

# 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.



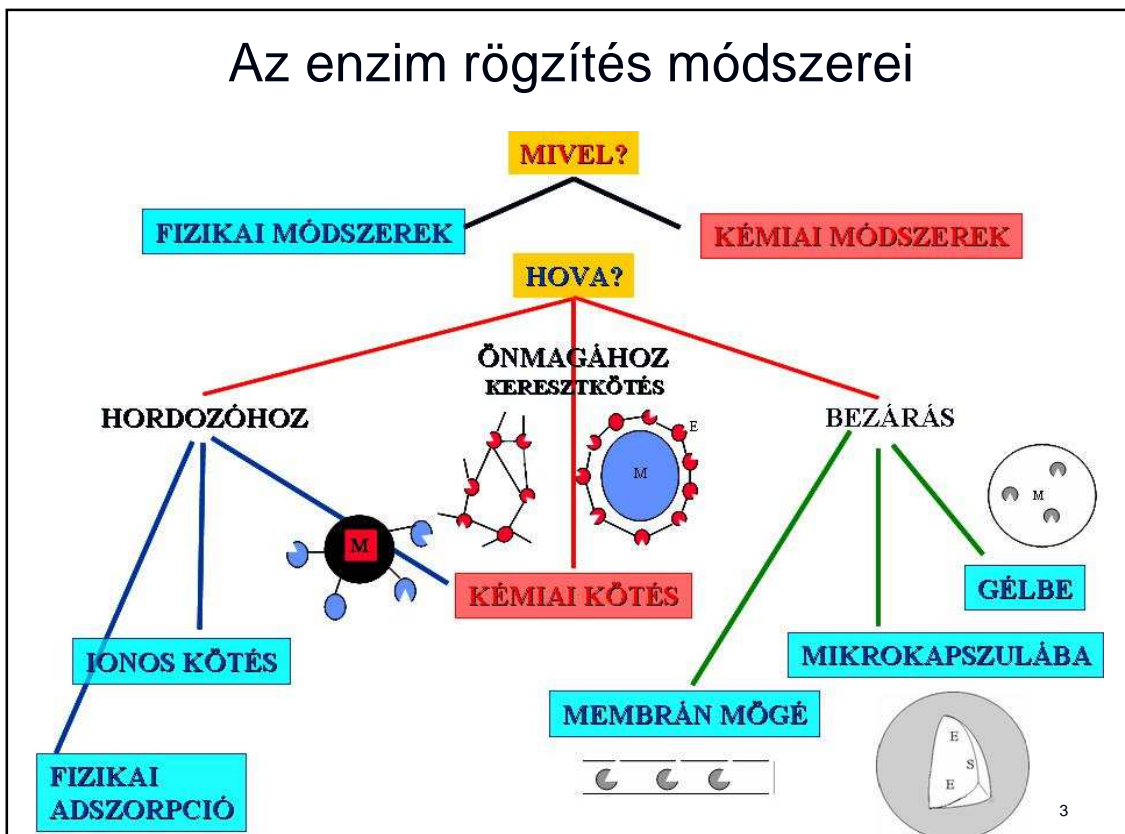
## Az enzim immobilizáció története

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.





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

### Lépések:

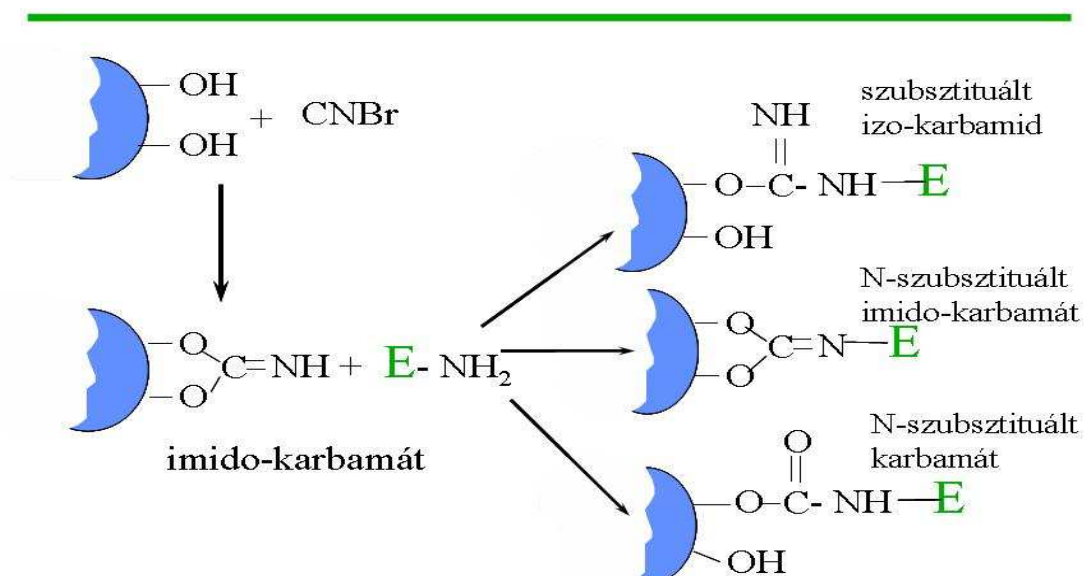
1. a hordozó aktiválása: KAR és -X (reaktív csoport) felvitele,
2. a kovalens kötés létrehozása az enzim és az aktivált hordozó között.

Az aktív centrum védelme: szubsztrát vagy analóg jelenléte

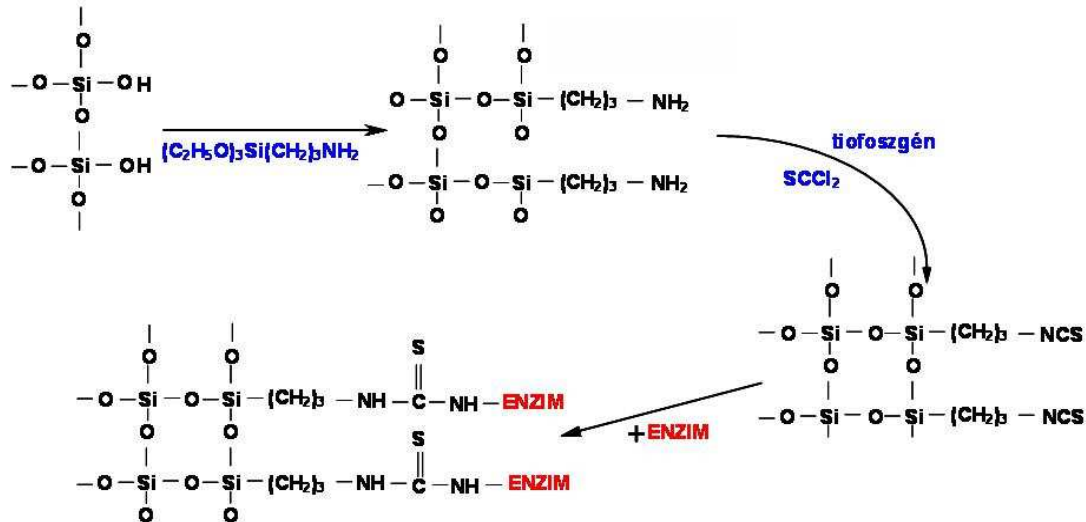


## Kémiai módszerek: brómcian

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



## Kémiai módszerek: rögzítés üvegfelületre



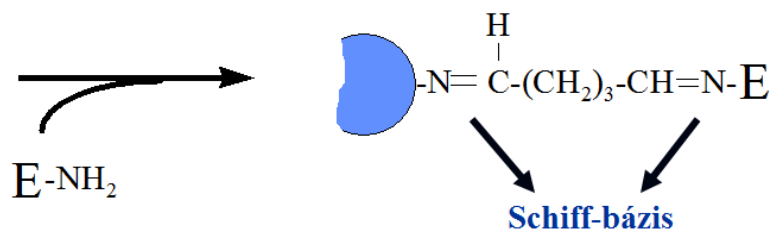
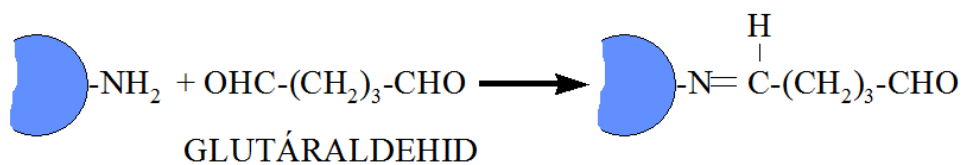
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

## Kémiai módszerek: bifunkciós kötés

### POLIFUNKCIÓS KÖTÉS

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

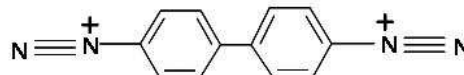


8

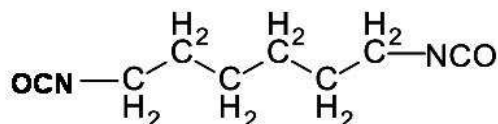
## Kémiai módszerek: keresztkötések létrehozása



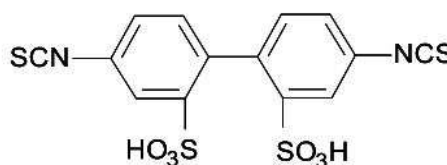
GLUTÁRALDEHID



DIAZOBENZIDIN

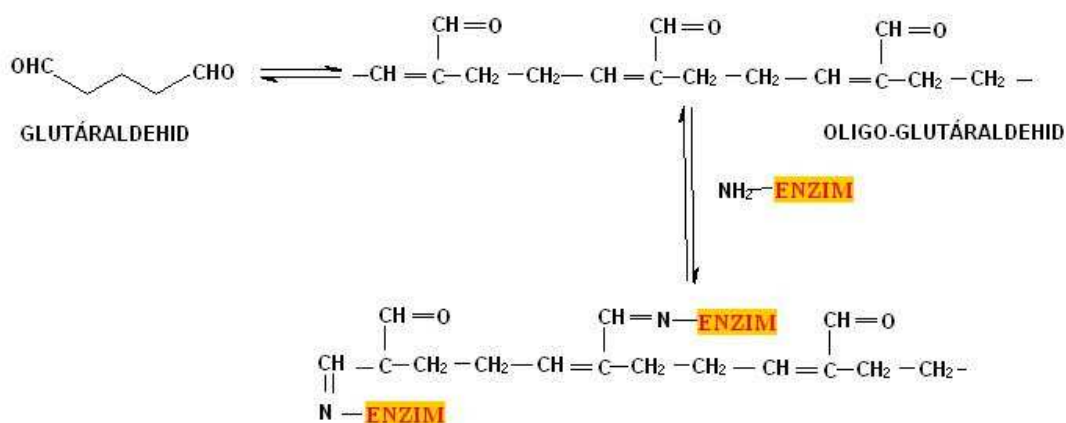


HEXAMETILÉN-DIIZOCIANÁT



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

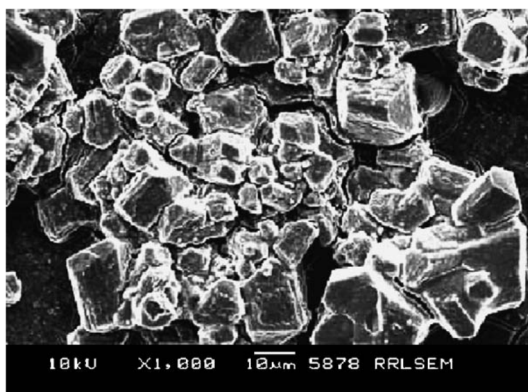
## Kémiai módszerek: keresztkötések létrehozása



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



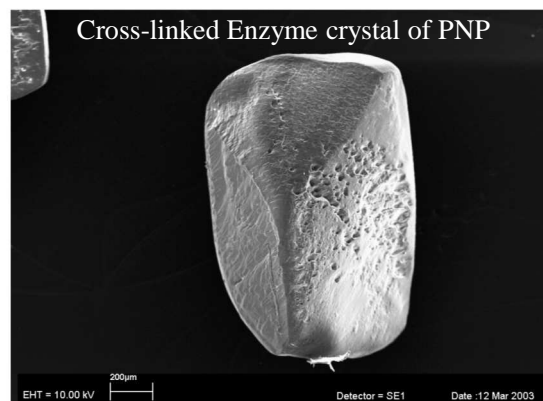
## CLEC: cross-linked enzyme crystals



Scanning electron microscopic view of CLEC laccase

Surface area 2.456 (m<sup>2</sup>/g)

Purine nucleoside phosphorylase (PNP)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## 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. dexrán-polialkohol

### Előnyei:

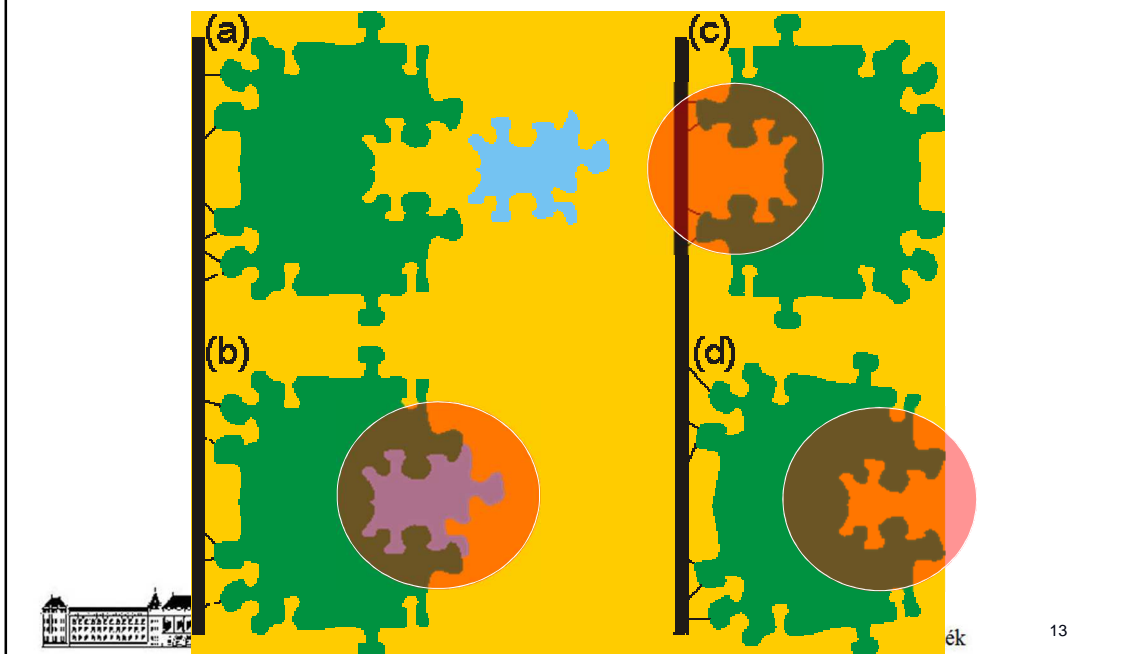
- Egyszerű és sokféle enzimhez megfelelő módszer
- Tiszta és nem tisztított enzim preparátumokkal is végrehajtható
- Stabilitás hővel, szerves oldószerekkel és proteolízissel szemben
- Nem oldódik vizes környezetben (nem vész el kioldással az aktivitása)
- Combi CLEA: két vagy több enzim együtt immobilizálása



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

## A kémiai kötés esetleges hatásai



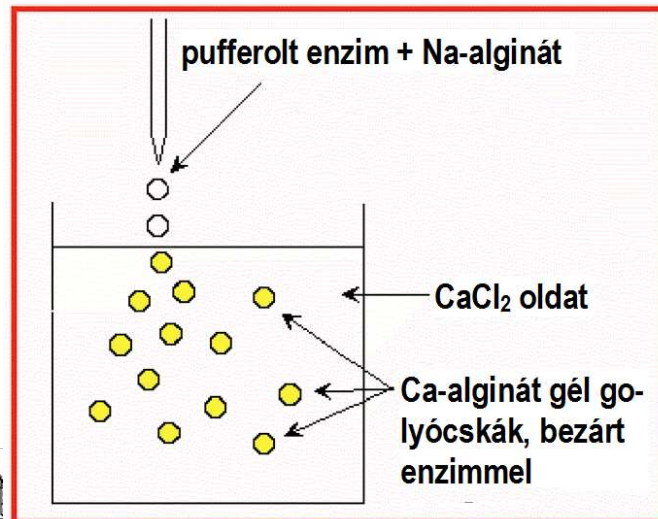
## FIZIKAI MÓDSZEREK

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



## Fizikai módszerek: gélbe zárás

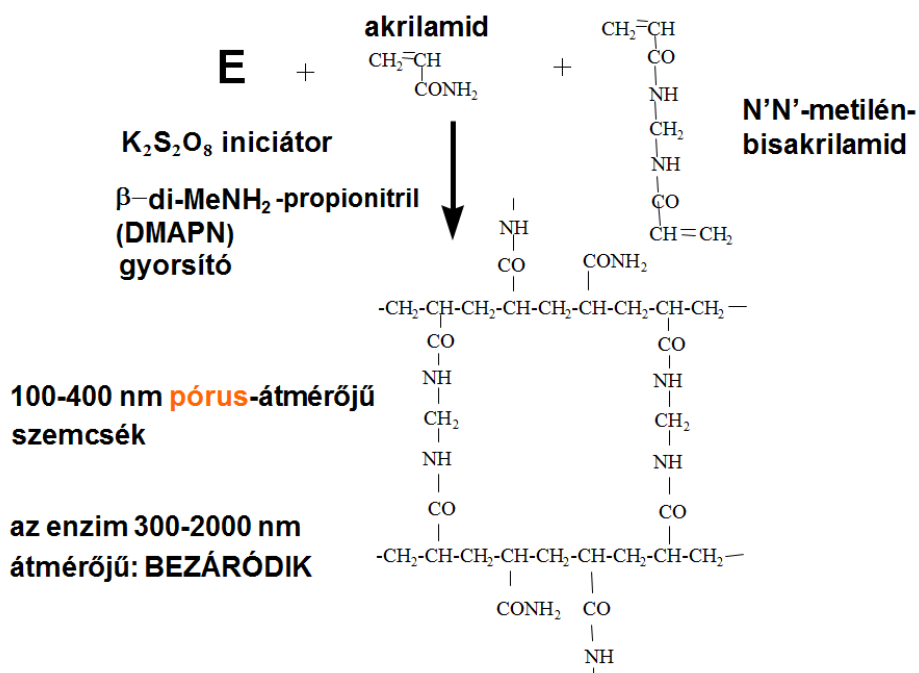
Alginát:  $\beta$ -mannuronsav-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -guluronsav polimer.  
 Hidrofil, kolloid, egyenes láncú polimer, algákból.  
 Alginát képzés:



mszék

15

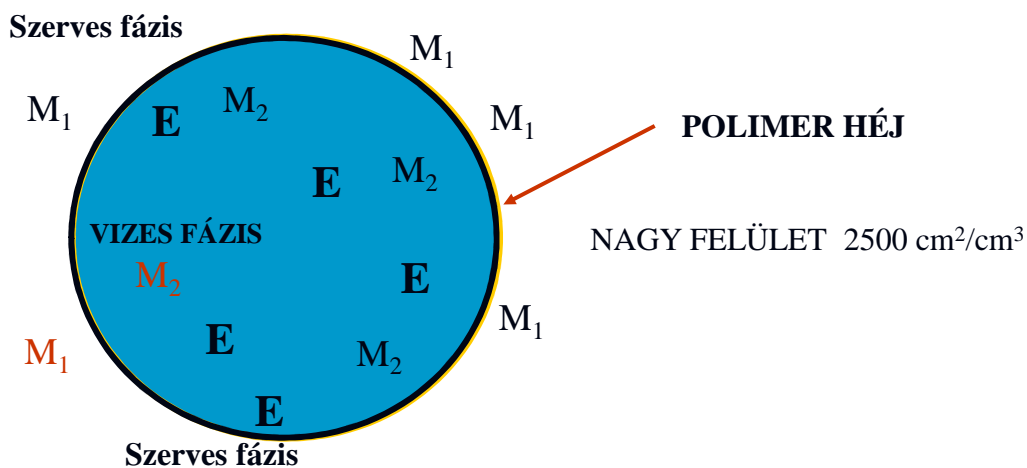
## Fizikai módszerek: poli-akrilamid gélbe zárás



16

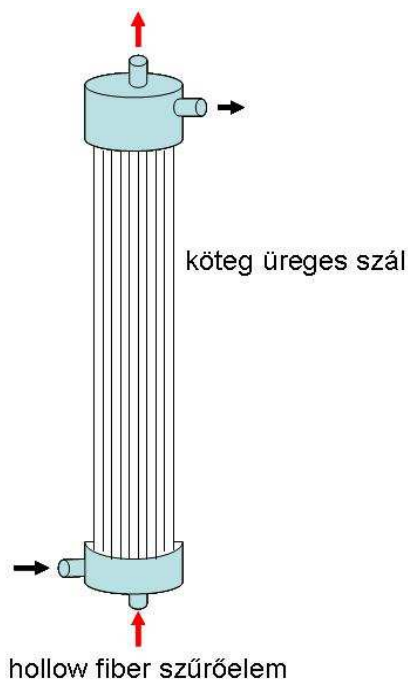
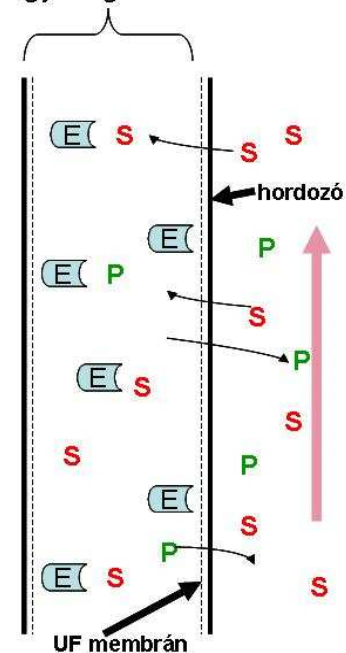


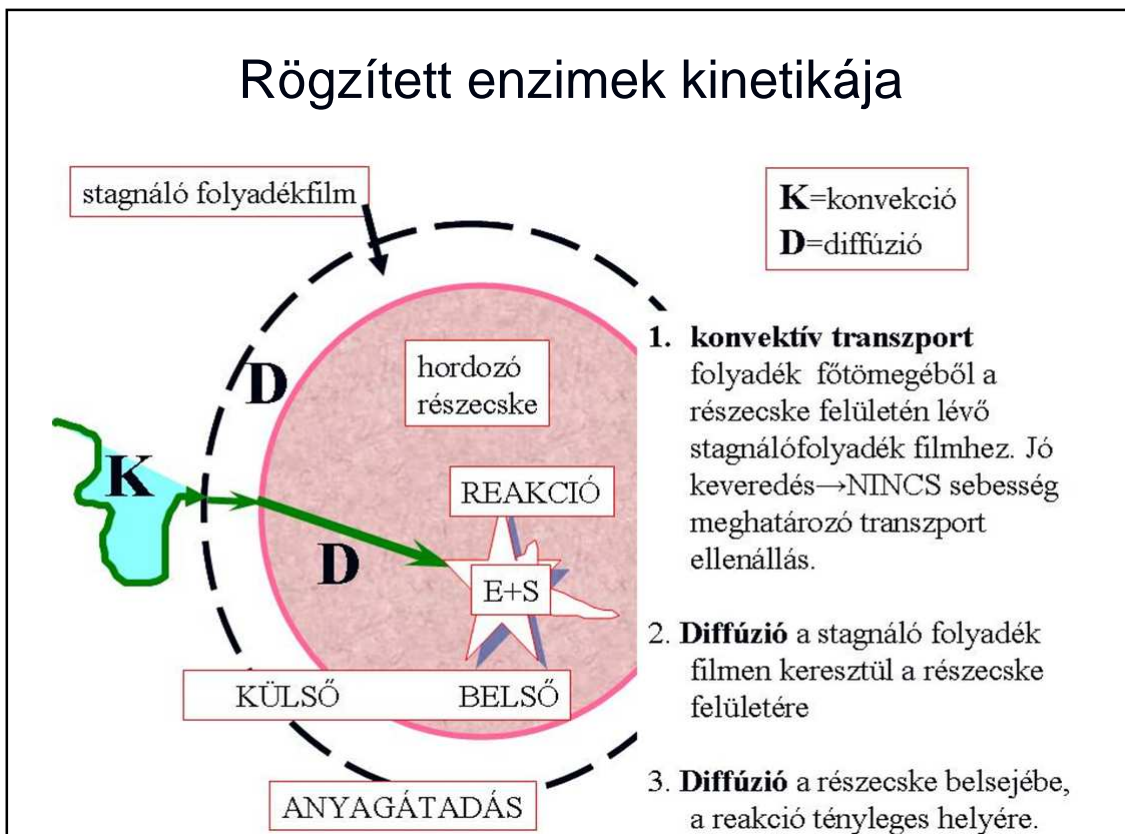
## Fizikai módszerek: mikrokapszulázás



## Fizikai módszerek: ultraszűrő membránok

egy üreges szál



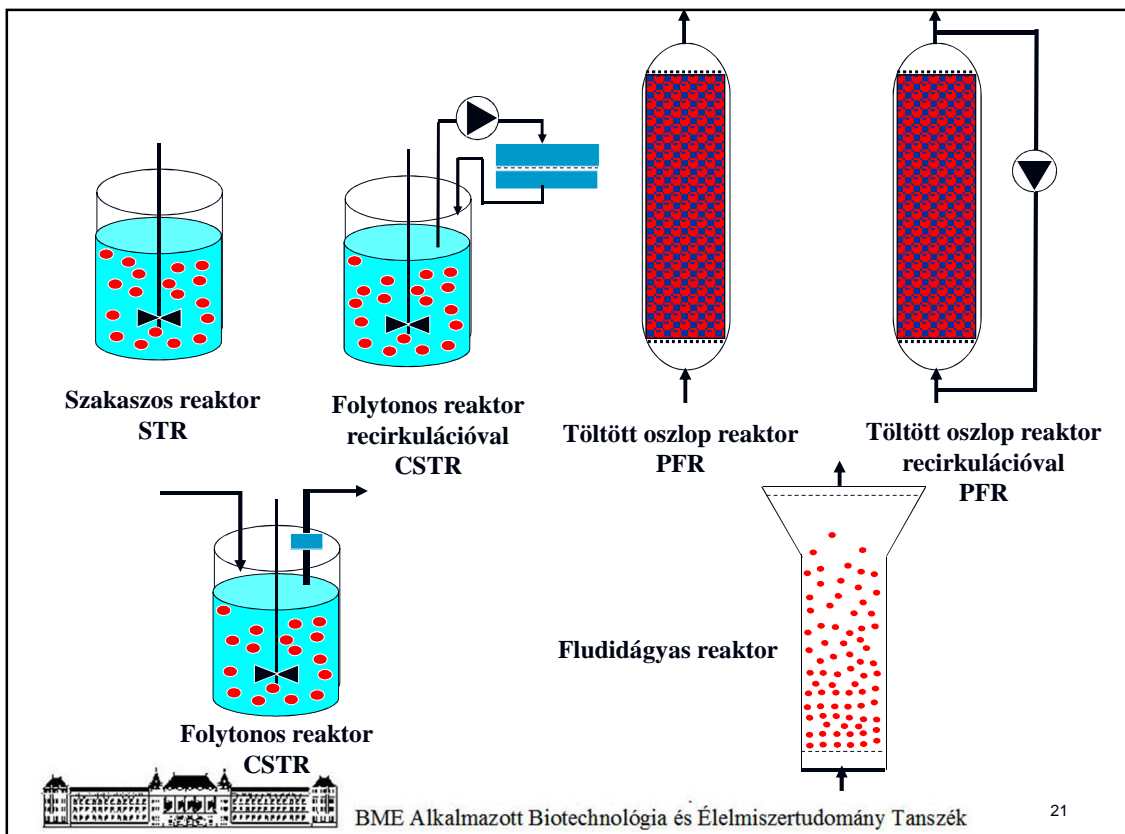


## Rögzített enzimek

<p>Oldott enzimek</p> <p style="color: blue;">Előnyök</p> <p style="color: blue;">Hátrányok</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Homogén rendszer</li> <li>* Előkészítés nincs</li> <li>* Csak reakció-rezsim van</li> <li>* Drágák 1-10-50 \$/mg</li> <li>* Elvesznek</li> <li>* A terméket szennyezik</li> <li>* Csak szakaszos technológia</li> </ul>
<p>Rögzített enzimek</p> <p style="color: blue;">Előnyök</p> <p style="color: blue;">Hátrányok</p>	<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> <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



21

## Rögzített enzimek

Aminoaciláz	D,L-aminosavak rezolválása
Glükóz izomeráz	Glükóz → fruktóz konverzió
Penicillin amidáz	Penicillin oldallánc csere
$\beta$ -galaktozidáz	Tejcukor hidrolízise (savó)
Lipáz	Zsírok elszappanosítása
Nitril-hidratáz	Akrilnitril → akrilamid
Aszpartáz	L-aszparaginsav előállítása

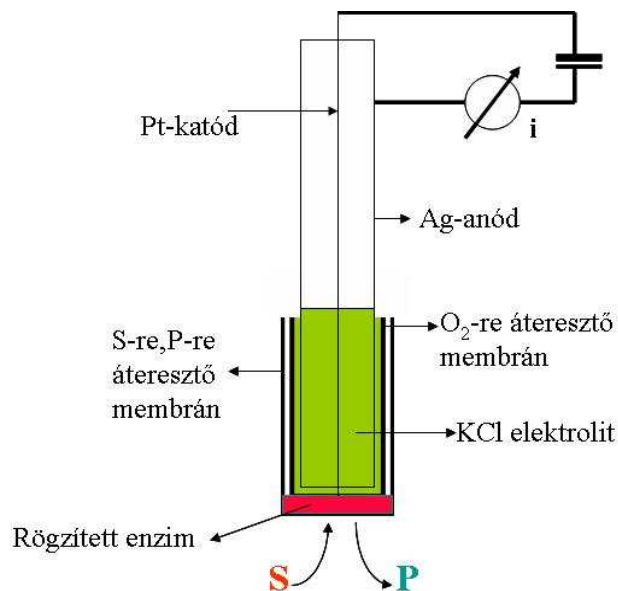


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

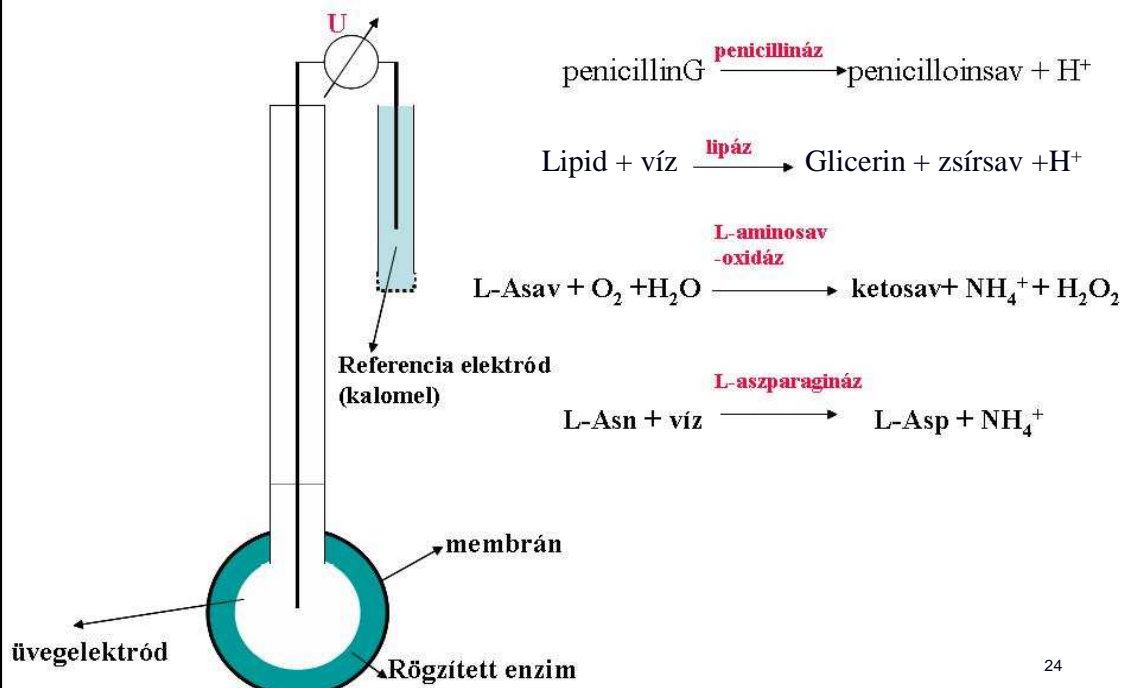
22

## 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 amperometriásan az elektróda.

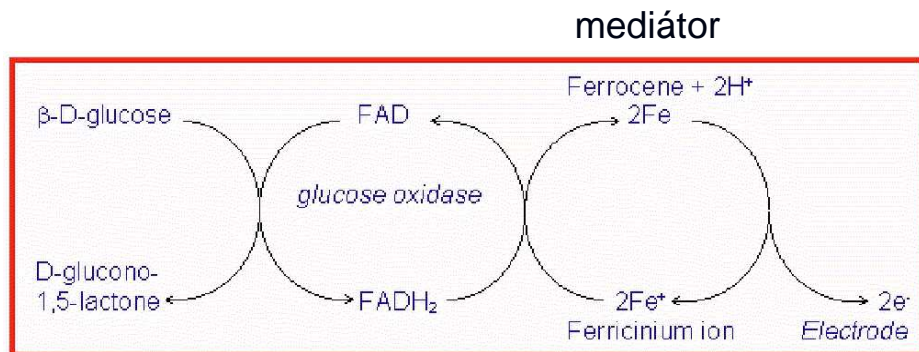


## Enzimelektrodok: potenciometria



## Enzimelektrodok: elektronátadás

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



## BIOSZENZOR

