

HETEROGÉN FÁZISÚ ENZIMES REAKCIÓK

Immobilizált/rögzített enzimek



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

HETEROGÉN FÁZISÚ ENZIMES REAKCIÓK

ELŐNYÖK/HÁTRÁNYOK

- Előny: ➤ 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

2

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.

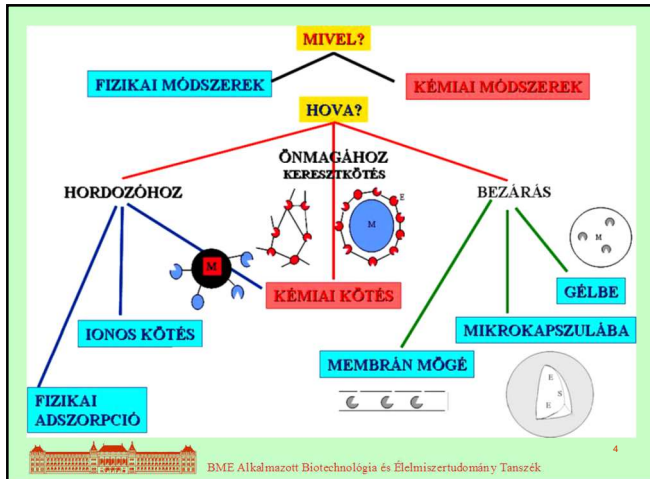
Ipari gyakorlatát illetve kereskedelmivé akkor vált, amikor Grubhofer és Schleith egy sor enzimet rögzítettek: karboxipeptidázt, diasztázt, pepszint és ribonukleázt. Ezeket diazotálással kovalens kötéssel poli-aminosztírol gyantára rögzítették.

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

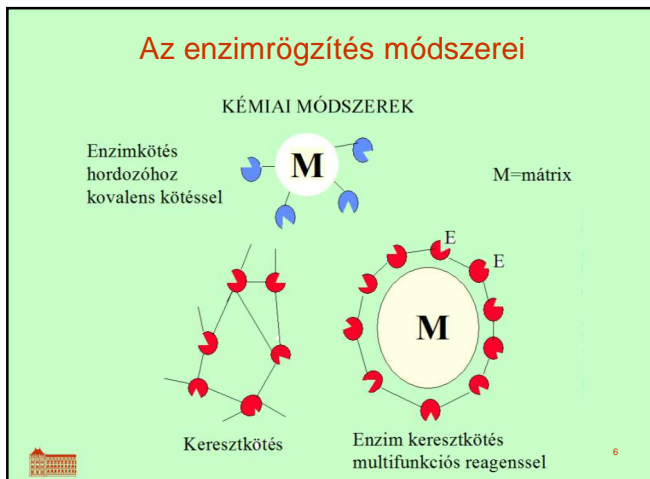


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3








Kémiai módszerek

Kovalens kötés az enzim nem esszenciális aminosav-oldallánca és egy vízben nem oldódó, funkciócsoporthal ellátott hordozó mátrix között.

$$\text{—X} + \text{E} \longrightarrow \text{—E} + \text{X}$$

Hordozó lehet:

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



7


Kémiai módszerek

Kovalens kötés kialakítása:
 szabad α -, β - vagy γ -COOH, α -, β -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: S v. analogon jelenléte



8

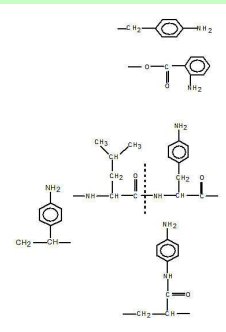

Kémiai módszerek: diazotálás

p-NH₂-benzil-cellulóz
 p-NH₂-benzoi-cellulóz

SEPHADEX: amino-benzoil származék
 Amino kopolimerek:
 poli(-L-Leu+pNH₂-D,L-Phe)

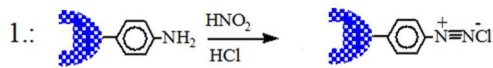
Polisztirol származék

Poliakrilamid származék
 (BIOGEL, ENZACRYL)

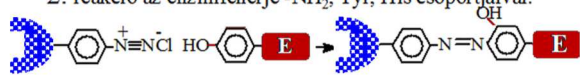



9

Kémiai módszerek: diazotálás

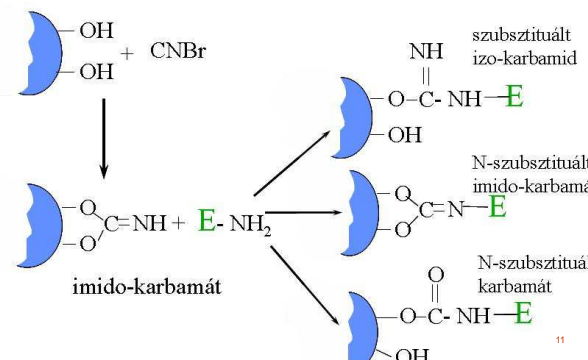
1.: 

2. reakció az enzimefehérje -NH₂, Tyr, His csoportjaival:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 10

MÁTRIX: vicinális -OH : cellulóz, sephadex sepharose



11

A szénhidrát mátrixok eredete

Glükóz → dextrán → Sephadex®

Tengeri alga → agar(óz) → Sepharose®

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 12

KÉMIAI MÓDSZEREK 4

Az enzim fenil-, amin-, SH-csoportjainak (■) ALKILEZÉSE

MÁTRIX: METAKRILÁT és CELLULÓZ származékok homo- és kopolimerjei

13

KÉMIAI MÓDSZEREK: rögzítés üvegfelületre

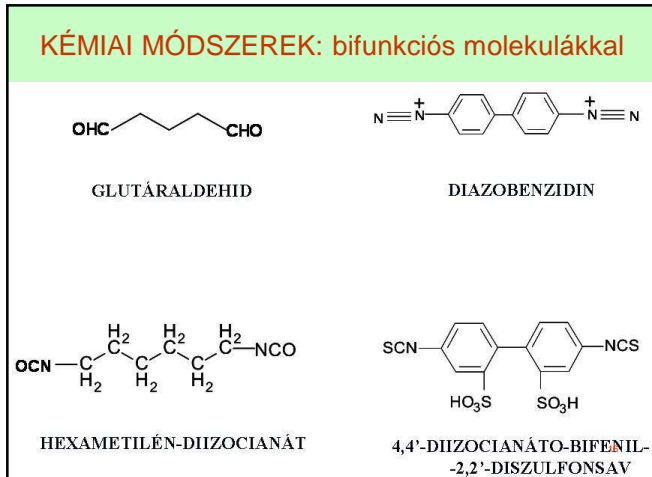
14

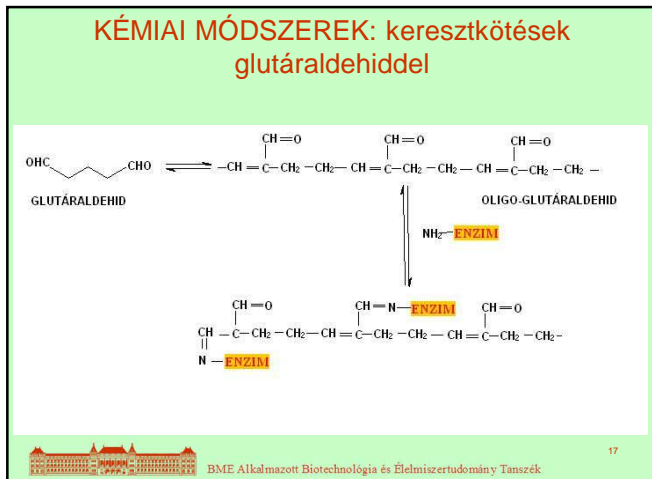
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

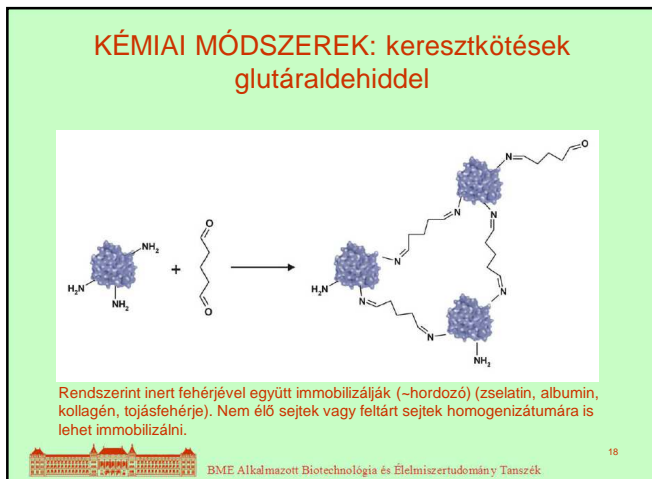
KÉMIAI MÓDSZEREK: bifunkciós molekulákkal

Mátrix: -NH₂ csoport: AE-cellulóz, DEAE-cellulóz, kollagén, kitin, Nylon,....

15







KÉMIAI MÓDSZEREK: keresztkötések glutáraldehiddel

Példa: kataláz keresztkötéses immobilizálása

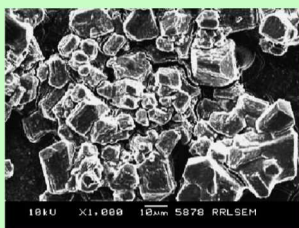
1. Kristályos katalázt oldunk 10%-os NaCl-ben és 0,05 M foszfát pufferrel hígítjuk, míg a kataláz cc. 2 mg/ml lesz.
2. 4 ml 4 %os glutáraldehidet ua pufferben 4 ml-hez adunk és kb egy órát szobahőmérsékleten kevertetjük, amíg zöld rögzös csapadék nem válik le. (Egy éjszakán át hidegszobában kezelve hasonló eredményekre jutunk).
3. Centrifugálás (5 min 4000 rpm) és ismételt mosás 10% NaCl-dal (6-8x), amíg a szupernatánsban már nincs kataláz aktivitás.
4. Homogenizálás.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

CLEC = Cross-Linked Enzyme Crystals



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

Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase. J. J. Roy, T. E. Abraham Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 38 (2006) 31–36

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

CLEA = Cross-Linked Enzyme Aggregates

CLEA: precipitáció + keresztkötés
 Kombinálja a tisztítást és a rögzítést
 Glutáraldehid, de.... Pl. dextránpollialhehid
 Előnyei:

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



Alcalase-CLEA

Mindkettő (CLEC, CLEA) jó vizes és szerves fázisokban megvalósuló biotranszformációkra



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

A kémiai kötés esetleges hatásai: aktivitáscsökkenés

(a) (b) (c) (d)

22

FIZIKAI MÓDSZEREK

1. Adszorpció, pl *ioncserélőn* – nem specifikus, könnyen leválik (pH)
2. Gélbe zárás
3. Mikrokapszulázás
4. Membrán „mögé” zárás

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

Fizikai módszerek

Gélbe zárás: pl. alginát képzés

ALGINÁT: poli-β D-mannuronsav (1→4),-guluronsav

Hidrofíl, kolloid, egyenes láncú polimer

forrása: *Macrocystis pyrifera*

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

Példa: élesztő alginát gélbe zárása

Példa: *S. cerevisiae* rögzítése kalcium alginátban

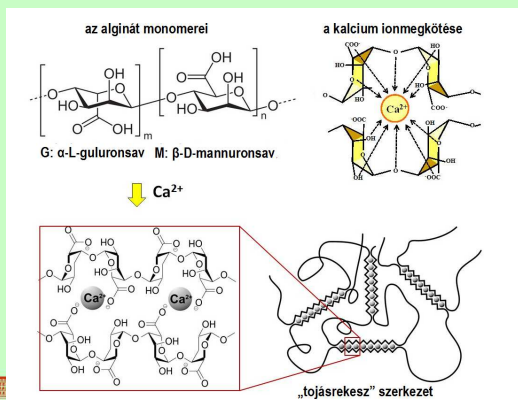
1. 25 g nedves tömegű *S. cerevisiae* sejtömeget szuszpendáljunk fel steril vízben és jól keverjük össze 50 ml 4%-os nátrium-alginát oldattal.
2. A keletkező szuszpenziót nyomjuk keresztül egy szűk csövön (pipettahegy, kb 1 mm átmérő) és csepegtessük bele 50 mM-os pH=6-8 CaCl₂ oldatba.
3. A keletkező 2,8-3 mm átmérőjű golyókat inkubáljuk 20-22 °C-on CaCl₂ oldatban, hogy megkeményedjenek a gél szemcsék.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

A Ca-alginát gél szerkezete

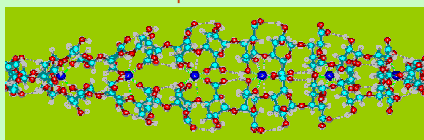


26

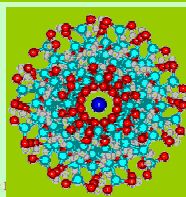
A Ca-alginát gél szerkezete

A Ca-ionokat közrezáró két lánc spirált alkot:

Oldalnézet:



Keresztmetszeti nézet:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

Alginát: mannuronsav, guluronsav 1,4 glikozidos heteropolimerje

polianionos

Oldat: víz **gél: Ca²⁺, Zn²⁺, Al³⁺**

κ -karragén: galaktóz és 3,6 anhidro-galaktóz helikális biopolimerje

polianionos

Oldat: víz **gél: Ca²⁺, K⁺**

Kitozán: részlegesen dezacetilezett N-acetilglükózamin polimer

polikationos

Oldat: ecetsavas víz **gél: polifoszfátok, pH változás**

Fizikai módszerek: poli-akrilamid gélbe zárás

A poli-akrilamid láncokat bis-akrilamid keresztkötésekkel kopolimerizálva térhálósítjuk → gél.

Ha laza a gél → a fehérje vándorol benne → elektroforézis.

Sűrűre kell venni – 100-400 nm pórusméret – hogy az enzim (300-2000 nm) „beszoruljon”. Két-három mm-es gyöngök.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

Fizikai módszerek: poli-akrilamid gélbe zárás

n_1 [Acrylamide] + n_2 [N,N'-methylenebisacrylamide]

Ammonium Persulfate

TEMED

The Polyacrylamide Matrix

Példa: *E. coli* gélbezárása poliakrilamiddal

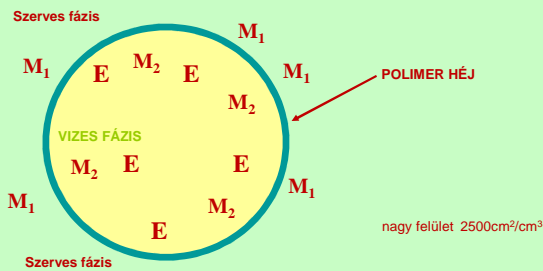
1. 4 ml fizsóban 1 g centrifugált baktériumsejtet szuszpendálunk
2. A szuszpenzióhoz 0,75 g akrilamid monomert, 40 mg bis-akrilamidot, 5% DMAPN-t adunk.
3. Inert gáz buborékolatásával kiűzzük az oxigén nyomait is, mert az oxigén megakadályozza a polimerizációt.
4. 0,5 ml 2,5%-os K-perszulfát hozzáadásával indítjuk a reakciót.
5. 37 °C-on keverés mellett inkubáljuk 30 percig, amíg bepolimerizálódik.
6. A megfelelő alakú szemcsék kialakulása után fizsóval mossuk



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

**Fizikai módszerek: mikrokapszulázás
 állandó polimer membrános mikrokapszulák**

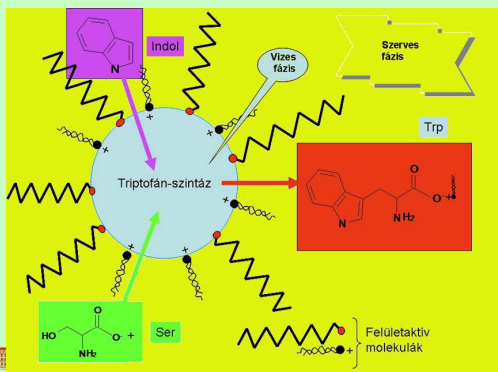


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

32

Fizikai módszerek: mikrokapszulázás

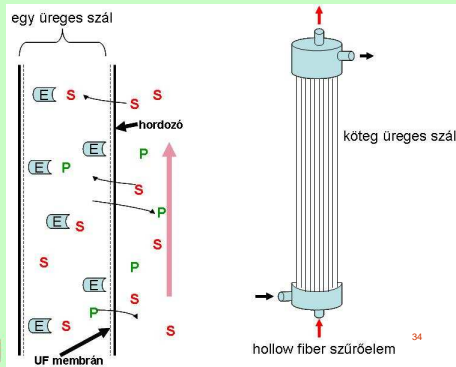
Nem állandó membrános koacervátumok: pl. reverz micellák



33

Fizikai módszerek: bezárás ultraszűrő membránnal

A membrán a szubsztrátot és a terméket átengedi, de az enzimet visszatartja.



Rögzítési módszerek összehasonlítása

Tulajdonság	fizikai adszorpció	ionos kötés	kovalens kötés	keresztkötés	(gél)bezárás
megvalósítás	könnyű	könnyű	nehéz	nehéz	nehéz
enzimaktivitás nagysága	kicsi	nagy	nagy	közepes	nagy
S-specificitás	nem változik	nem változik	változhat	változhat	
kötő erő	gyenge	közepes	erős	erős	erős
regenerálás	lehetséges	lehetséges	lehetetlen	lehetetlen	lehetetlen
alkalmazhatóság	gyenge	közepes	közepes	gyenge	jó
költség	alacsony	alacsony	magas	közepes	alacsony
mikrobás fertőzés elleni védelem	nincs	nincs	nincs	lehetséges	megvalósul

Sejtek immobilizálása

Az enzim preparálása nem mindig szükséges.

A teljes sejt immobilizálása:

- > költségkímélő (izolálás költségei)
- > az enzim természetes környezetében működik
- > a fehérje molekula védettebb, mint oldatban
- > természetes koenzimregenerálás lehetséges

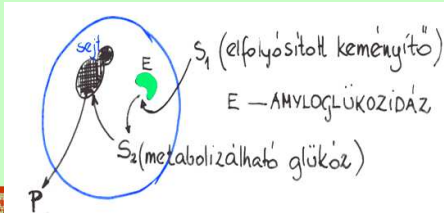
Élő sejt rögzítése: koenzimes átalakítások
 Nem élő sejt preparátum: egyszerű átalakítások (pl. laktóz hidrolízis)
 (permeabilizálás)

A RÖGZÍTÉSI MÓDSZEREK UGYANAZOK

Sejtek immobilizálása

Számos kombinált eljárást is kidolgoztak, amelyekben többféle enzimet és/vagy sejtet rögzítettek egy preparátumban.

Példa: MAXAFERM eljárás – amiloglükozidáz enzimet és élesztő sejtet kapcsoltak egy hordozóba. A szubsztrát dextrin α -amilázal elfolyósított keményítő – ebből az amiloglükozidáz glükózt hidrolizál, amit aztán az élesztő alkohollá erjeszt.



37

ENZIM RÖGZÍTÉS MÓDSZEREI

MIVEL?

FIZIKAI MÓDSZEREK

KÉMIAI MÓDSZEREK

HOVA?

hordozóhoz

keresztikötés

bezárás

fizikai
adszorpció

ionos

kémiai
kötés

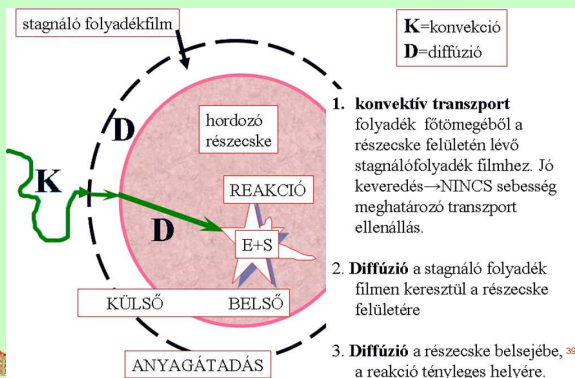
gél

membrán

mikrokapszula

38

RÖGZÍTETT ENZIMEK KINETIKÁJA



RÖGZÍTETT ENZIMEK KINETIKÁJA

Külső anyagátadás

Először csak a külső transzportfolyamatokat tekintjük át (az enzim a hordozó *felületén* van kötve). Ekkor az 1 és 2 folyamat közül a diffúzió a sebesség-meghatározó lépés. A stagnáló folyadék filmben:

$$N_s = \frac{dS}{dt} = k_s a (S_o - S)$$

\swarrow \searrow
 cm/s \quad $\text{cm}^2 \cdot \text{cm}^3$

ha a M-M kinetika érvényes, és nincs S akkumuláció, akkor az anyagtranszport sebessége azonos lesz az enzimes reakció sebességével:

$$V = k_s a (S_o - S) = \frac{V_{\max} S}{K_m + S}$$


40

RÖGZÍTETT ENZIMEK KINETIKÁJA


Külső anyagátadás

$$V = k_s a (S_o - S) = \frac{V_{\max} S}{K_m + S} \quad \text{Túl sok a paraméter! (} k_s, V_{\max}, S_o, K_m, a \text{)}$$

Transzformáljuk DIMENZÓMENTESSÉ!!!
 Legyen $x = S/S_o$ és $\kappa = K_m / S_o$

$$\frac{k_s a S_o \left(1 - \frac{S}{S_o}\right)}{V_{\max}} = \frac{\frac{S}{S_o}}{\frac{K_m}{S_o} + \frac{S}{S_o}}$$

$$\frac{1-x}{Da} = \frac{x}{\kappa + x} = \frac{\frac{1}{\kappa} x}{1 + \frac{1}{\kappa} x}$$

$$Da = \frac{V_{\max}}{k_s a S_o} = \frac{\text{maximális reakciósebesség}}{\text{maximális anyagátadási sebesség}}$$



41

RÖGZÍTETT ENZIMEK KINETIKÁJA

Külső anyagátadás

$$Da = V_{\max} / k_s S_o a$$

<p>$Da \ll 1$, anyagátadás \gg reakciósebesség</p> <p><i>reakció-limitált rezsím</i></p> $V = V_{\max} \frac{S}{K_m + S} \approx V_{\max} \frac{S_o}{K_m + S_o}$	<p>$Da \gg 1$, anyagátadás \ll reakciósebesség</p> <p><i>diffúzió-limitált v. transzport rezsím</i></p> $V = k_s a S_o$ <p style="text-align: center;">(S=0 a felületen)</p>
--	--



42

RÖGZÍTETT ENZIMEK KINETIKÁJA Belső anyagátadás

Feltételek a kinetikai leíráshoz:

1. a külső határréteg transzportja elhanyagolható
2. gömbszimmetrikus részecske
3. homogén eloszlás a részecskén belül
4. gátolt diffúzió a pórusokban

Az effektív diffúziós állandó $D_s = D_{so} \frac{\epsilon_p}{\tau} H$

D_{so} - diffúziós állandó a szabad folyadék fázisban
 ϵ_p - porozitás= szabad térfogat / teljes térfogat



43

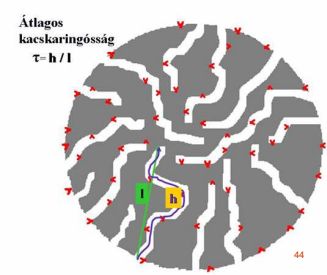
RÖGZÍTETT ENZIMEK KINETIKÁJA Belső anyagátadás

ϑ = kacskaringósság = átlagos (h / l)
 H = (hindrance) a molekuláris diffúziógátlás mértéke
 Kiszámítása:

$$H \cong \left(1 - \frac{r_s}{r_p} \right)^4$$

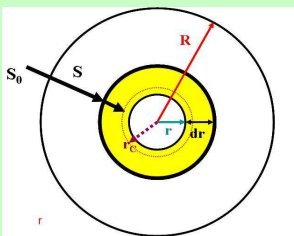
r_s , r_p ekvivalens sugár

Ha a $r_{p\text{órus}} \gg r_s \rightarrow H=1$




44

RÖGZÍTETT ENZIMEK KINETIKÁJA Belső anyagátadás



anyagmérleg az r és $r+dr$ sugarú gömbhéjra:

$$\left(D_s \frac{dS}{dr} 4\pi r^2 \right)_{r+dr} - \left(D_s \frac{dS}{dr} 4\pi r^2 \right)_r + \text{reakció} = \text{változás a gömbhéjban}$$


45

RÖGZÍTETT ENZIMEK

OLDOTT ENZIMEK

Előnyök

- homogén rendszer
- előkészítés nem szükséges
- csak reakció-rezsim van

Hátrányok

- drágák (1-10-50 \$/mg)
- elvesznek
- a terméket szennyezik
- csak szakaszos technológia



46
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

RÖGZÍTETT ENZIMEK

RÖGZÍTETT ENZIMEK

előnyök

- nem szennyezik a terméket
- könnyen elválaszthatók
- újra felhasználási lehetőség
- folytonos technológia is
ennek általános előnyei
- könnyű terminálás
- stabilisabb lehet

hátrányok

- rögzítés költséges (előkészítés)
- csökken az enzim aktivitása
- diffúziós gát (transzport-rezsim is)



47
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Enzimtechnikai alapfogalmak


Szakaszos reaktorok: a betáplálás és az elvétel időben elkülönül egymástól.

Folytonos reaktorok: a betáplálás és az elvétel egyidejűleg folyik.

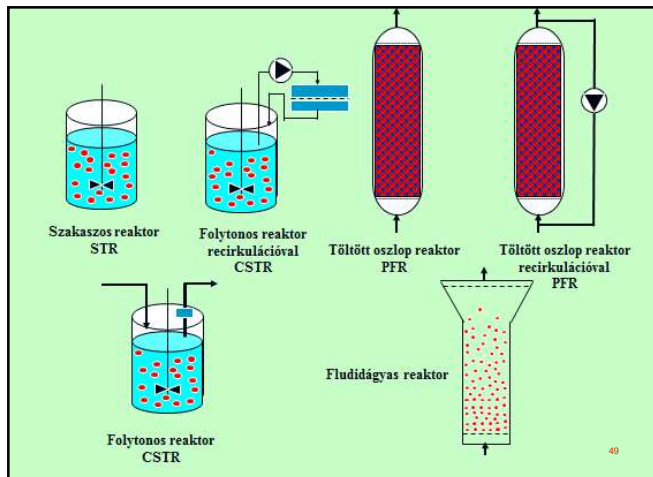
Ezek kombinálhatók valamelyik komponens recirkulációjával illetve visszatartásával.

Konverzió:
$$X_s = \frac{\text{átalakult mólok száma}}{\text{kiindulási mólok száma}} = \frac{n_{s0} - n_s}{n_{s0}}$$

Szakaszos reaktorban a konverzió a reakció előre haladásával növekszik, míg el nem éri az egyensúlyt (=egyensúlyi konverzió)



48
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



Enzimtechnikai alapfogalmak

Hozam: $\frac{\text{szintetizált mólok száma}}{\text{kiindulási mólok száma}}$ $\eta_p = \frac{n_p - n_{p0}}{n_{s0}} \left(\frac{v_s}{v_p} \right)$

Ahol: n_p – a termék mólszáma a reakció végén
 n_{p0} – a termék mólszáma a reakció elején
 n_{s0} – a szubsztrát mólszáma a reakció elején
 v_s – a szubsztrát sztöchiometriai együtthatója (hány mól vesz részt a reakcióban)
 v_p – a termék sztöchiometriai együtthatója (hány mól képződik a reakcióban).

50

Enzimtechnikai alapfogalmak

Szelektivitás: $\frac{\text{szintetizált (céltermék) mólok száma}}{\text{konvertált mólok száma}}$

$$\sigma_p = \frac{n_p - n_{p0}}{n_{s0} - n_s} \left(\frac{v_s}{v_p} \right)$$

Ennek értéke akkor közelít az egyhez, ha nem keletkeznek melléktermékek.
 A definiált jellemzők közötti összefüggés:

$$\eta_p = \sigma_p \cdot X_s$$

51

Rögzített enzimek/sejtek alkalmazása

Aminoaciláz	D,L-aminosavak resolválása
Glükóz-izomeráz	Glükóz konverziója glükóz+fruktóz 1:1 eleggyé
Penicillin-amidáz	6-amino-penicillánsav előállítás
β-galaktosidáz	Tejucukor hidrolízise glükóz+galaktózzá
Lipáz	Zsírok hidrolízise és átészterezése
Termolizin	Aszpartám gyártás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

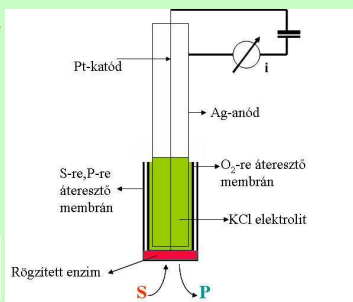
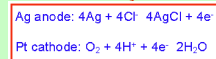
52

Rögzített enzimek/sejtek alkalmazása

Alapja egy *amperometriás* oldott oxigén mérő elektród, amelyre olyan enzimet rögzítenek, ami oxigént fejleszt vagy nyel el.

Pl.: glükóz oxidáz + kataláz.

Az elektródfolyamat:

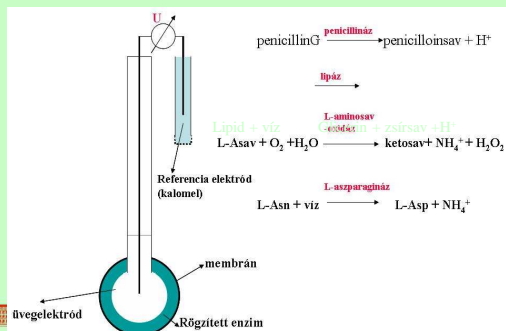


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

53

Enzimelektrod-2

Alapja egy *potenciometriás* elvű pH-mérő (üveg)elektrod, amelyre olyan enzimet rögzítenek, ami H⁺ ionokat termel vagy fogyaszt.

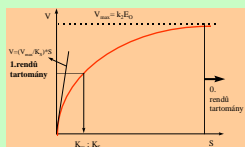


54

S mérés kinetikai vizsgálattal

A M-M görbe telítési, vízszintes szakaszán a reakciósebesség egyenlő V_{\max} -al.

Ha $S \gg K_m \rightarrow V = V_{\max} = k_2 E_0$



S így nem mérhető, de inhibitorok vagy aktivátorok meghatározhatók:

- Heparin → trombin
- Inszekticidek → acetilkolinészteráz



Követelmények az analitikai enzimekkel szemben

- Specifitás (ne legyen mellékreakció más S-sel)
- Tisztaság
- Stabilitás
- Kinetikai tulajdonságok
- pH optimum
- Oldhatóság (ne csapódjon ki)
- Ár



ENZIMEK ALKALMAZÁSAI

Ipar: amilázok, proteázok, izomerázok, penicillin aciláz, konverziók (pl. az eddigi előadásokban felsoroltak)
 Piac: ~2000 MUSD/év

Analitika, diagnosztikumok: glükóz-oxidáz, alkohol dehidrogenáz, koleszterin oxidáz, ... stb

Medicina: proteázok, lipáz, aszparagináz, sztreptokináz, heparináz, ... stb
 Piac: ~3000 MUSD/év

Kutatás/génmanipuláció: restriktációs endonukleázok, reverz transzkriptáz, DNS-ligáz, DNS polimeráz,



MEGOSZLÁS IPARÁGAK SZERINT

Élelmiszeripar (ebből keményítőipar)	45%	11%
Detergens ipar	34%	
Textilipar	11%	
Bőripar	9%	
Papír	1,2%	



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

64

IPARI ENZIMEK PIACA

Néhány multi uralja:

- NOVO Nordisk (DK)
- DSM-Gist (NL)
- IBIS
- Genencor (USA)
- Rhone Poulenc (F)
- Solvay Enzym
- Miles Chemicals (USA)

- USA 40 %
- Európa 35 %
- Japán 24 %

Enzim	Érték (piac %)
<i>Bacillus proteázok</i>	45
<i>Glükamilázok</i>	13
<i>Bacillus amilázok</i>	5
<i>Glükóz izomerázok</i>	6
<i>Remnin (mikrobiális)</i>	10
<i>Amilázok (penész)</i>	4
<i>Pektinázok</i>	3
<i>Proteázok (penész)</i>	2
<i>Egyéb</i>	12



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

65
