

## 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.



## Kémiai módszerek

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



### Hordozó:

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



## 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-aminosztirol 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.



## Kémiai módszerek

### Kovalens kötés kialakítása:

szabad  $\alpha$ - vagy  $\omega$ -COOH,  $\alpha$ - vagy  $\omega$ -NH<sub>2</sub> csoportok  
 fenil, -OH, -SH vagy imidazol csoportok

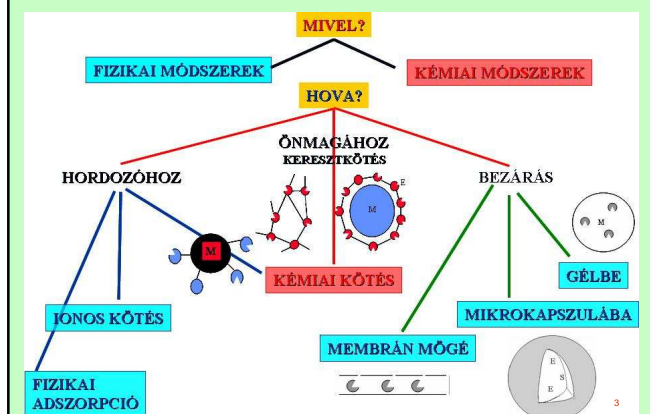
### Lépések:

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

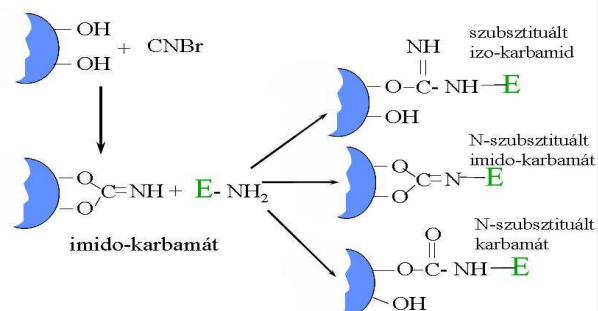


## Az enzim rögzítés módszerei

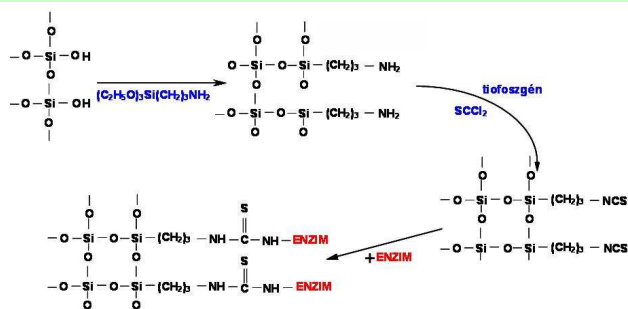


## Kémiai módszerek: brómcján

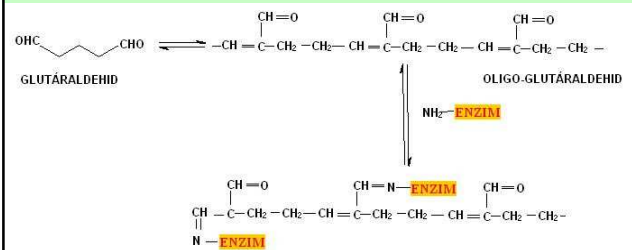
MÁTRIX: **vicinális -OH** : cellulóz, sephadex, sepharose



### Kémiai módszerek: rögzítés üvegfelületre



### Kémiai módszerek: keresztkötések létrehozása

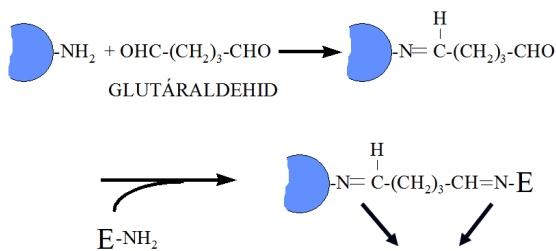


Rendszerint inert fehérjével együtt immobilizálják (hordozó) (zselatin, albumin, kollagén, tojásfehérje).

### Kémiai módszerek: bifunkciós kötés

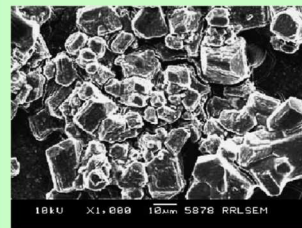
#### POLIFUNKCIÓS KÖTÉS

MÁTRIX: -NH<sub>2</sub> csoport : AE-CELLULÓZ, DEAE-CELLULÓZ, KOLLAGÉN, KITIN, NYLON, stb

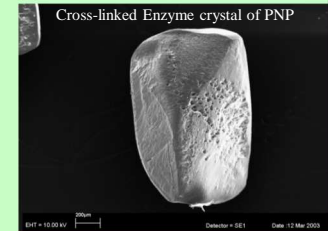


### CLEC: cross-linked enzyme crystals

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



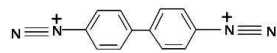
Scanning electron microscopic view of CLEC lacase  
Surface area 2.456 (m<sup>2</sup>/g)



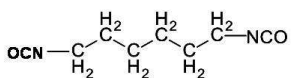
### Kémiai módszerek: keresztkötések létrehozása



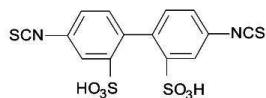
GLUTÁRALDEHID



DIAZOBENZIDIN



HEXAMETILÉN-DIIZOCIANÁT



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

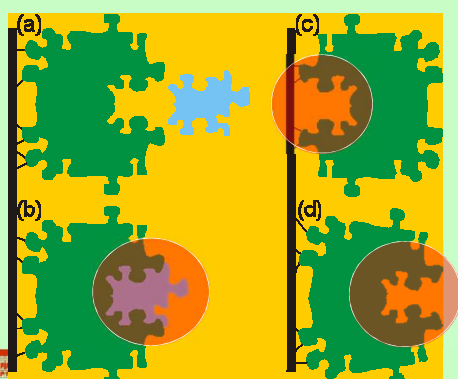
### CLEA: cross-linked enzyme aggregation

**CLEA:** precipitáció ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> vagy BuOH) + keresztkötés  
Kombinálja a tisztítást és a rögzítést  
Glutáraldehid, de... lehet pl. dextrán-poliáldehid

#### Előnyei:

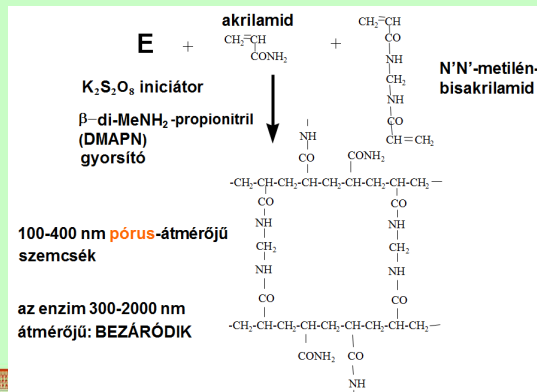
- > Egyszerű és sokféle enzimhez megfelelő módszer
- > Tiszta és nem tisztított enzim preparátumokkal is végrehajtható
- > Stabilitás hővel, szerves oldószerekkel és proteolízissel szemben
- > Nem oldódik vizes környezetben (nem vész el kioldással az aktivitása)
- > Combi CLEA: két vagy több enzim együtt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

### A kémiai kötés esetleges hatásai



13

### Fizikai módszerek: poli-akrilamid gélbe zárás



16

### FIZIKAI MÓDSZEREK

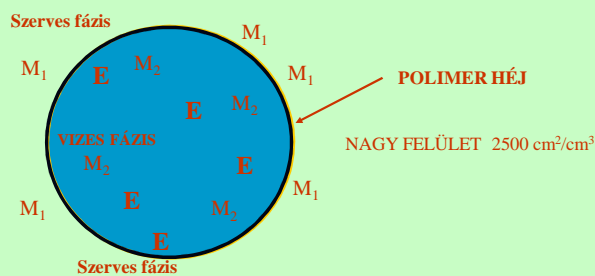
1. ADSZORPCIÓ (ioncserélőn – nem specifikus, könnyen leválik (pH))
2. GÉLBE ZÁRÁS
3. MIKROKAPSZULÁZÁS
4. MEMBRÁN „MÖGÉ” ZÁRÁS



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

### Fizikai módszerek: mikrokapszulázás

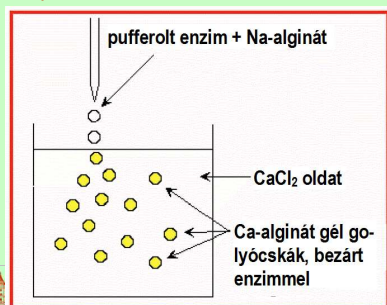


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

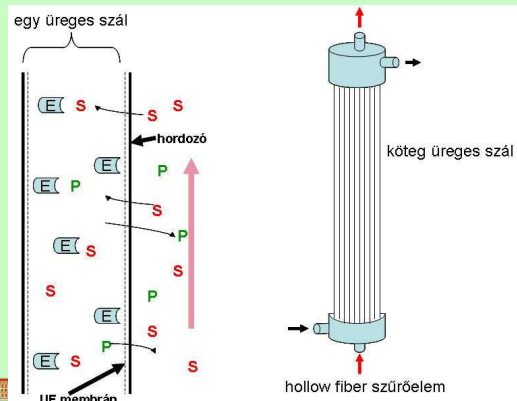
### Fizikai módszerek: gélbe zárás

Alginát:  $\beta$ -mannuronsav-(1→4)- $\alpha$ -guluronsav polimer. Hidrofil, kolloid, egyenes láncú polimer, algákból. Alginát képzés:

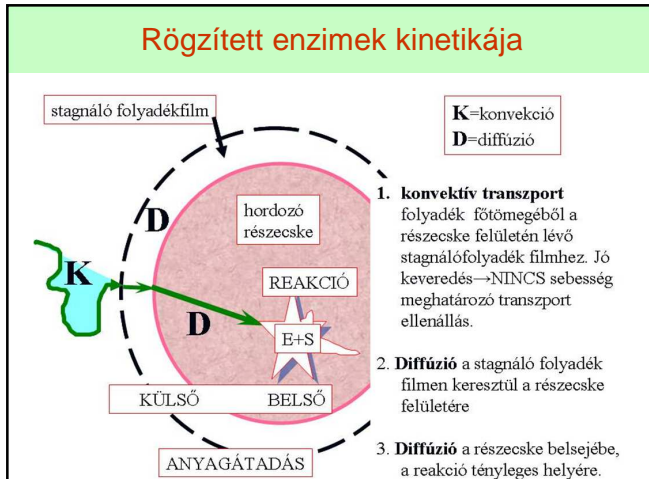


15

### Fizikai módszerek: ultraszűrő membránok



18



### Rögzített enzimek

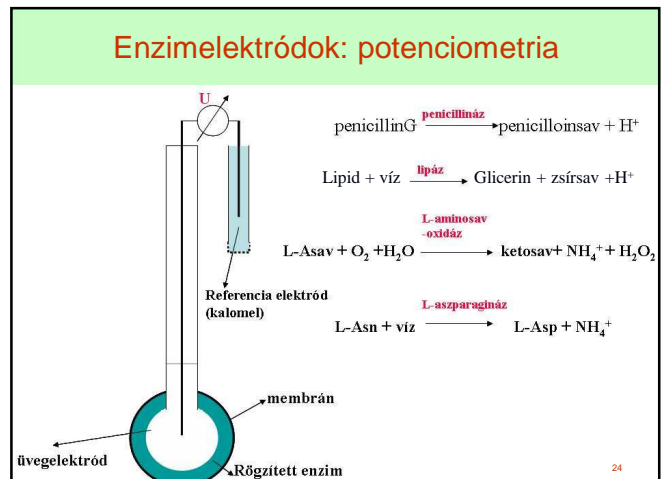
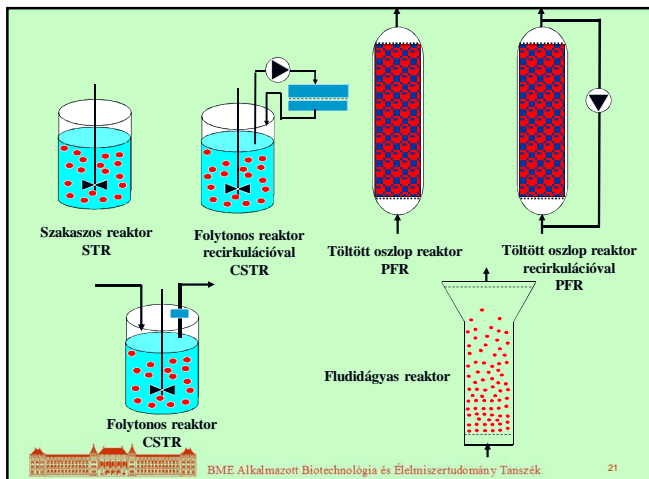
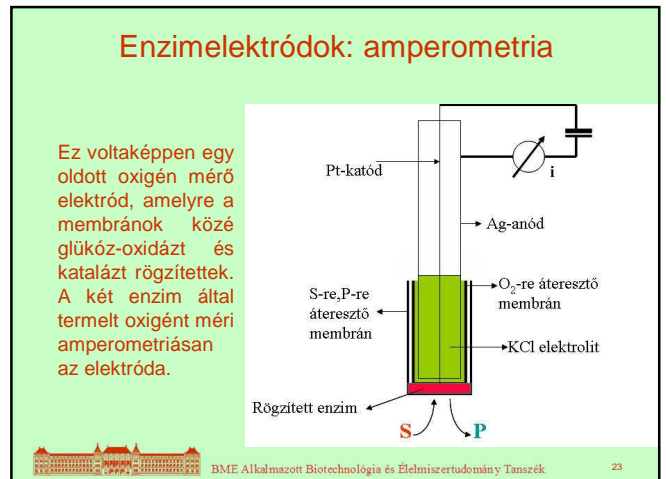
Aminoaciláz	D,L-aminosavak reszolválása
Glükóz izomeráz	Glükóz → fruktóz konverzió
Penicillin amidáz	Penicillin oldallánc csere
β-galaktózidáz	Tejcurkor hidrolízise (savó)
Lipáz	Zsírok elszappanosítása
Nitril-hidratáz	Akrilnitril → akrilamid
Aszpartáz	L-aszparaginsav előállítás

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 22

### Rögzített enzimek

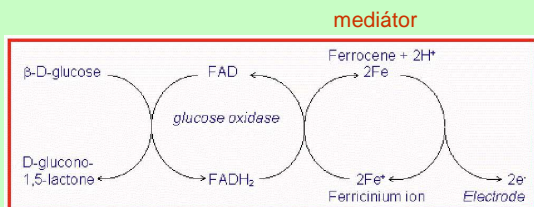
<b>Oldott enzimek</b>	
<b>Előnyök</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Homogén rendszer</li> <li>* Előkészítés nincs</li> <li>* Csak reakció-rezsim van</li> </ul>
<b>Hátrányok</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Drágák 1-10-50 \$/mg</li> <li>* Elvesznek</li> <li>* A terméket szennyezik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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 20



## Enzimelektrodok: elektronátadás

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



## BIOSZENZOR

