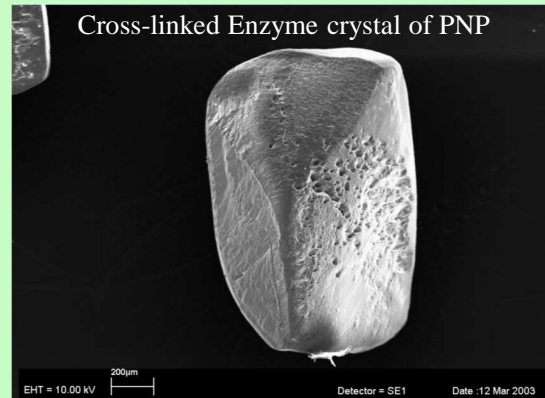
Scanning electron microscopic view of CLEC laccase

Surface area 2.456 (m²/g)



BME Alkalmazott Biotechnológia

Purine nucleoside phosphorylase (PNP)



Cross-linked Enzyme crystal of PNP

EHT = 10.00 kV 200µm Detector = SE1 Date = 12 Mar 2003



CLEA: cross-linked enzyme aggregation

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

Előnyei:

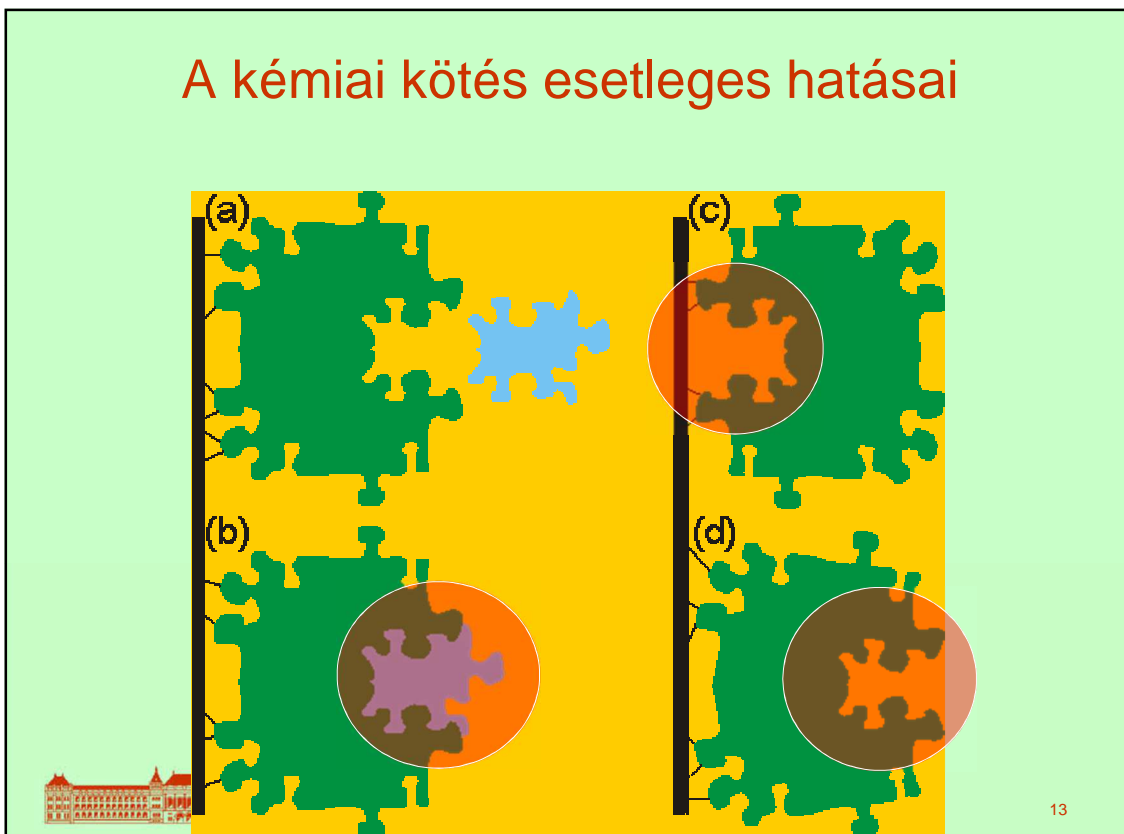
- Egyszerű és sokféle enzimhez megfelelő módszer
- Tiszta és nem tisztított enzim preparátumokkal is végrehajtható
- Stabilitás hővel, szerves oldószerekkel és proteolízissel szemben
- Nem oldódik vizes környezetben (nem vesz el kioldással az aktivitása)
- Combi CLEA: két vagy több enzim együtt immobilizálása



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

A kémiai kötés esetleges hatásai



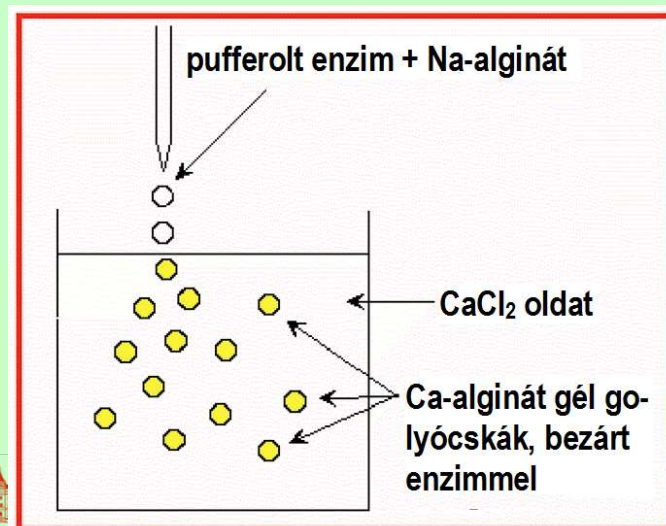
FIZIKAI MÓDSZEREK

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



Fizikai módszerek: gélbe zárás

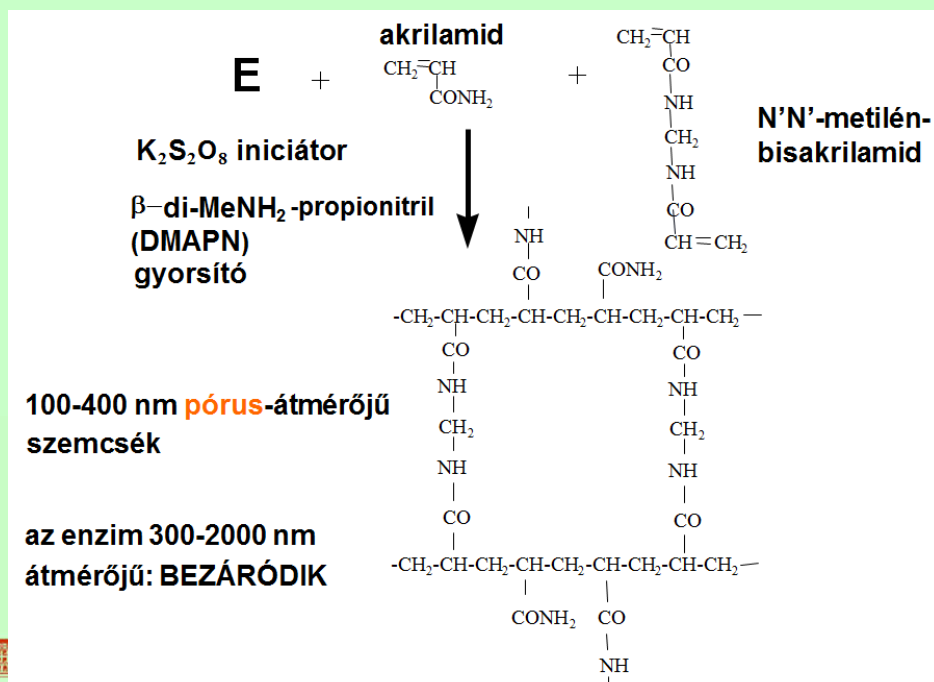
Alginát: β -mannuronsav-(1 \rightarrow 4)- α -guluronsav polimer.
 Hidrofil, kolloid, egyenes láncú polimer, algákból.
 Alginát képzés:



ék

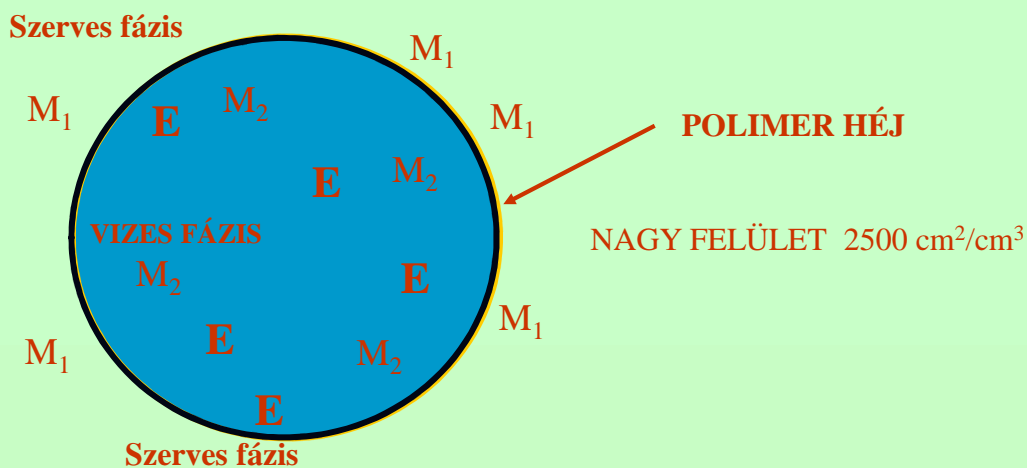
15

Fizikai módszerek: poli-akrilamid gélbe zárás

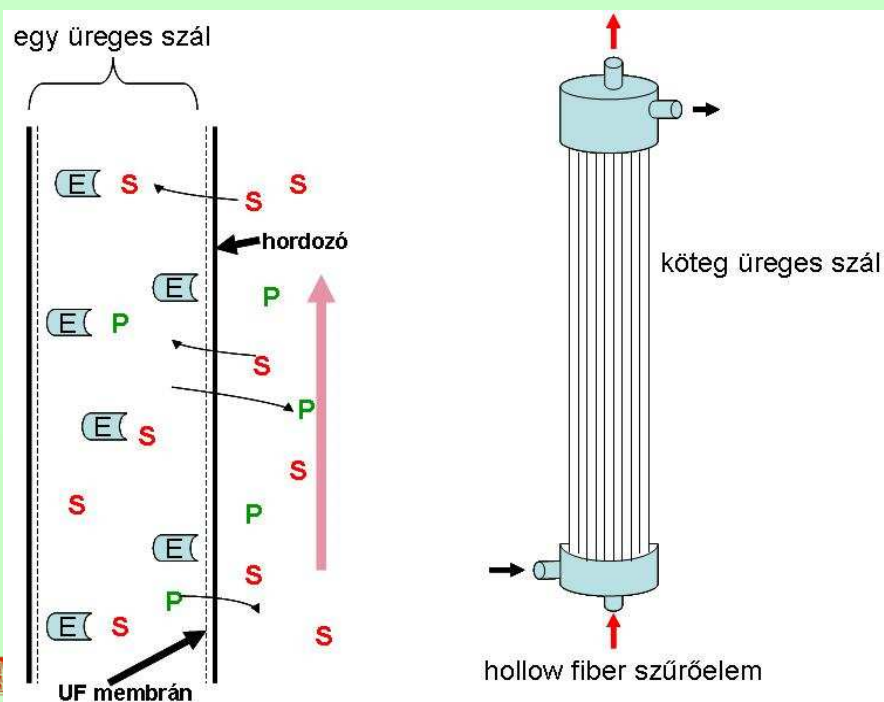


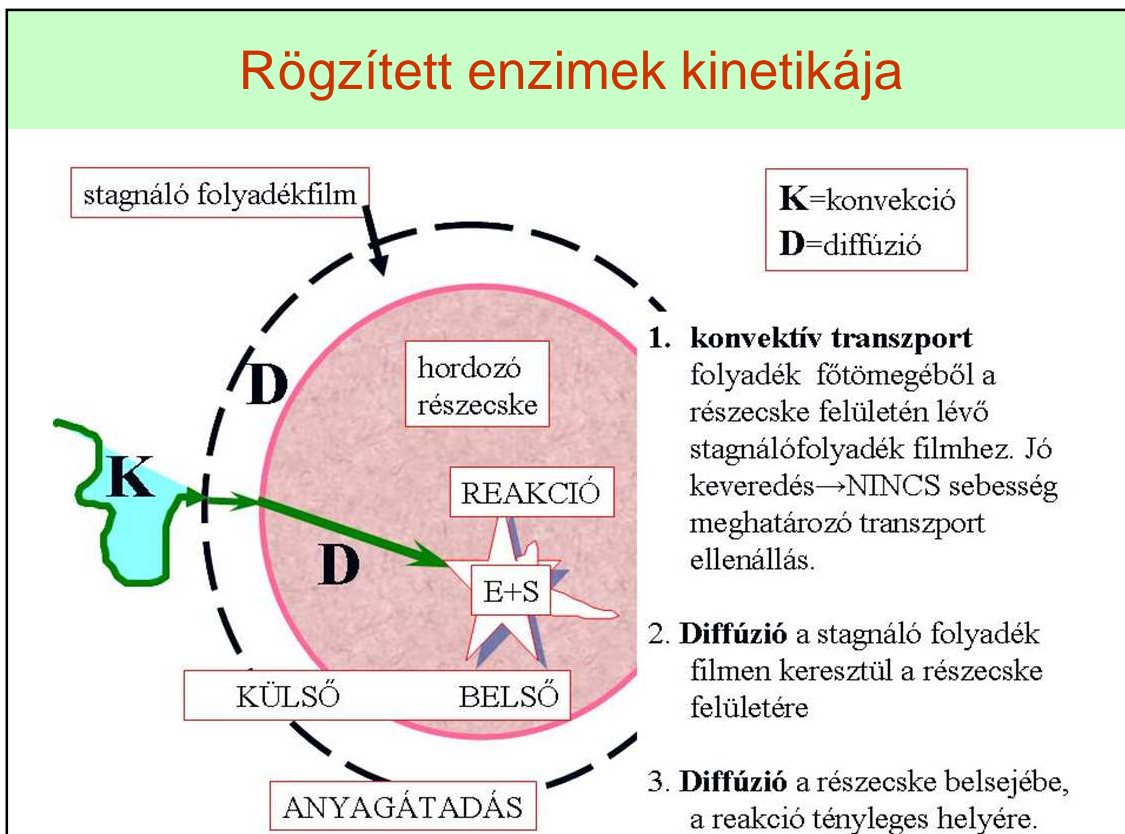
16

Fizikai módszerek: mikrokapszulázás



Fizikai módszerek: ultraszűrő membránok



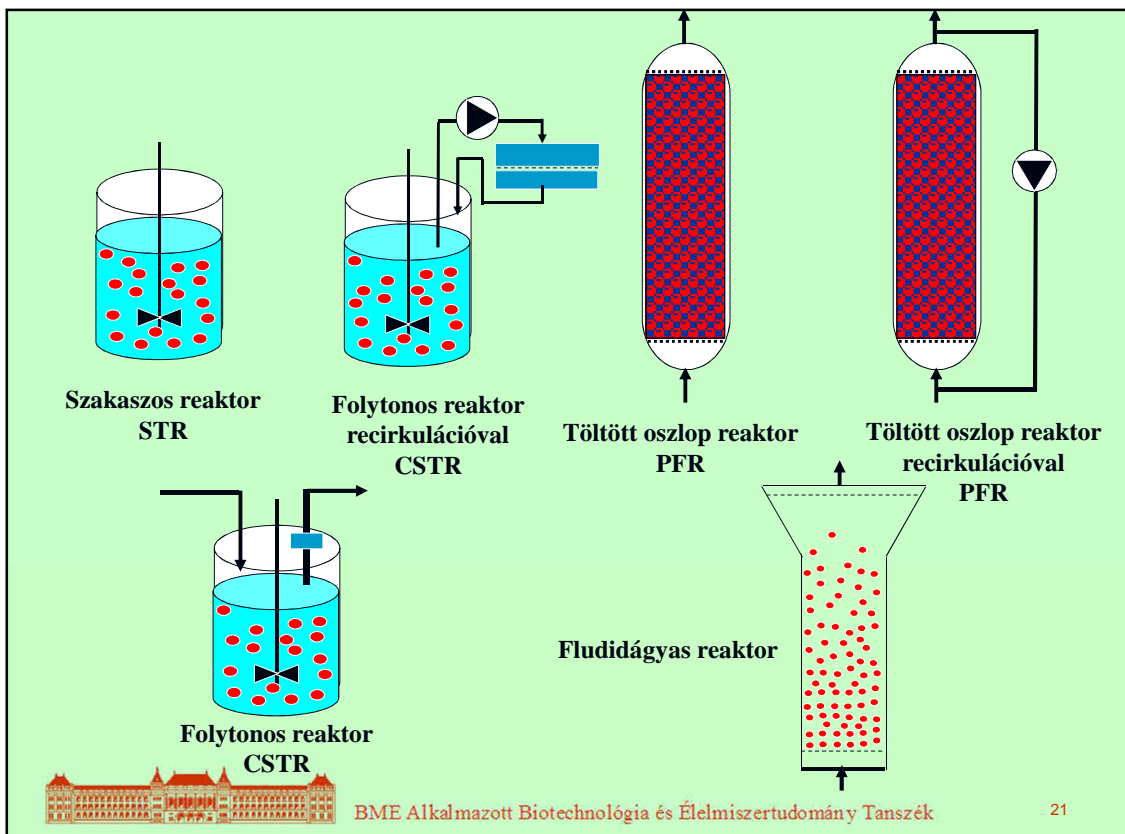


Rögzített enzimek

<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 isáltalános 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



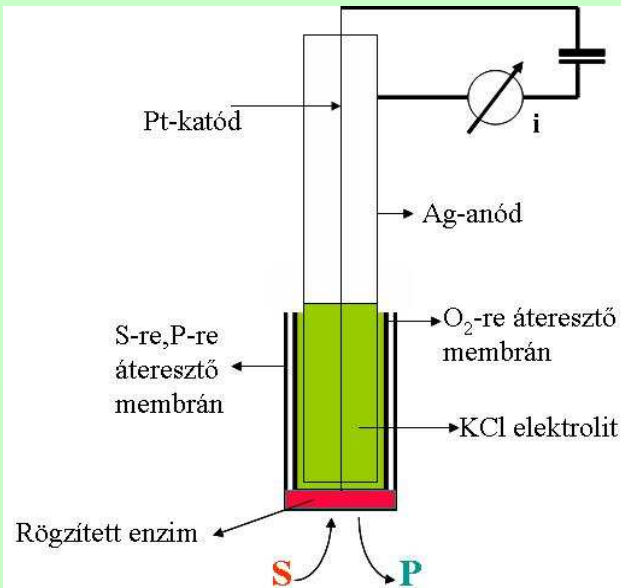
Rögztített enzimek

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



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 amperometriásan az elektróda.



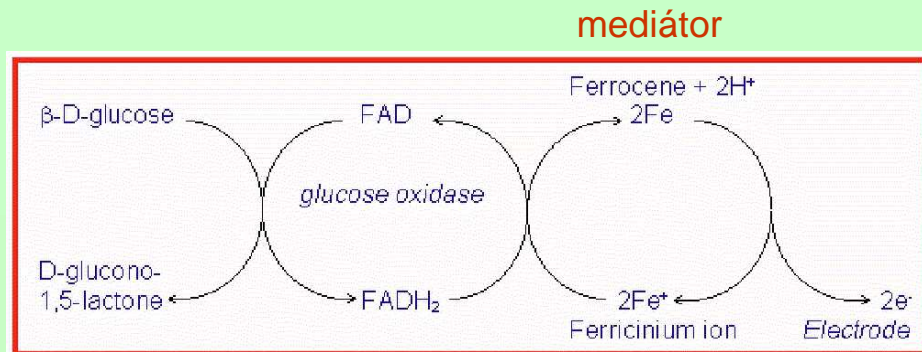
Enzimelektrodok: potenciometria

$\text{penicillinG} \xrightarrow{\text{penicillináz}} \text{penicilloinsav} + \text{H}^+$
 $\text{Lipid} + \text{víz} \xrightarrow{\text{lipáz}} \text{Glicerín} + \text{zsírsav} + \text{H}^+$
 $\text{L-Asav} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{L-aminosav-oxidáz}} \text{ketosav} + \text{NH}_4^+ + \text{H}_2\text{O}_2$
 $\text{L-Asn} + \text{víz} \xrightarrow{\text{L-aszparagináz}} \text{L-Asp} + \text{NH}_4^+$

üvegelektrod
 Referencia elektród (kalomel)
 membrán
 Rögzített enzim

Enzimelektrodok: elektronátadás

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



BIOSZENZOR

