

HETEROGÉN FÁZISÚ ENZIMES REAKCIÓK

BIM BSc
2007

HOMOGEN 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:

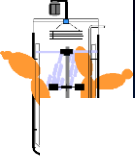
szennyezik a terméket, tisztítását nehezítik.

Enzim Immobilizáció története

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

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

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



MIVEL?

FIZIKAI MÓDSZEREK

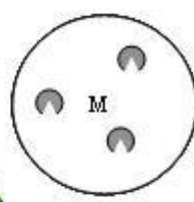
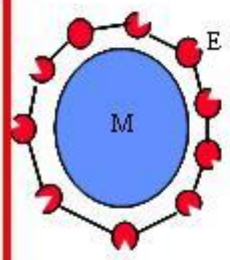
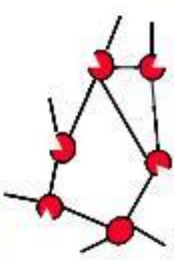
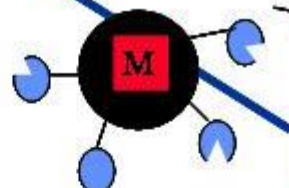
KÉMIAI MÓDSZEREK

HOVA?

**ÖNMAGÁHOZ
KERESZTKÖTÉS**

HORDOZÓHOZ

BEZÁRÁS



IONOS KÖTÉS

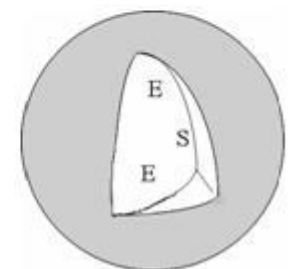
KÉMIAI KÖTÉS

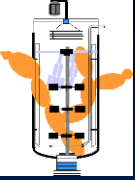
GÉLBE

MIKROKAPSZULÁBA

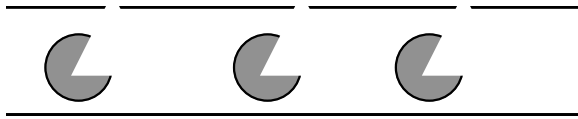
**FIZIKAI
ADSZORPCIÓ**

MEMBRÁN MÖGÉ

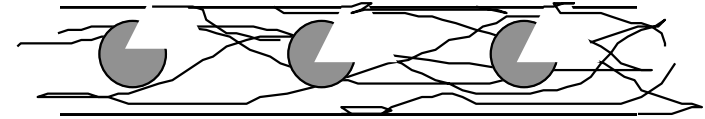




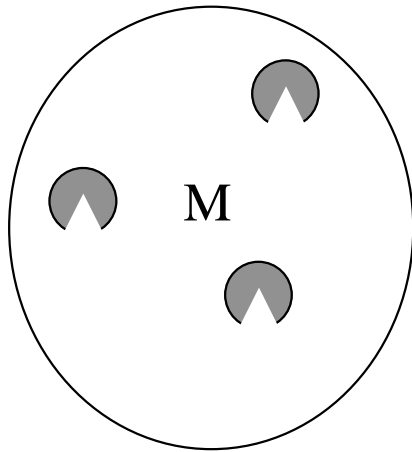
AZ ENZIMRÖGZÍTÉS MÓDSZEREI



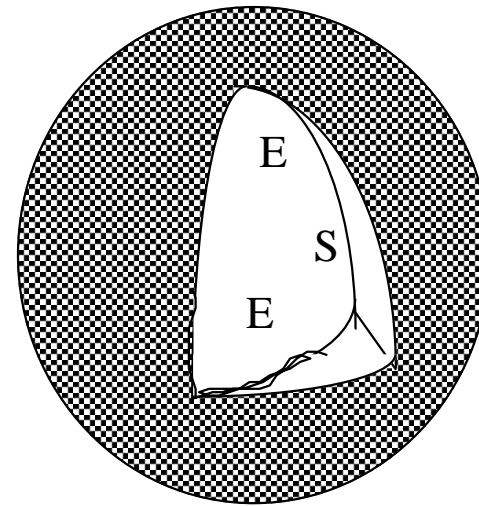
Enzim rögzítés üreges szálban
(Hollow fibre)



Enzim rögzítés fonott szálas anyagban



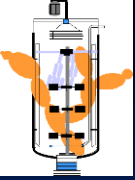
Enzimbezárás oldhatatlan
gél mátrixban



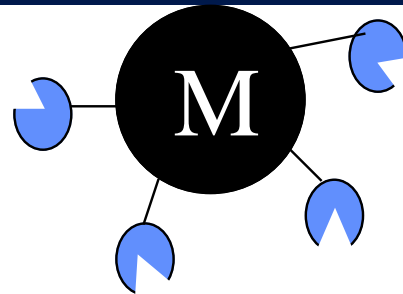
Mikrokapszulázás

FIZIKAI MÓDSZEREK

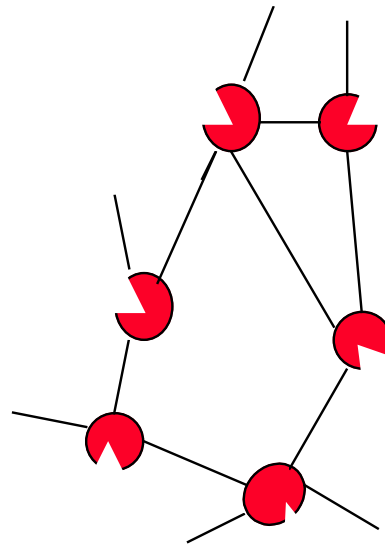
AZ ENZIMRÖGZÍTÉS MÓDSZEREI



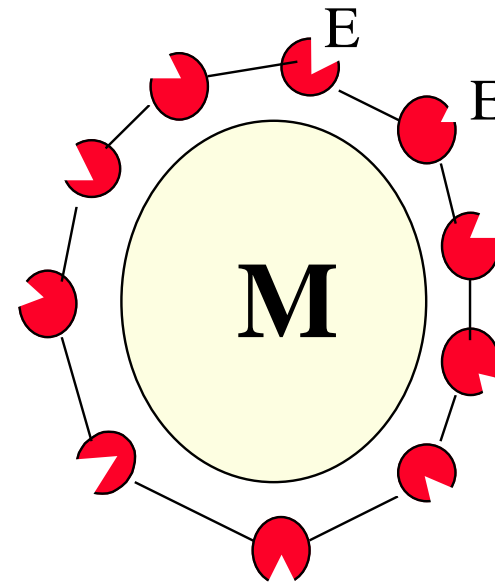
Enzimkötés
hordozóhoz
kovalens kötéssel



M=mátrix



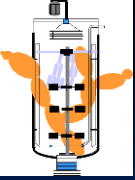
Keresztkötés



Enzim keresztkötés
multifunkciós reagenssel

KÉMIAI MÓDSZEREK





KÉMIAI MÓDSZEREK 1

Kovalens kötés **nem** **esszenciális aminosav-csoport(!)** és 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,...*

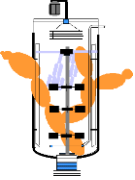
Kovalens kötés kialakítása:

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

LÉPÉSEK:

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

Aktiv centrum védelme: S v. analogon jelenléte



DIAZOTÁLÁS

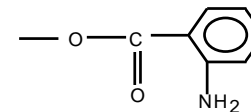
p-NH₂-benzil-cellulóz

p-NH₂-benzoil-cellulóz



SEPHADEX: amino-benzoil

származék

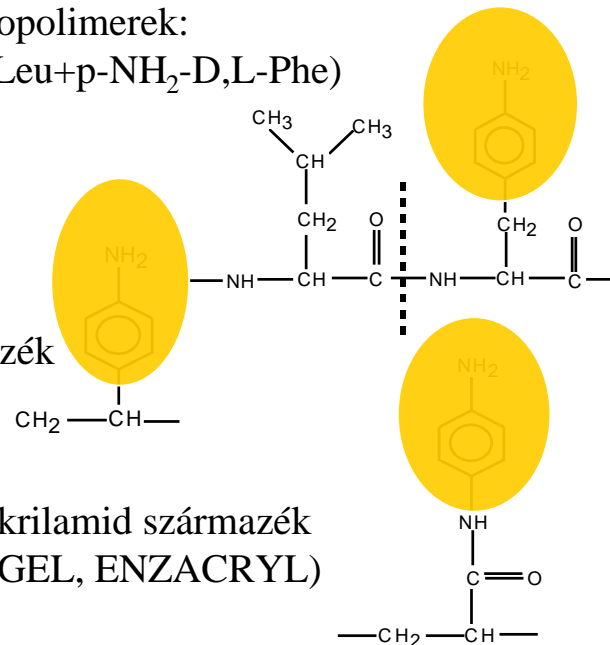


Amino kopolimerek:

poli(-L-Leu+p-NH₂-D,L-Phe)

M Á T R I X

Polisztirol származék



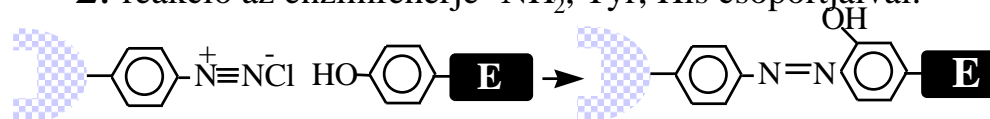
Poliakrilamid származék
(BIOGEL, ENZACRYL)

szilán-származékok:pl.

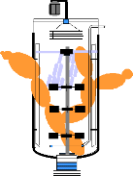
α -NH₂-propil-trietoxi-szilán



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

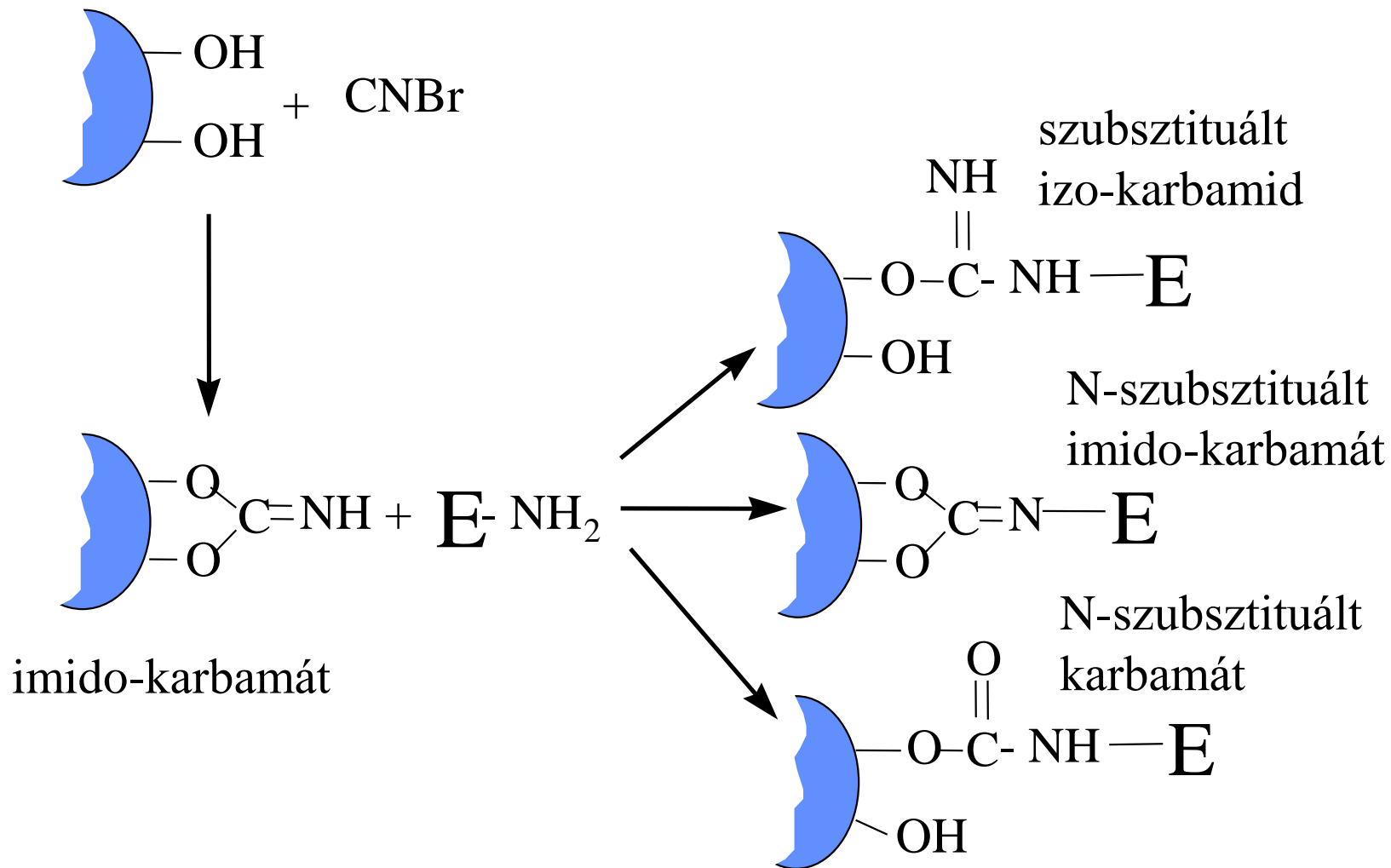


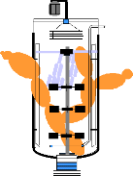
KÉMIAI MÓDSZEREK 3



BRÓMCIÁNOS KÖTÉS

MÁTRIX: vicinális -OH : cellulóz, sephadex
sepharose

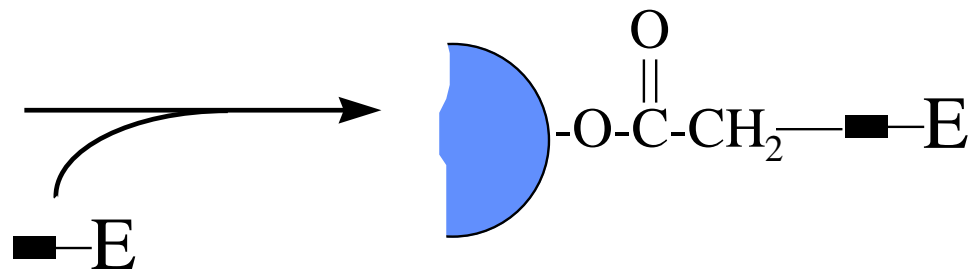
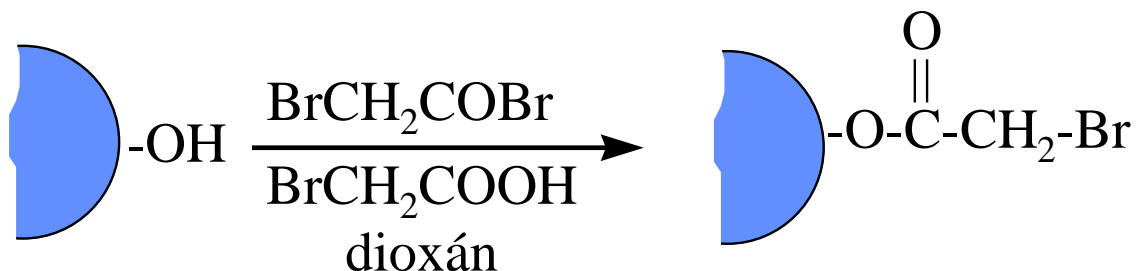




KÉMIAI MÓDSZEREK 4

Az enzim fenil-, amin-, szulfhidril- csoportjainak (■) **ALKILEZÉSE**

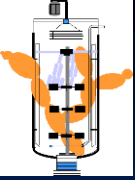
MÁTRIX: METAKRILÁT és CELLULÓZ származékok homo- és kopolimerjei



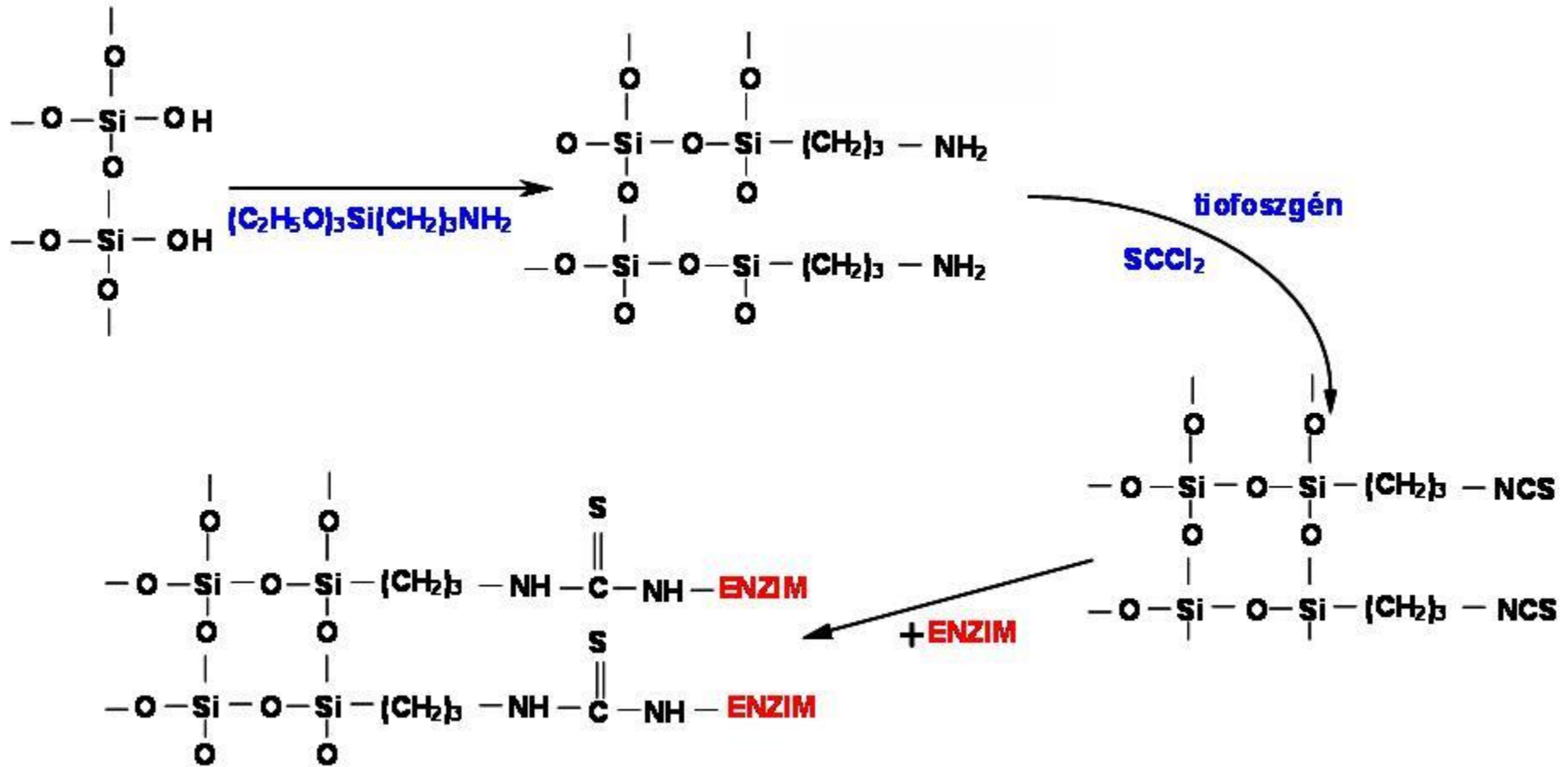
Pharmacia - Pharmacia Upjohn - Pharmacia - Ammersham Biosciences

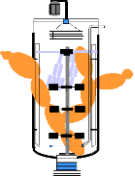
Glükóz → dextrán → sephadex[®]

Tengeri alga → agar(óz) → sepharose[®]



Üvegfelületre KÉMIAI MÓDSZEREK 5 rögzítés





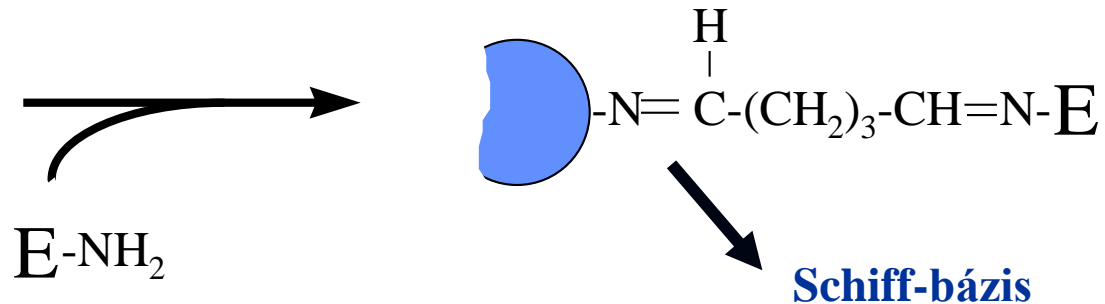
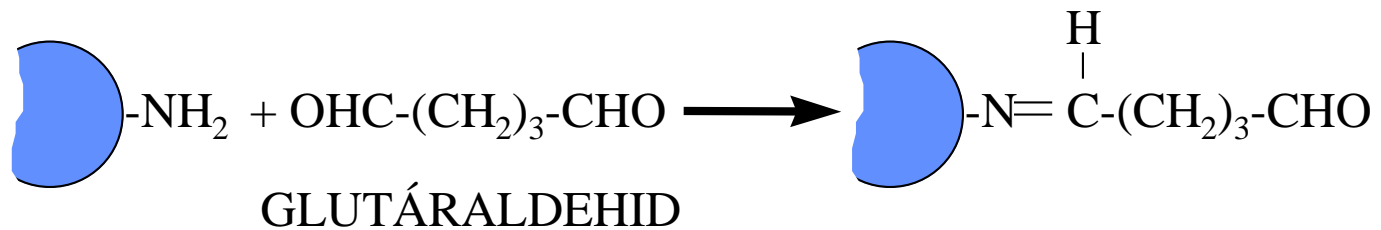
KÉMIAI MÓDSZEREK 6

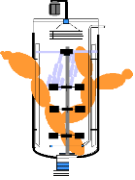
POLIFUNKCIÓS KÖTÉS

AE-aminoetil

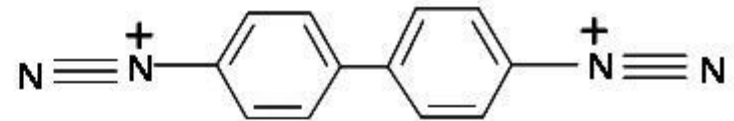
DEAE-diethyl-aminoetil

**MÁTRIX: -NH₂ csoport : AE-CELLULÓZ, DEAE-CELLULÓZ,
KOLLAGÉN, KITIN, NYLON, stb**

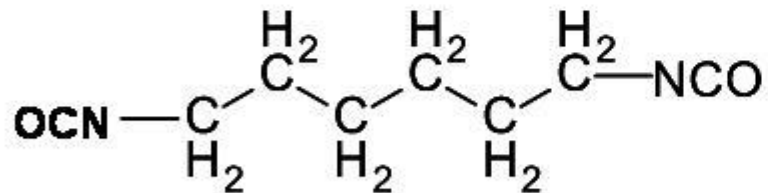




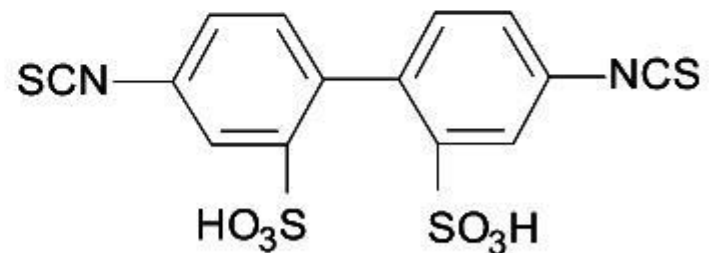
GLUTÁRALDEHID



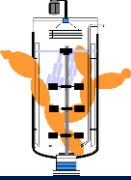
DIAZOBENZIDIN



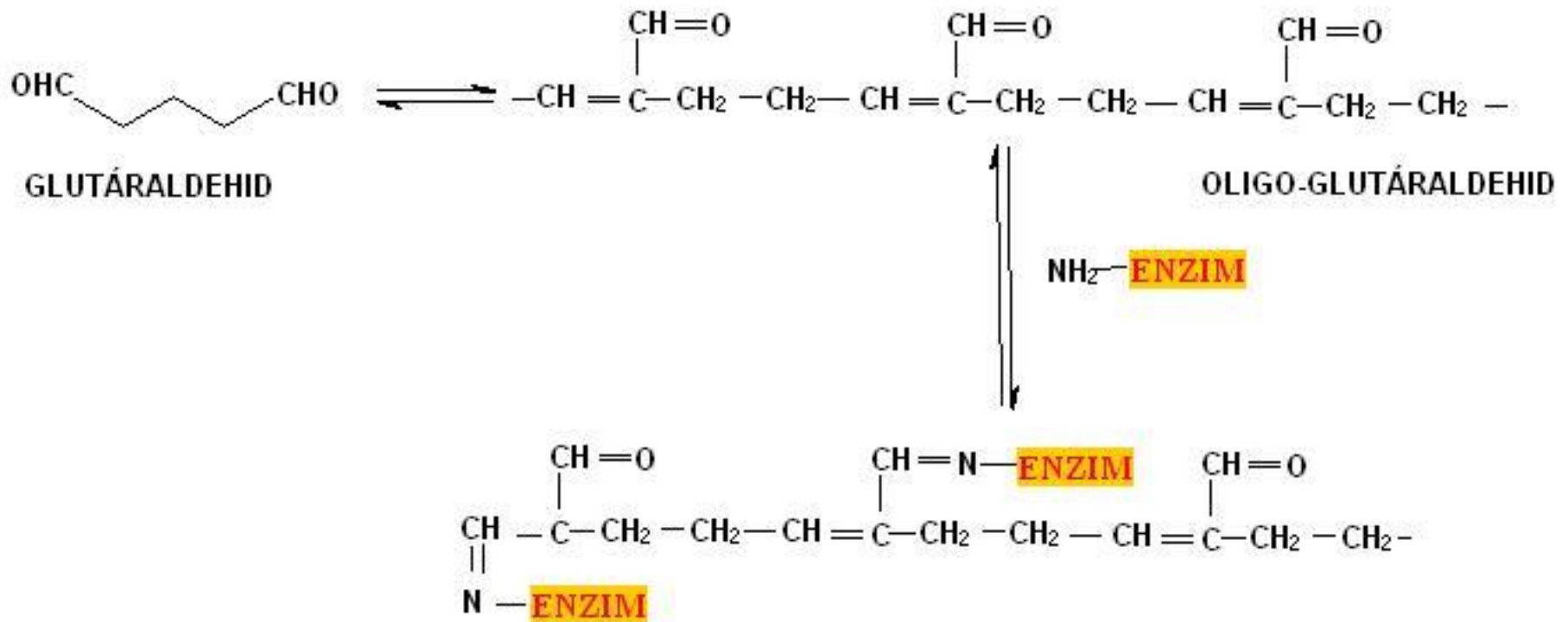
HEXAMETILÉN-DIIZOCIANÁT



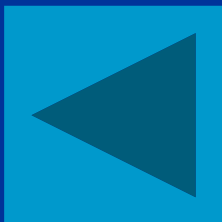
4,4'-DIIZOCIANÁTO-BIFENIL-
-2,2'-DISZULFONSAV



KERESZTKÖTÉSEK LÉTREHOZÁSA



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



Recept

Kataláz keresztkötéses immobilizálása

Kristályos katalázt oldunk 10%-os NaCl-ben és 0,05 M foszfát pufferrel hígítjuk, míg a kataláz cc. 2 mg/ml lesz.

4 ml 4 %os glutáraldehidet ua pufferben 4 ml-hez adunk és kb egy órát szobahőmérsékleten kevertetjük amíg zöld rögös csapadék nem válik le.

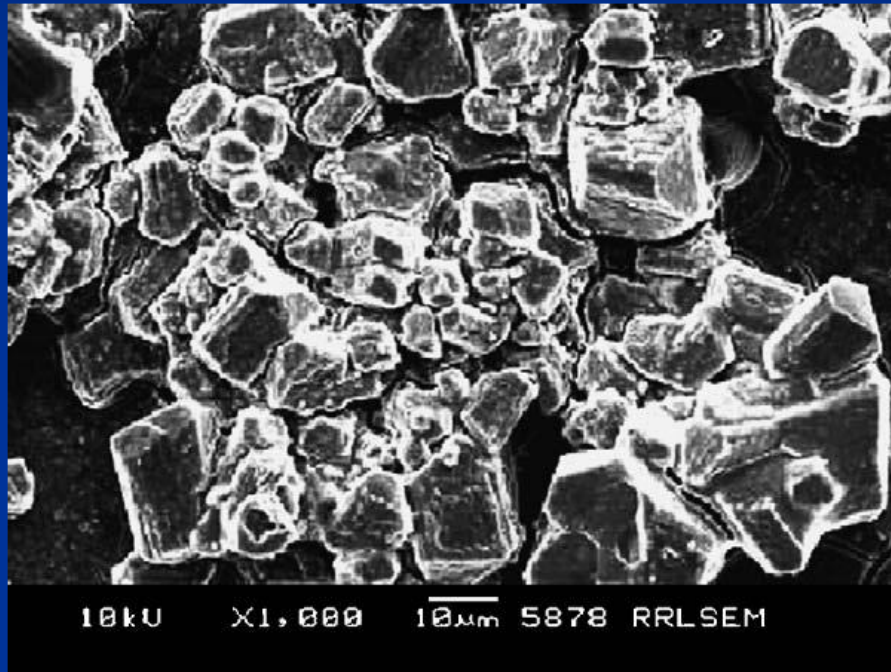
(Egy éjszakán át hidegszobában végezve hasonló eredményekre jutunk)

Centrifugálás (5 min 4000 rpm) és ismételt mosás 10% NaCl-lel. (6-8x), amíg a szupernatánsban már nincs kataláz aktivitás.

Homogenizálás.

CLEC (90-es évek) ALTUS Biologics (USA)

Surface area (m²/g) 2.456



Scanning electron microscopic view of CLEC laccase

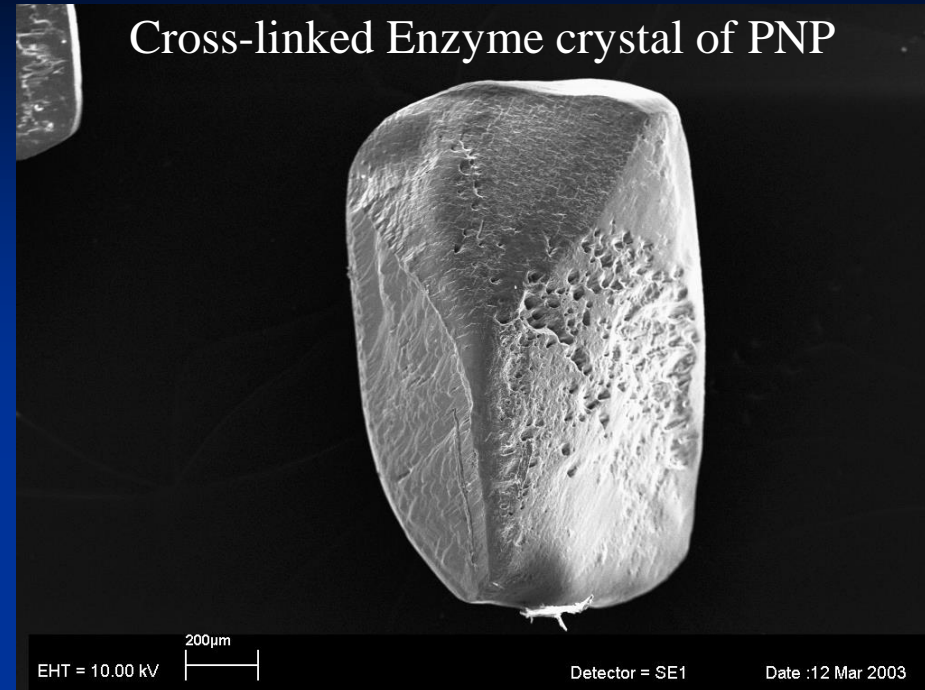
Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase

J. Jegan Roy, T. Emilia Abraham

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 38 (2006) 31–36

Purine nucleoside phosphorylase (PNP)

Cross-linked Enzyme crystal of PNP



**CLEA: precipitáció ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, BuOH) +
keresztkötés**

Kombinálja a tisztítást és a rögzítést

Glutáraldehid, de.... Pl. dextránpolialhehid



Előnyei:

Egyszerű és sokféle enzimhez megfelelő módszer

Tiszta és nem tisztított enzim preparátumokkal is végrehajtható

Nagy 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

(CLEA Technologies NL)

Keresztkötés emulzióban: SpheresZymes

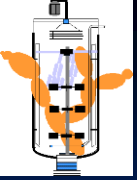
Délafrikai

szabályozható részecskeméret!

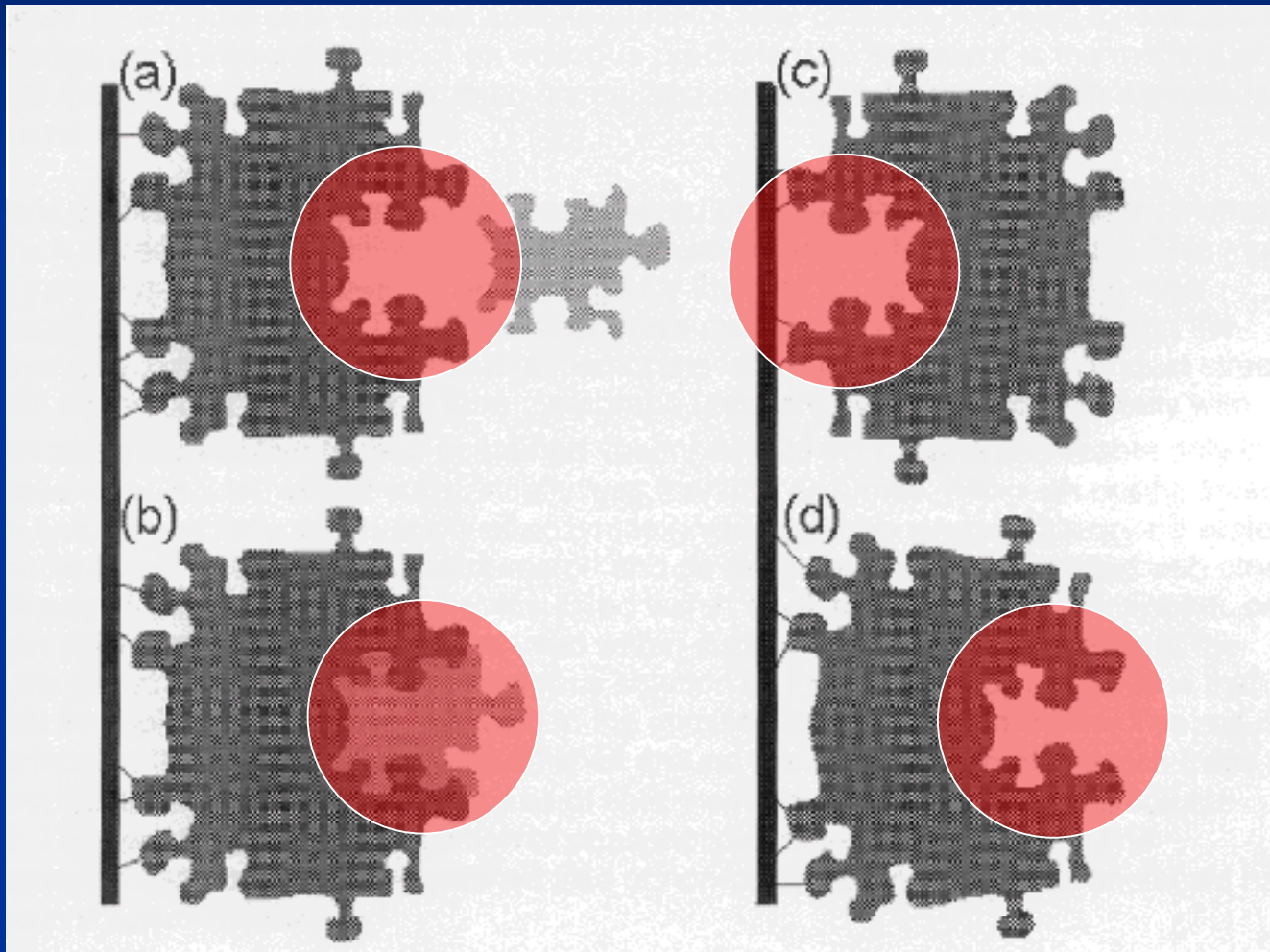


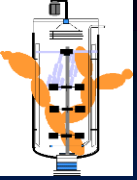
ANOTHER SIGN THAT THE OZONE LAYER IS GETTING THINNER!

(c) 2000 Benoit Leblanc



kémiai kötés esetleges hatásai:





ADSZORPCIÓ

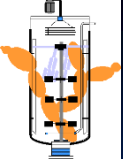
FIZIKAI MÓDSZEREK 1
IONCSERÉLŐN – NEM SPECIFIKUS

KÖNNYEN LEVÁLIK (pH)

GÉLBE ZÁRÁS

MIKROKAPSZULÁZÁS

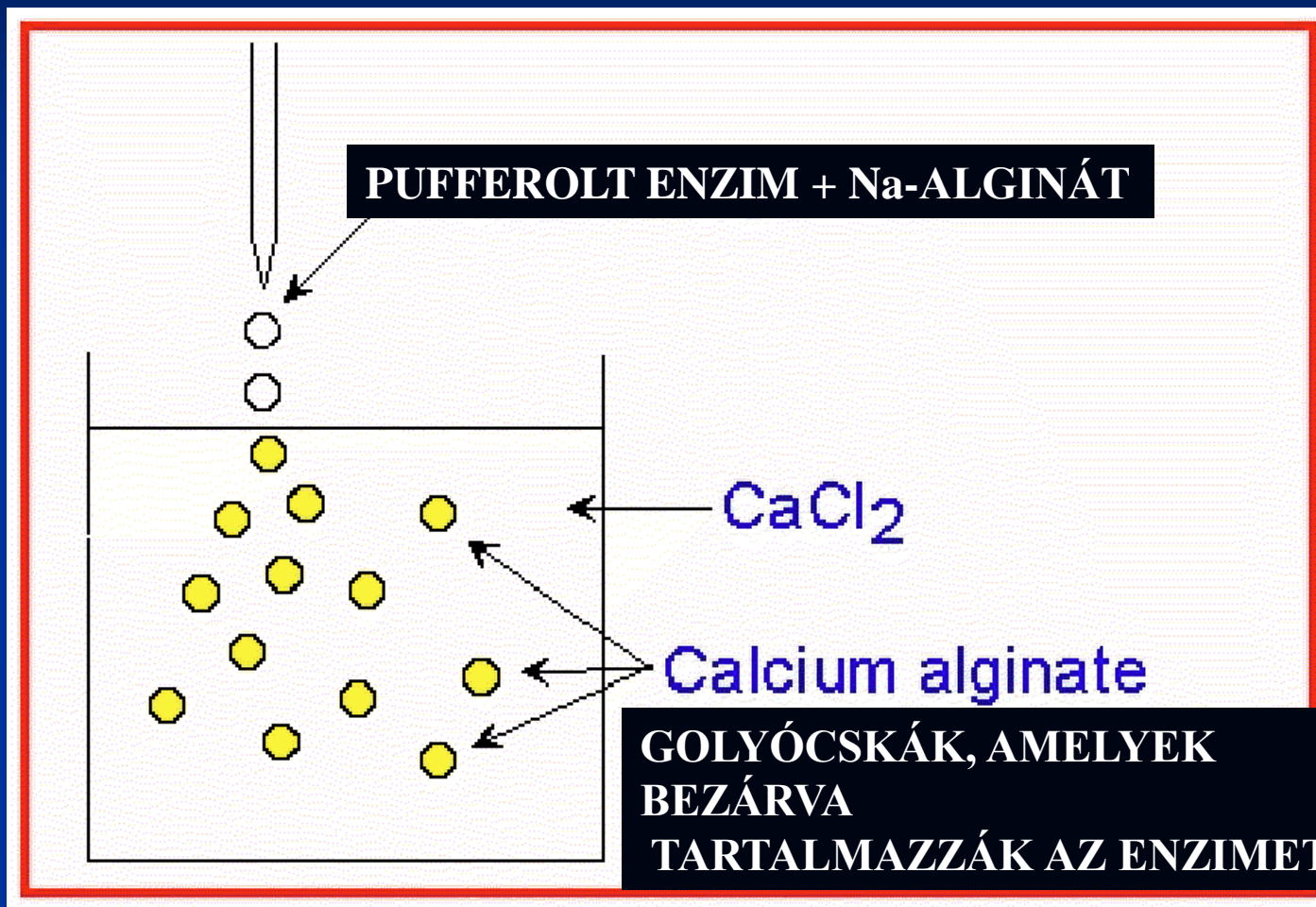
MEMBRÁN „MÖGÉ” ZÁRÁS



FIZIKAI MÓDSZEREK 2

GÉLBE ZÁRÁS ALGINÁT KÉPZÉS

Frissen!!!



ALGINÁT: poli-β D-mannuronsav (1→4),-guluronsav
Hidrofil, kolloid, egyenesláncú polimer *Macrocystis pyrifera*

Recept

S. cerevisiae rögzítése Kalcium alginátban

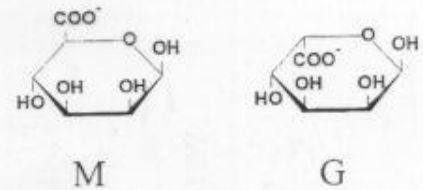
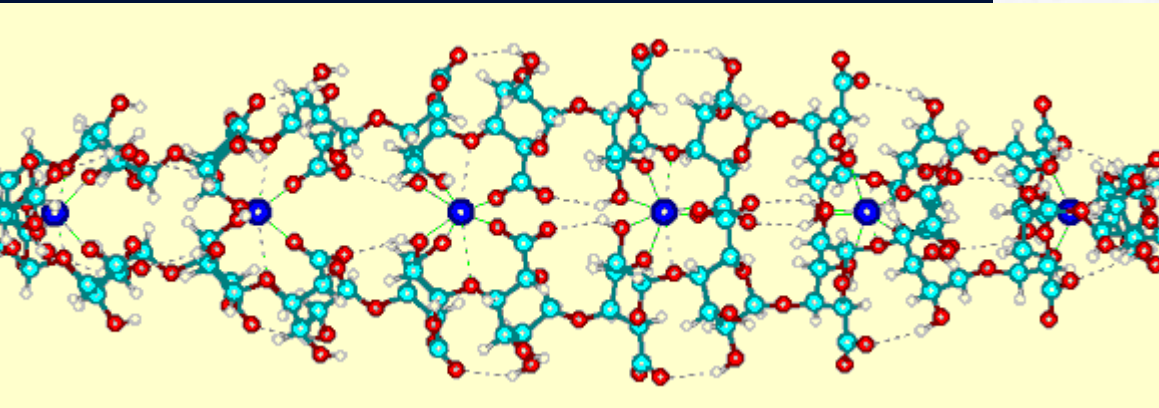
25 g nedves tömeg *S.c.* felszuszpendálható sterilvízben és összekeverni 50 ml 4%-os nátriumalginát oldattal.

A keletkező szuszpenziót nyomjuk keresztül egy szűk csövön (kb 1 mm átmérő) és csepegtessük bele 50mM-os pH6-8 CaCl_2 oldatba.

A keletkező 2,8-3 mm átmérőjű golyókat inkubáljuk 20-22 °C-on CaCl_2 oldatban, hogy megkeményedjenek a gélszemcsék.

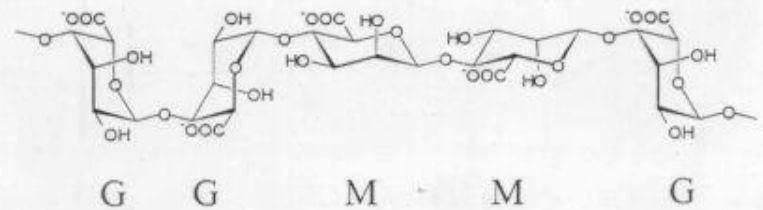


Calcium poly- α -L-gulonate left-handed helix



Alginát monomerek.
M: β -D-mannuronsav
G: α -L-guluronsav

Oldalnézet, a H-hidakkal és Ca-mal

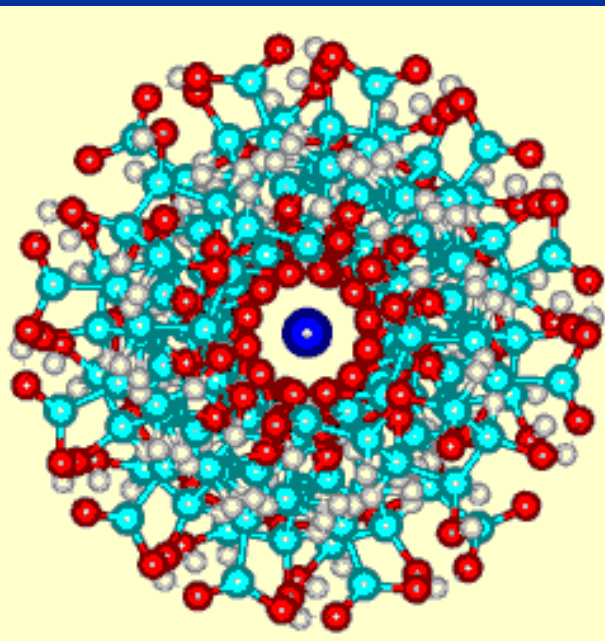


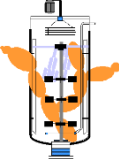
Alginát lánc. Székkonformáció



Az alginát kétértékű kation kötésének tojásrekesz modellje

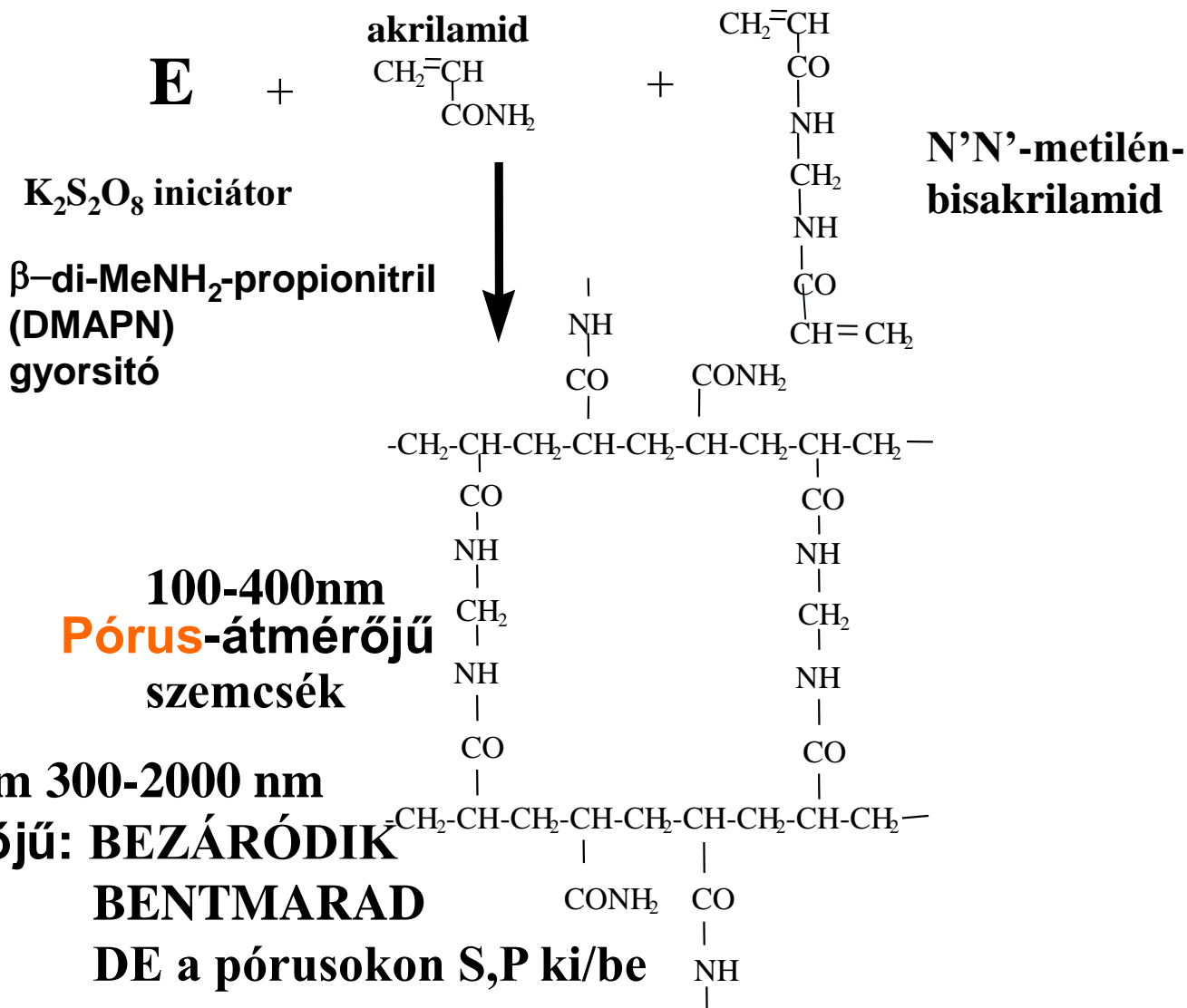
„előlnézet”,
V „alulnézet”





FIZIKAI MÓDSZEREK 3

POLIAKRILAMID GÉLBE ZÁRÁS



Recept

***E coli* gélbezárása poliakrilamiddal**

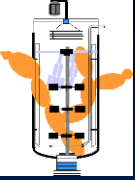
4 ml fizsóban 1 g cfugált bacisejtet szuszpendálunk

A szuszpenzióhoz 0,75 g akrilamid monomert, 40 mg bisakrilamidot, 5% DMAPN-t és 0,5 ml 2,5%-os K-perszulfátból adunk.

37 °C-on inkubáljuk 30 percig amíg bepolimerizálódik.

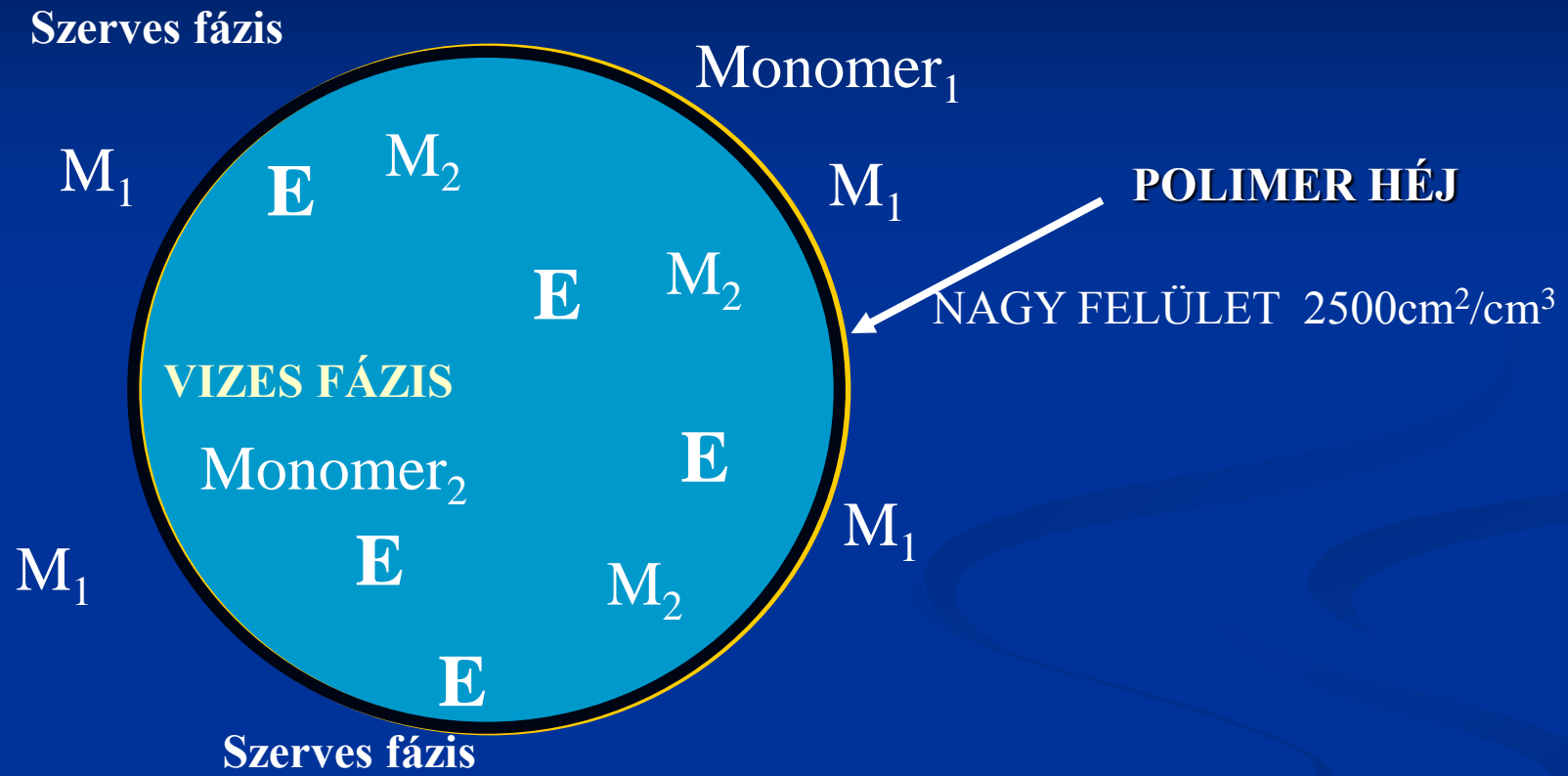
Anaerob körülmények kellene, mert az oxigén megakadályozza a polimerizációt!

Fizsós mosás, miután a megfelelő alakú szemcsék kialakultak (keverés!)

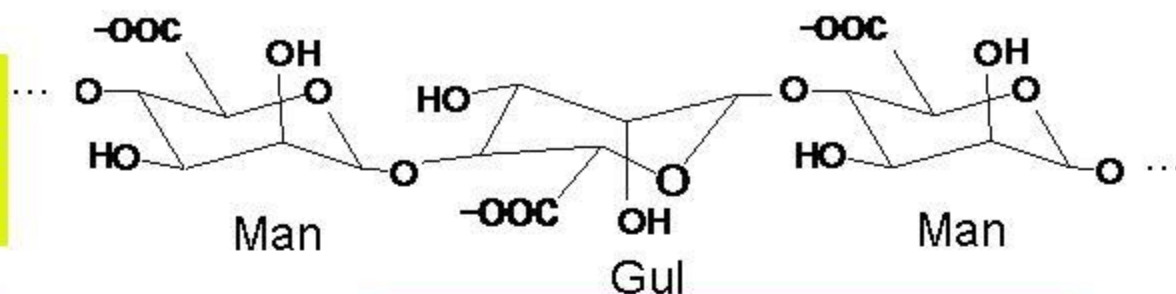


FIZIKAI MÓDSZEREK 4

MIKROKAPSZULÁZÁS: ÁLLANDÓ POLIMER MEMBRÁNOS MK



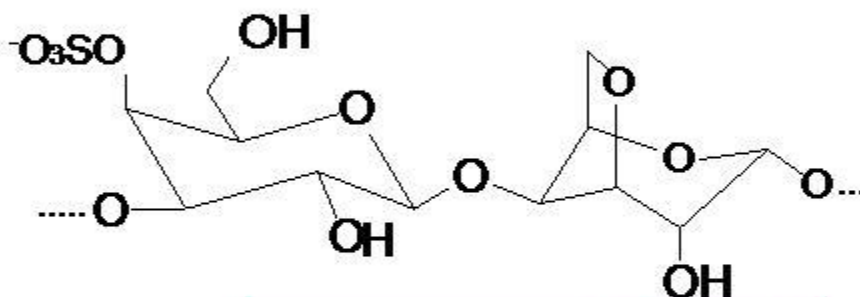
Alginát: mannuronsav, guluronsav 1,4 glikozidos heteropolimerje



polianionos

Oldat: víz gél: Ca^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+}

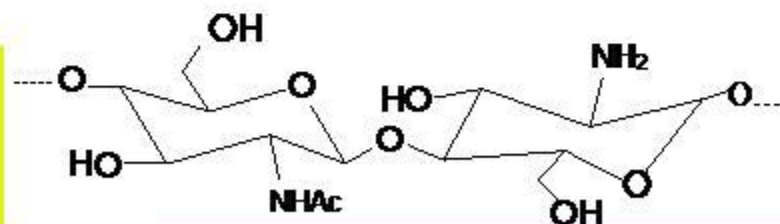
κ -karragén: galaktóz és 3,6 anhidro-galaktóz helikális biopolimerje



polianionos

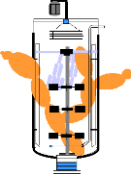
Oldat: víz gél: Ca^{++} , K^+

Kitozán: részlegesen Dezatetilezett N-acetilglükózamin polimer



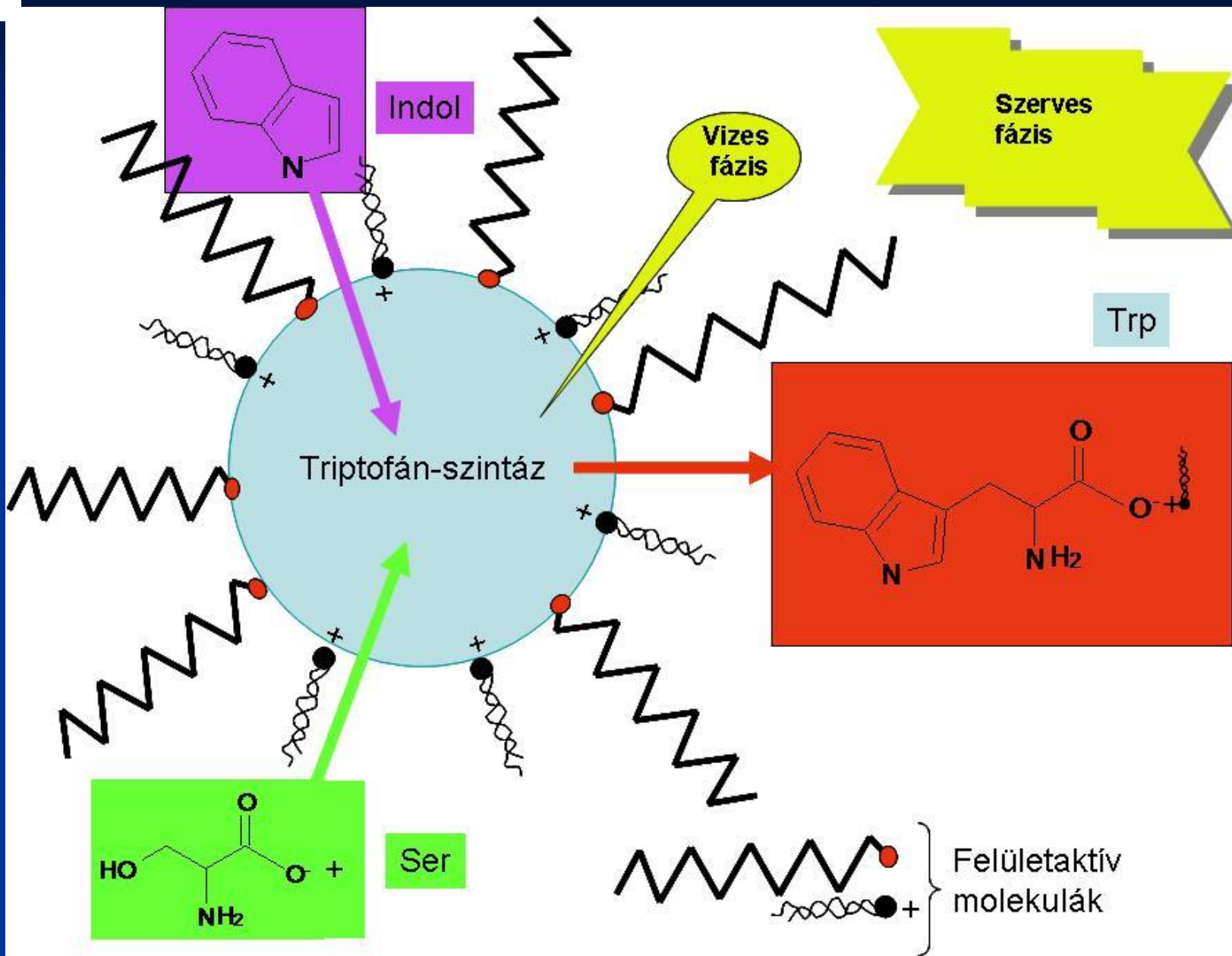
polikationos

Oldat: ecetsavas víz
gél: polifoszfátok, pH változás

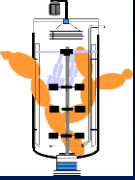


FIZIKAI MÓDSZEREK 5

MIKROKAPSZULÁZÁS: nem állandó koacervátumok: pl. REVERZ MICELLA

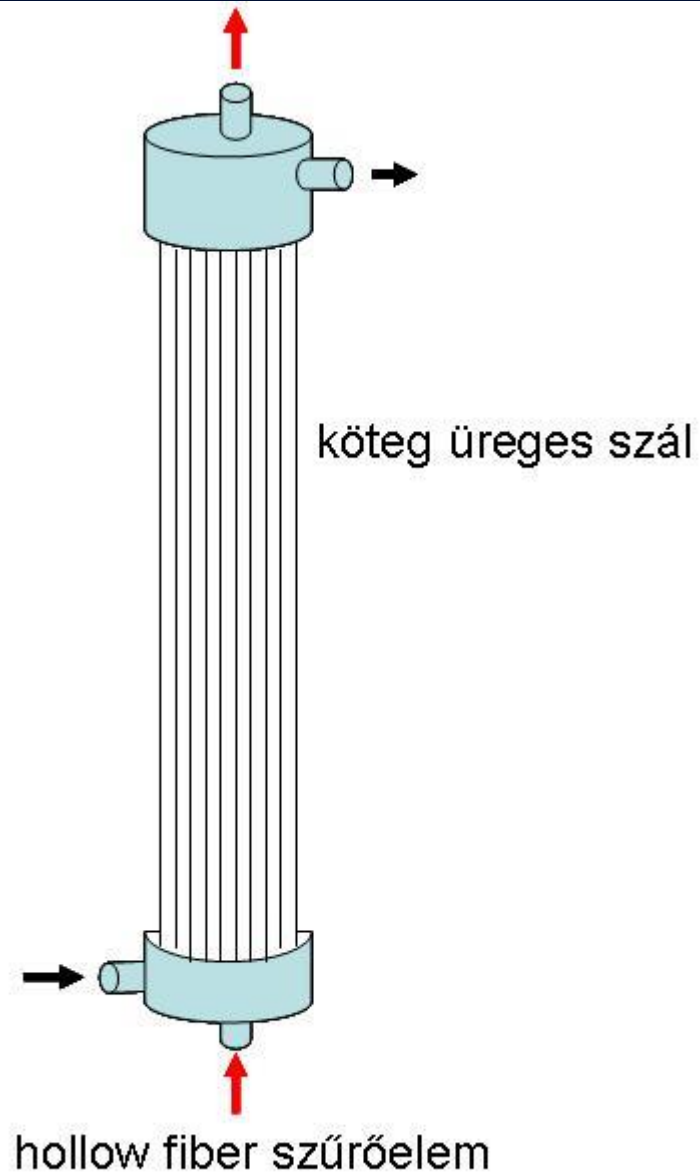
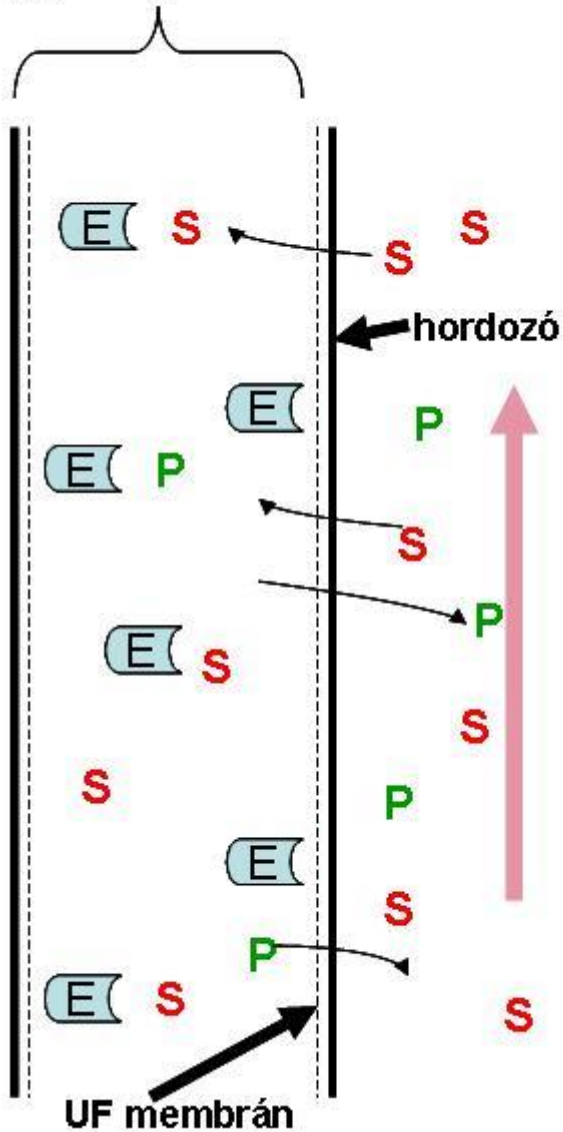


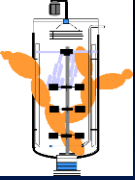
FIZIKAI MÓDSZEREK 6



ULTRASZŰRŐ MEMBRÁNOS MEGOLDÁS

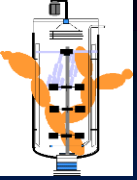
egy üreges szál





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



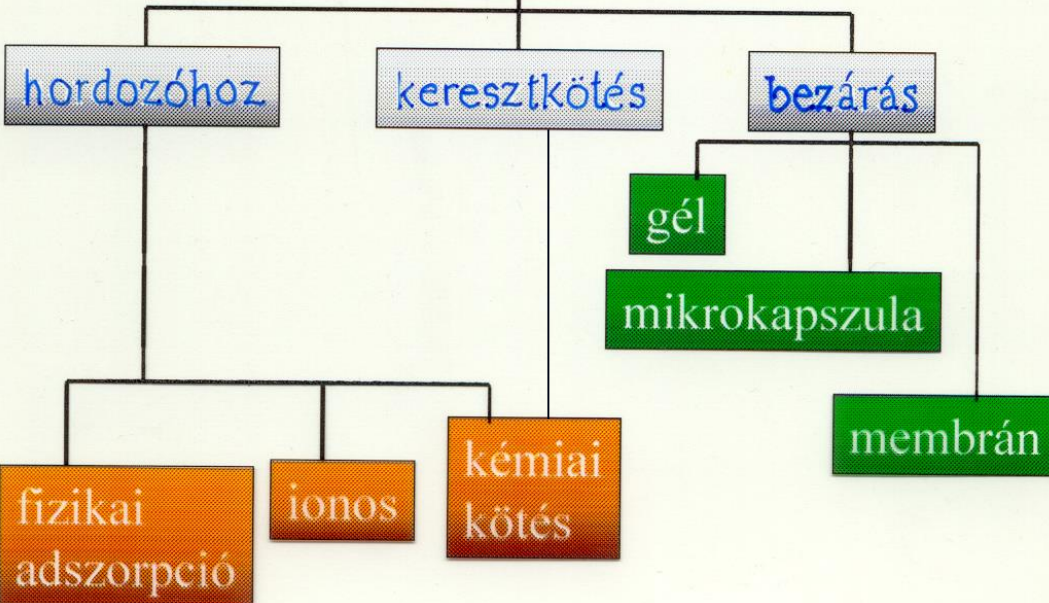
ENZIM RÖGZÍTÉS MÓDSZEREI

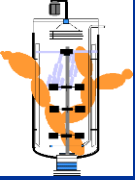
MIVEL?

FIZIKAI MÓDSZEREK

KÉMIAI MÓDSZEREK

HOVA?





RÖGZITETT ENZIMEK KINETIKÁJA

stagnáló folyadékfilm

K=konvekció

D=diffúzió

K

hordozó
részecske

D

REAKCIÓ

D

E+S

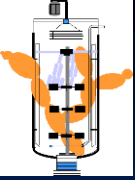
KÜLSŐ

BELSŐ

ANYAGÁTADÁS

1. **konvektív transzport** folyadék főtömegéből a rögz. enzim felületén lévő stagnáló (nem kevert) folyadék filmhez. jó keveredés → NINCS sebesség meghatározó transzport ellenállás.
2. **Diffúzió** a stagnáló folyadékfilmen keresztül a részecske felületére
3. **Diffúzió** a részecske belsejébe, a reakció tényleges helyére.





RÖGZITETT ENZIMEK KINETIKÁJA

KÜLSŐ ANYAGÁTADÁS 1

A STAGNÁLÓ FOLY. FILMBEN

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

cm/s

cm²/cm³

HA A M-M ÉRVÉNYES:
(és nincs S akkumuláció)

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

Transzformáljuk

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

DIMENZÓMENTESSÉ!!!

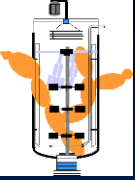
legyen $x = S/S_o$

és

$\kappa = K_s / S_o$

és

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



RÖGZITETT ENZIMEK KINETIKÁJA

KÜLSŐ ANYAGÁTADÁS 2

Damköhler szám (Da):

$$Da = V_{\max} / k_S S_0 a =$$

= maximális reakciósebesség / maximális anyagátadási sebesség

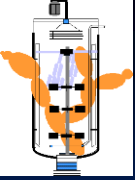
$$\frac{k_S a S_0 \left(1 - \frac{S}{S_0}\right)}{V_{\max}} = \frac{\frac{S}{S_0}}{\frac{K_S}{S_0} + \frac{S}{S_0}}$$

5 paraméter



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

2 paraméter



RÖGZITETT ENZIMEK KINETIKÁJA

KÜLSŐ ANYAGÁTADÁS 3

$$Da = V_{\max} / k_s S_0 a$$

$$Da \ll 1,$$

a.átadási sebesség \gg maximális
reakciósebesség

reakció-limitált rezsim

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_m + S} \approx V_{\max} \frac{S_0}{K_m + S_0}$$

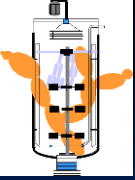
$$Da \gg 1,$$

anyagátadás \ll
reakciósebesség

*diffúzió-limitált v.
transzport rezsim*

$$V = k_s a S_0$$

($S=0$ a felületen)



RÖGZITETT ENZIMEK KINETIKÁJA

KÜLSŐ ANYAGÁTADÁS 4

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

$$(1-x)(\kappa+x) = Da \cdot x$$
$$\kappa - \kappa \cdot x + x - x^2 = Da \cdot x$$

$$x^2 + \beta x - \kappa = 0$$

megoldása

Ha $\beta > 1$

ahol

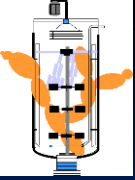
$$\beta = Da + \kappa - 1$$

$$x_{1,2} = \frac{-\beta \pm \sqrt{\beta^2 + 4\kappa}}{2}$$

ha $\beta = 0$, $x = \sqrt{\kappa}$

$$S = \sqrt{S_0 K_s}$$

ha $\beta < 1$



RÖGZITETT ENZIMEK KINETIKÁJA

KÜLSŐ ANYAGÁTADÁS 5

effektivitás-tényező:

észlelt reakciósebesség

$$\eta = \frac{\text{észlelt reakciósebesség}}{\text{reakciósebesség ha nem lenne transzport ellenállás}}$$

Ha $x=1$ $S=S_0$

$$\eta = \frac{\frac{x}{\kappa + x}}{\frac{1}{\kappa + 1}} = \frac{(\kappa + 1)}{\left(\frac{\kappa}{x} + 1\right)}$$

Méri a tömegátadás reakciót lassító hatását

Ha $Da \rightarrow 0$ = nincs transzport gátlás (reakciólimitált)

INTENZÍV
KEVERÉS!!! DE...

$$Da = V_{\max} / k_S S_0 a$$

SÉMÁHOZ

FELTÉTELEK A KINETIKAI LEÍRÁSHOZ

- 1.HOMOGEN ELOSZLÁS A RÉSZECSKÉN BELÜL
- 2.GÁTOLT DIFFÚZIÓ A PÓRUSOKBAN

EFFEKTÍV DIFFÚZIÓS ÁLLANDÓ

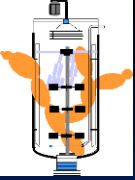
$$D_s = D_{so} \frac{\varepsilon_p}{\tau} H$$

D_{so}

DIFFÚZIÓS ÁLLANDÓ A SZABAD FOLY. FÁZISBAN

ε_p

POROZITÁS= SZABAD TÉRFOGAT / TELJES TÉRFOGAT



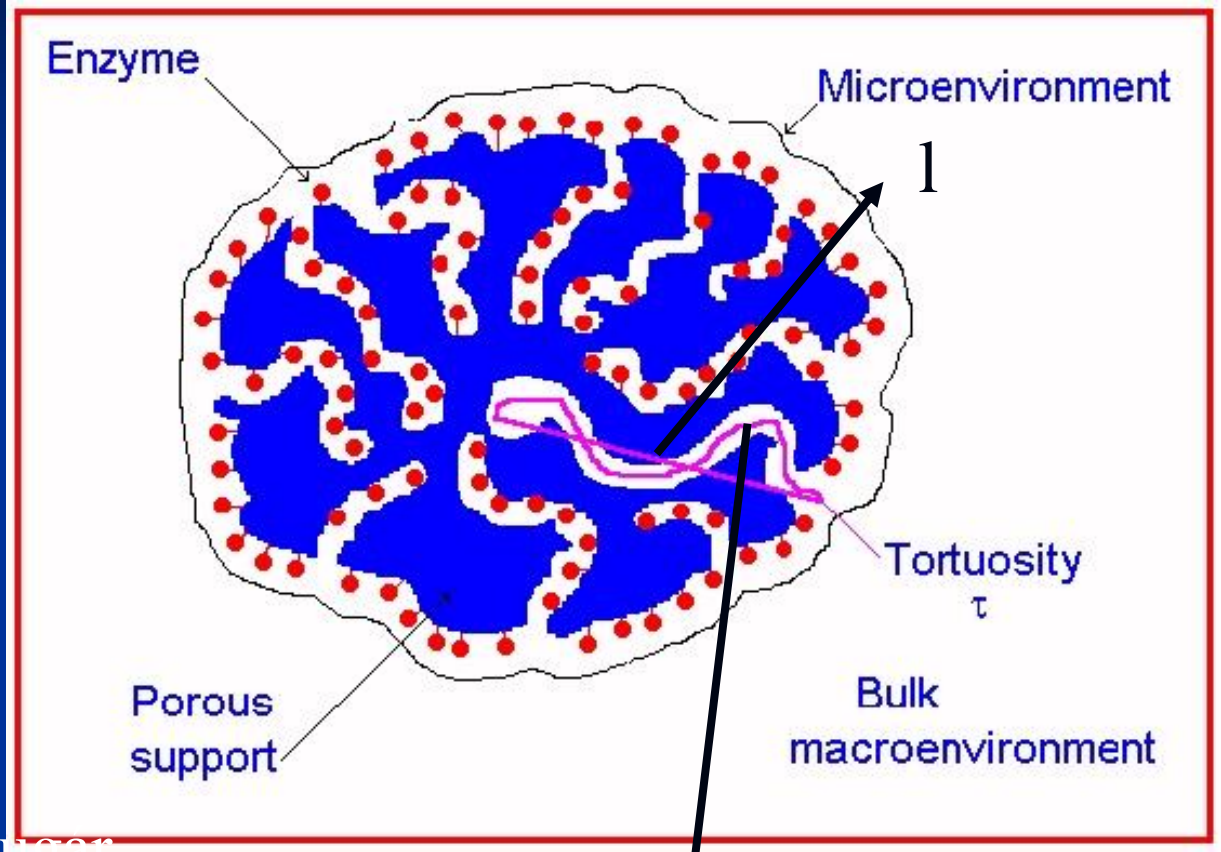
RÖGZITETT ENZIMEK KINETIKÁJA

BELSŐ ANYAGÁTADÁS 2

Ha a pórus $\gg S \rightarrow H=1$

τ

kacsringósság=
átlagos (h / l)



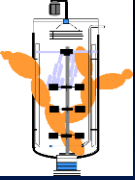
Molekuláris
diffúziógátlás mértéke:
(hindrance)

$$H \cong \left(1 - \frac{r_S}{r_P} \right)^4$$

r_{Subs} , r_{Pore} ekvivalens sugar

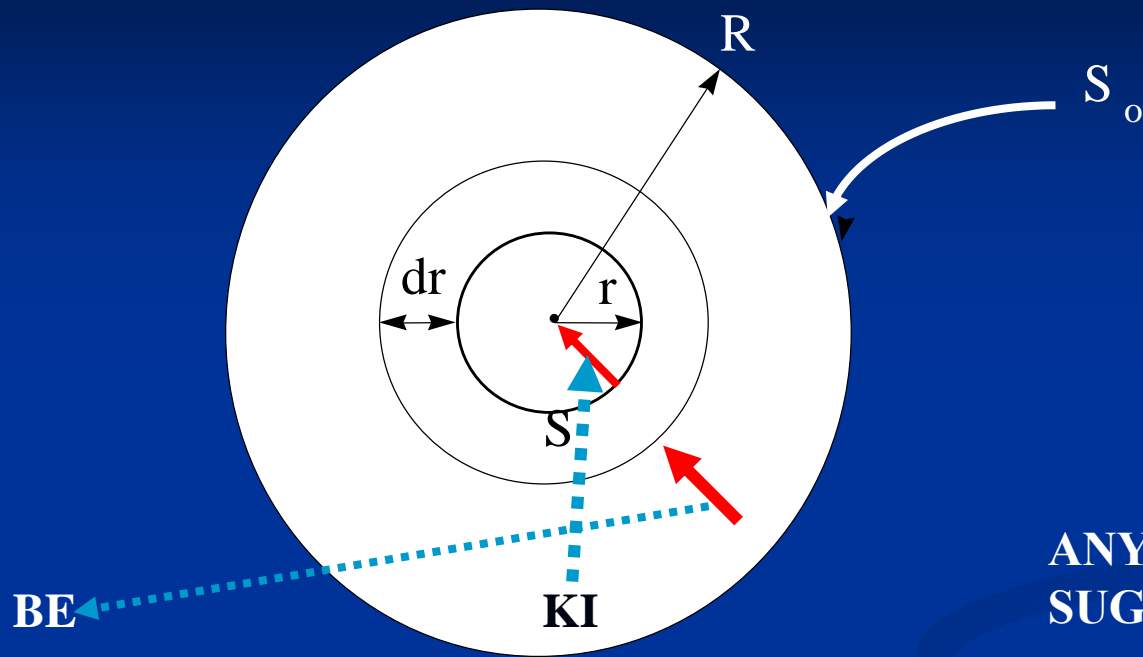
- 3. Külső határréteg elhanyagolható
- 4. Gömbszimmetrikus részecske

$$D_s = D_{so} \frac{\varepsilon_p}{\tau} H$$



RÖGZITETT ENZIMEK KINETIKÁJA

BELSŐ ANYAGÁTADÁS 3

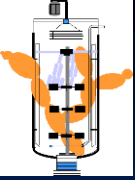


ANYAGMÉRLEG AZ r és $r+dr$ SUGARÚ GÖMBHÉJRA

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

$$4\pi(r+dr)^2 D_s \left[\frac{dS}{dr} + \frac{d}{dr} \left(\frac{dS}{dr} \right) dr \right] - 4\pi r^2 D_s \frac{dS}{dr} - (4\pi r^2 dr) \cdot V = (4\pi r^2 dr) \frac{dS}{dt}$$

Régi jegyzet: (55)egy.rossz, 113.oldalon, ez a jó, de.....



RÖGZÍTETT ENZIMEK KINETIKÁJA

BELSŐ ANYAGÁTADÁS 4

ÁLLANDÓSULT ÁLLAPOTBAN: $dS/dt=0$

$$\left| D_s 4\pi.r^2 \frac{dS}{dr} \right|_{r+dr} - \left| D_s 4\pi.r^2 \frac{dS}{dr} \right|_r = (4\pi.r^2 dr) V \quad / \quad :4\pi dr$$

$$\frac{\left| D_s . r^2 \frac{dS}{dr} \right|_{r+dr} - \left| D_s . r^2 \frac{dS}{dr} \right|_r}{dr} = r^2 V$$

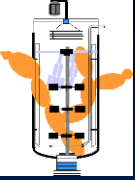
VEGYÜK A $dr \rightarrow 0$ határátmenetet!

$$D_s \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dS}{dr} \right) = r^2 V$$

VÉGEZZÜK EL A DERIVÁLÁST:

$$D_s \left(2r \frac{dS}{dr} + r^2 \frac{d^2 S}{dr^2} \right) = r^2 V \quad / \quad :r^2$$

$$D_s \left(\frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dS}{dr} \right) = V$$



RÖGZITETT ENZIMEK KINETIKÁJA

BELSŐ ANYAGÁTADÁS 5



$$D_s \left(\frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dS}{dr} \right) = V$$

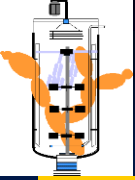
**BIZONYOS FELTÉTELEK MELLETT
MEGOLDHATÓ**

***MÁS, RÉSZECSKÉKBE TÖRTENŐ
ANYAGÁTADÁST IS EZZEL IRNAK LE!
Pl.: gomba pellet, sejt,...***

MEGOLDÁSAI: 1. NULLADRENDŰ ENZIMES REAKCIÓ
2. ELSŐRENDŰ ENZIMES REAKCIÓ ESETÉN
3. MICHAELIS-MENTEN KINETIKA ESETÉN

ROGZÍTETT ENZIMEK KINETIKAJA

BELSŐ ANYAGÁTADÁS 6



1. NULLADRENDŰ REAKCIÓ

$$V = \begin{cases} k_0 & \text{ha } S > 0 \\ 0 & \text{egyébként.} \end{cases}$$

$$K_m \ll S, \quad \rightarrow \quad k_0 = V_{\max}$$

$$\left(\frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dS}{dr} \right) - \frac{k_0}{D_s} = 0$$

HATÁRFELTÉTELEK: $\text{ha } r \rightarrow 0 \quad S \rightarrow 0$
 $\text{ha } r = R \quad S = S_0$

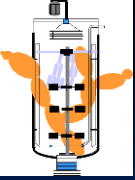
$\alpha = rS$ helyettesítés

$$\frac{d^2 \alpha}{dr^2} = \frac{k_0}{D_s} r$$

$$\begin{aligned} \frac{d\alpha}{dr} &= r \frac{dS}{dr} + \frac{dr}{dr} S = r \frac{dS}{dr} + S \\ \frac{d^2 \alpha}{dr^2} &= r \frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{dS}{dr} + \frac{dS}{dr} = r \frac{d^2 S}{dr^2} + 2 \frac{dS}{dr} \quad /:r \\ \frac{1}{r} \frac{d^2 \alpha}{dr^2} &= \left(\frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dS}{dr} \right) \end{aligned}$$

Integráljuk
kétszer

$$\alpha = \frac{1}{6} \frac{k_0}{D_s} r^3 + C_1 r + C_2$$



RÖGZITETT ENZIMEK KINETIKÁJA

BELSŐ ANYAGÁTADÁS 7

Visszaírva S-t

$$\alpha = \frac{1}{6} \frac{k_o}{D_s} r^3 + C_1 r + C_2$$

$$S = \frac{1}{6} \frac{k_o}{D_s} r^2 + C_1 + \frac{C_2}{r}$$

ha $r = 0$ akkor $S=0$, $\rightarrow C_2 = 0$

a másik peremfeltételből C_1
kiszámítható:

$$C_1 = S_o - \frac{1}{6} \frac{k_o}{D_s} R^2$$

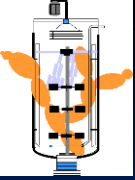
Végső megoldás
0-ad rendű reakciónál

$$\frac{S}{S_o} = \frac{1}{6} \frac{k_o R^2}{S_o D_s} \left(\frac{r^2}{R^2} - 1 \right) + 1$$

AHOL S NULLÁVÁ VÁLIK, MÁR NINCS REAKCIÓ

KRITIKUS SUGÁR

$$\frac{R_c}{R} = \sqrt{1 - \frac{6 S_o D_s}{k_o R^2}}$$



RÖGZITETT ENZIMEK KINETIKÁJA

BELSŐ ANYAGÁTADÁS 8

A reakciósebesség tehát, amely az $R-R_c$ vastagságú gömbhéjban érvényes, a következő:

$$\frac{4}{3} \pi (R^3 - R_c^3) k_o$$

HA NINCS TRANSZPORT GÁTLÁS, A MAX. SEBESSÉG:

$$\frac{4}{3} \pi R^3 k_o$$

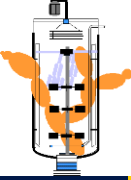
EFFEKTIVITÁS
tényleges
maximális

$$\eta = 1 - \left(\frac{R_c}{R} \right)^3 = 1 - \left(1 - \frac{6D_s S_o}{k_o R^2} \right)^{\frac{3}{2}}$$

Növelik!

Csökkentik!

$$\% \frac{R_c}{R} = \sqrt{1 - \frac{6S_o D_s}{k_o R^2}}$$



RÖGZITETT ENZIMEK KINETIKÁJA

BELSŐ ANYAGÁTADÁS 9

2. ELSŐRENDŰ REAKCIÓ ESETÉN

$$D_s \left(\frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dS}{dr} \right) = kS$$

ha $S \ll K_m$, vagyis ha a $V = kS$

BEVEZETÉSEK:

$$S' = \frac{S}{S_0}$$

$$r' = \frac{r}{R}$$

$$\frac{d^2 S'}{dr'^2} + \frac{2}{r'} \frac{dS'}{dr'} - 9\Phi^2 S' = 0$$

PEREMFELTÉTELEK:

$$S' = 0 \quad \text{ha} \quad r' = 0$$

$$S' = 1 \quad \text{ha} \quad r' = 1$$

$$\Phi = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{k}{D_s}}$$

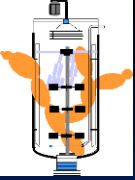
THIELE-modulus

(Reakc.seb./diff.seb)

LEGYEN

$$\alpha' = r' S'$$

$$\frac{d^2 \alpha'}{dr'^2} - 9\Phi^2 \alpha' = 0$$



RÖGZITETT ENZIMEK KINETIKÁJA

BELSŐ ANYAGÁTADÁS 10

MEGOLDÁS:

$$\alpha' = C_1 \cosh 3\Phi r' + C_2 \sinh 3\Phi r'$$

$$S' = \frac{1}{r'} (C_1 \cosh 3\Phi r' + C_2 \sinh 3\Phi r')$$

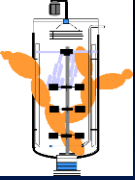
$$S' = 0 \quad \text{ha} \quad r' = 0 \quad \longrightarrow \quad C_1 = 0$$

$$S' = 1 \quad \text{ha} \quad r' = 1 \quad \longrightarrow \quad C_2 = \frac{1}{\sinh 3\Phi}$$

$$S' = \frac{\sinh 3\Phi r'}{r' \sinh 3\Phi}$$

$$\cosh(x) = \frac{e^x + e^{-x}}{2}$$

$$\sinh(x) = \frac{e^x - e^{-x}}{2}$$

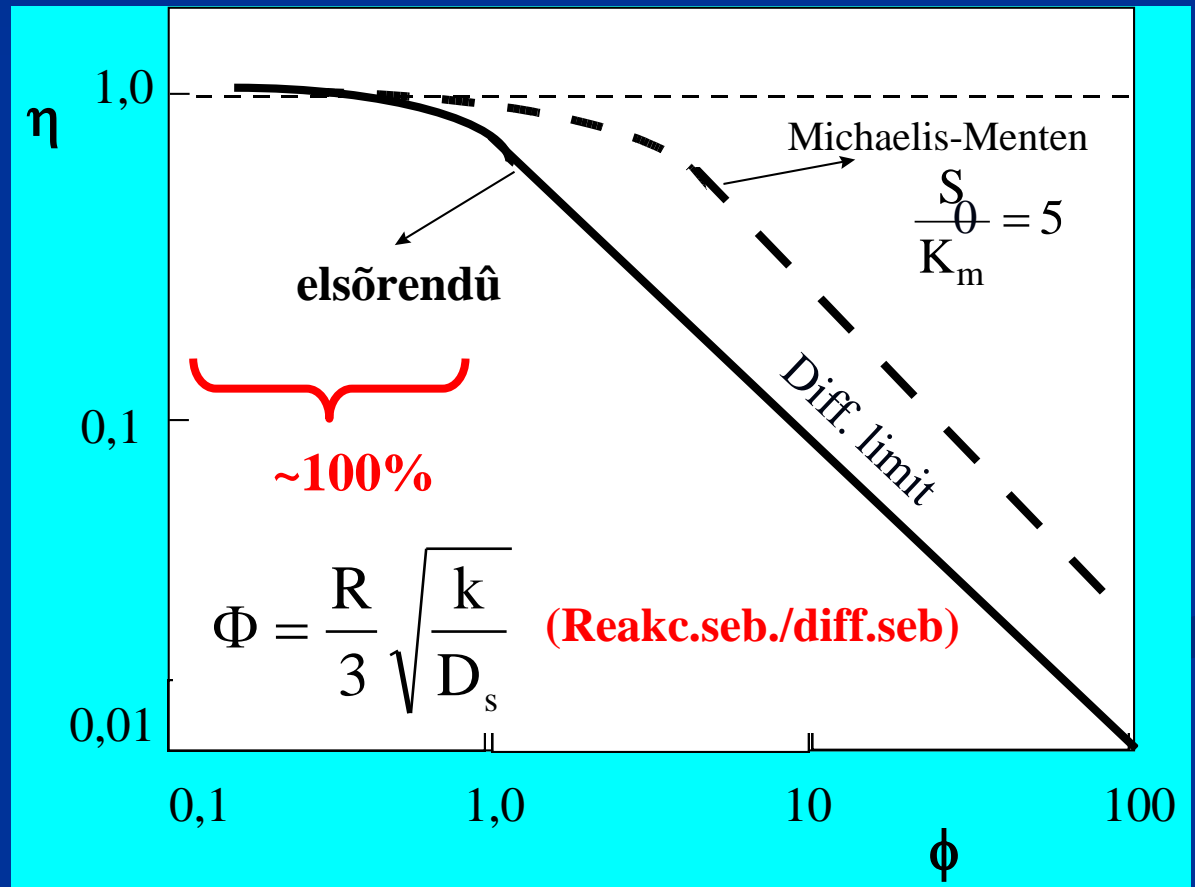


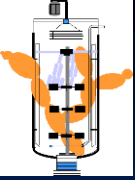
RÖGZITETT ENZIMEK KINETIKÁJA

BELSŐ ANYAGÁTADÁS 11

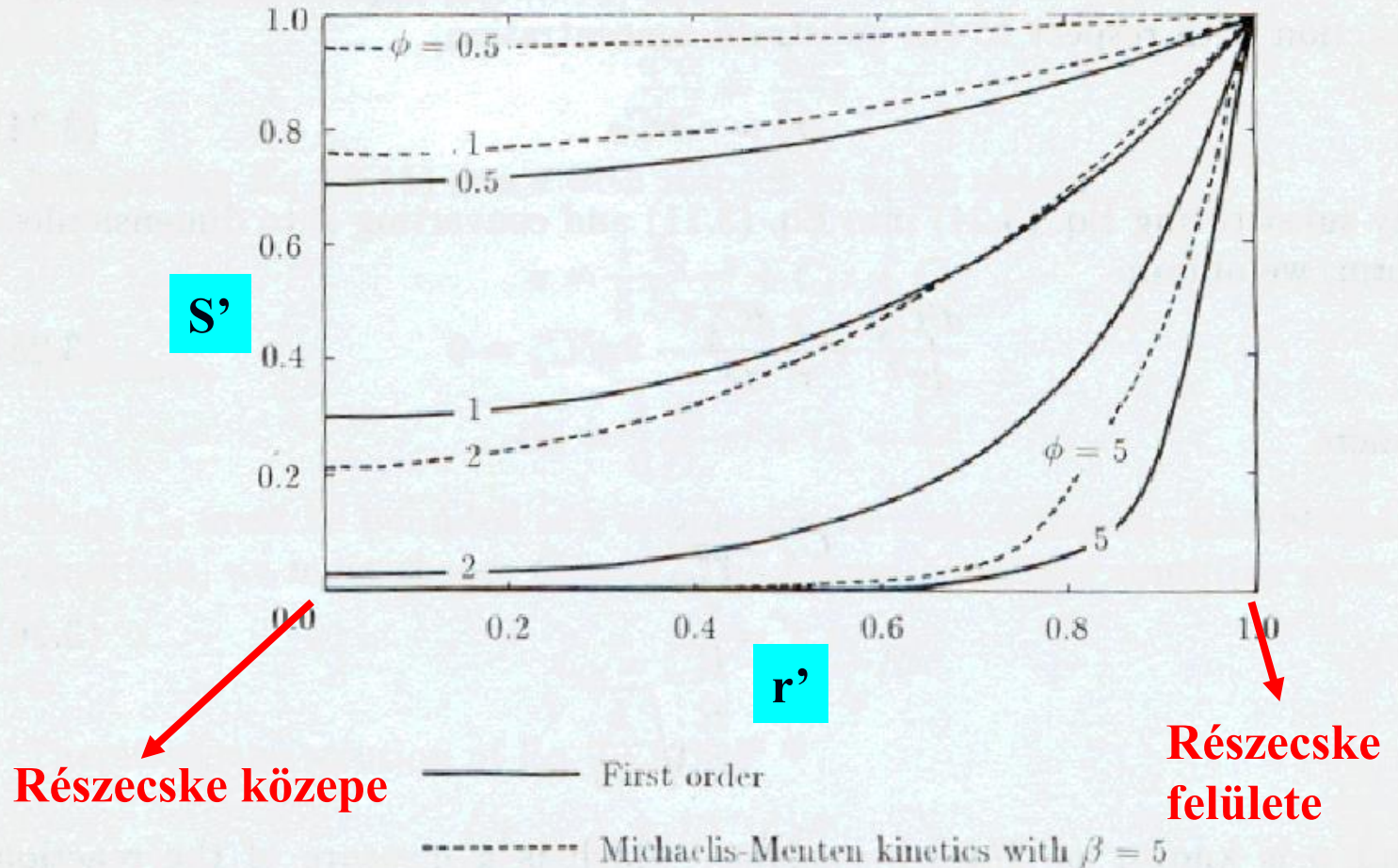
$$\eta = \frac{\text{anyagátadás. a.részecskében}}{\text{hipotetikus \cdot reakciósebesség \cdot az \cdot oldatban}} = \frac{\left. \frac{A_p}{V_p} D_s \frac{dS'}{dr'} \right|_{r'=1}}{kS_o}$$

$$\eta = \frac{3\Phi \coth 3\Phi - 1}{3\Phi^2}$$

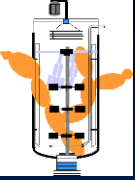




RÖGZITETT ENZIMEK KINETIKÁJA



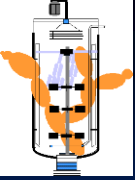
$$\Phi = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{k}{D_s}}$$



RÖGZITETT ENZIMEK

Néhány szubsztrát tipikus effektív diffúziós állandója

szubsztrát	gél(hordozó)	koncentráció %	hőmérséklet oC	D_s m^2/s
glükóz	Ca-alginát	2	25	$6.1 \cdot 10^{-10}$
etanol	Ca-alginát	2	25	$1.0 \cdot 10^{-9}$
szaharóz	zselatin	0	2	$2.85 \cdot 10^{-10}$
szaharóz	zselatin	3.8	2	$2.09 \cdot 10^{-10}$
szaharóz	zselatin	5.7	2	$1.86 \cdot 10^{-10}$
szaharóz	zselatin	7.6	2	$1.35 \cdot 10^{-10}$
laktóz	zselatin	25	2	$0.35 \cdot 10^{-10}$
L-triptofán	Ca-alginát	2	30	$6.67 \cdot 10^{-10}$



RÖGZÍTETT ENZIMEK

OLDOTT ENZIMEK ELŐNYÖK

- * HOMOGEN RENDSZER
- * ELŐKÉSZÍTÉS NINCS
- * CSAK REAKCIÓ-REZSIM VAN

HÁTRÁNYOK

- * DRÁGÁK 1-10-50 \$/mg
- * ELVESZNEK
- * A TERMÉKET SZENNYEZIK
- * CSAK SZAKASZOS TECHNOLÓGIA

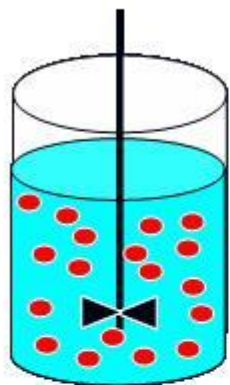
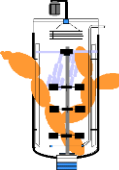
RÖGZÍTETT ENZIMEK ELŐNYÖK

- * NEM SZENNYEZIK A TERMÉKET
- * KÖNNYEN ELVÁLASZTHATÓK
- * ÚJRA FELHASZNÁLÁSI LEHETŐSÉG
- * FOLYTONOS TECHNOLÓGIA IS

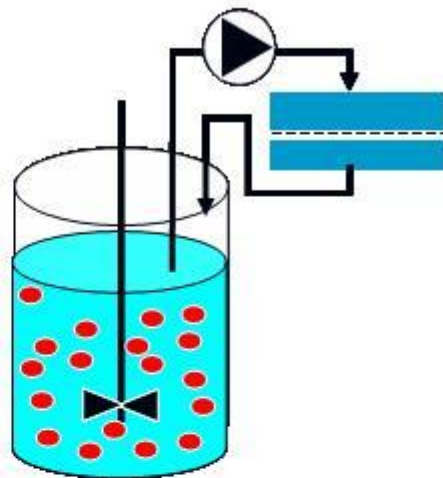
....általános előnyei

HÁTRÁNYOK

- * KÖNNYŰ TERMINÁLÁS
- * STABILISABB LEHET
- * RÖGZÍTÉS KÖLTSÉGES (ELŐKÉSZÍTÉS)
- * CSÖKKEN AZ ENZIM AKTIVITÁSA
- * DIFFÚZIÓS GÁT (TRANSPORT-REZSIM IS)



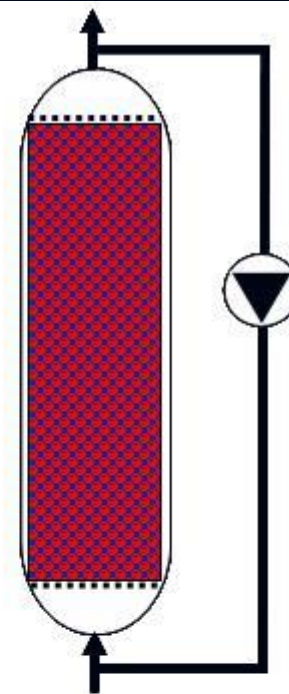
Szakaszos reaktor
STR



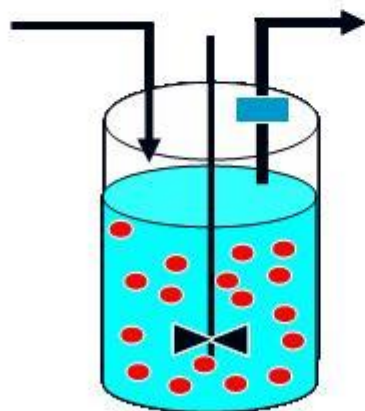
Folytonos reaktor
recirkulációval
CSTR



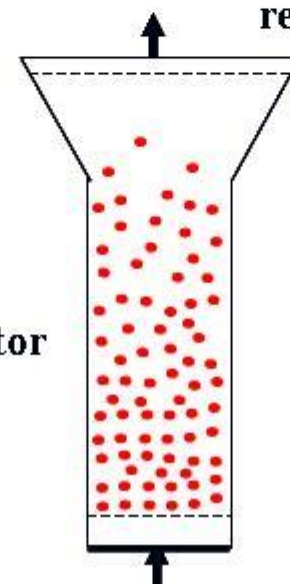
Töltött oszlop reaktor
PFR



Töltött oszlop reaktor
recirkulációval
PFR



Folytonos reaktor
CSTR



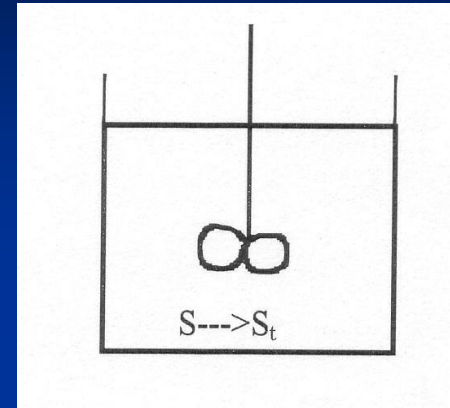
Fluididágyas reaktor

Szakaszos és CSTR reaktorok

- Oldott v. rögzített enzim használata
- Fontos a megfelelő keveredés
- Kívánt konverzió elérésekor a reaktor teljes leengedése

Hátrányai:

- Méretnövelés nehézségei
- Enzimvisszanyerés miatti nagy holtidő, illetve nem lehetséges oldottnál.

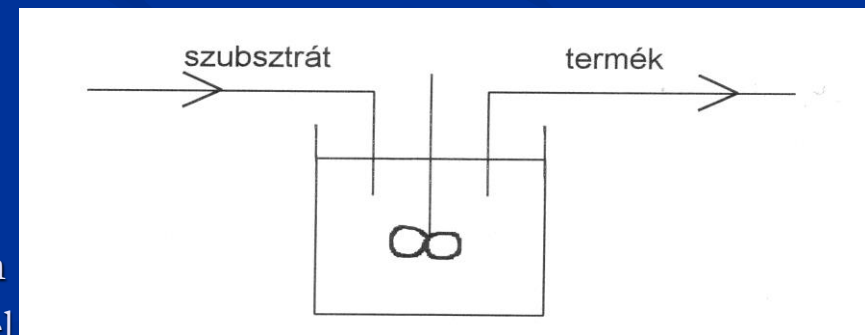


■ Előnyei:

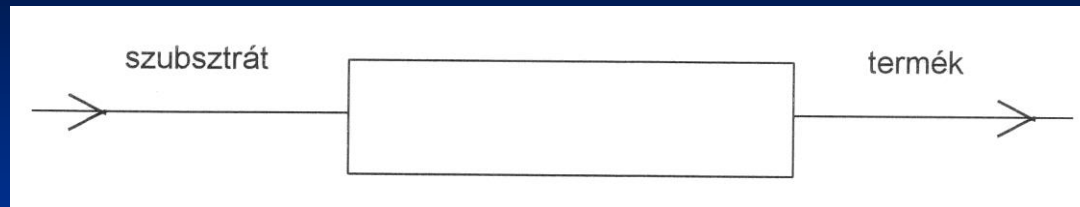
- Alacsony beruházási költségek
- Jó pH- és hőmérséklet szabályozás
- Szubsztrát inhibíció elkerülhető !
- Könnyű gáz- és katalizátor adagolás

■ Hátrányai:

- Nagy teljesítményfelvétel
- Kis biokatalizátor koncentráció tartható fenn
- A szakaszosnál kisebb konverziók érhetőek el
- Termékinhibícióra érzékeny



Dugóáramú (PFR) csőreaktor



- Immobilizált biokatalizátorral töltött
- Előnyei:
 - Kinetikailag hatékonyabb
 - Könnyebb automatizálhatóság
 - Egyszerűbb működtetés
 - Magas biokatalizátor koncentráció
 - Kisebb a termék-inhibíció
- Hátrányai:
 - Hajlamos szubsztrát-inhibícióra
 - Probléma a hőmérséklet és pH állandó értéken tartása
 - Nehéz a gáznemű reaktánsok bevezetése

Fluidágyas reaktorok

■ Előnyei:

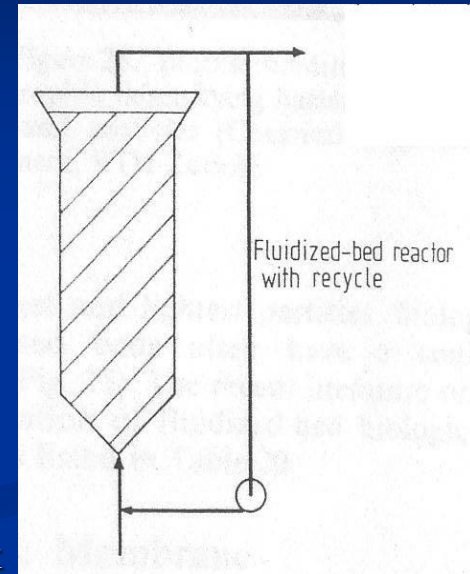
- A katalizátor részecskék szuszpendálása és keverése a gáz v. a szubsztrát gyors felfelé irányuló áramával történik, ezért szilárd részecskéket tartalmazó szubsztrátok is használhatók
- Egyszerű hőmérséklet- és pH kontroll, valamint gázbevezetés

■ Hátrányai:

- A nagy szubsztrátáramlási sebesség, ami a részecskék fluidizálásához kell, a katalizátor kimosódását okozhatja, ezáltal kis konverzió érhető el
- Üzemeltetés drága
- Méretnövelés nehéz

■ Kimosódás elkerülése:

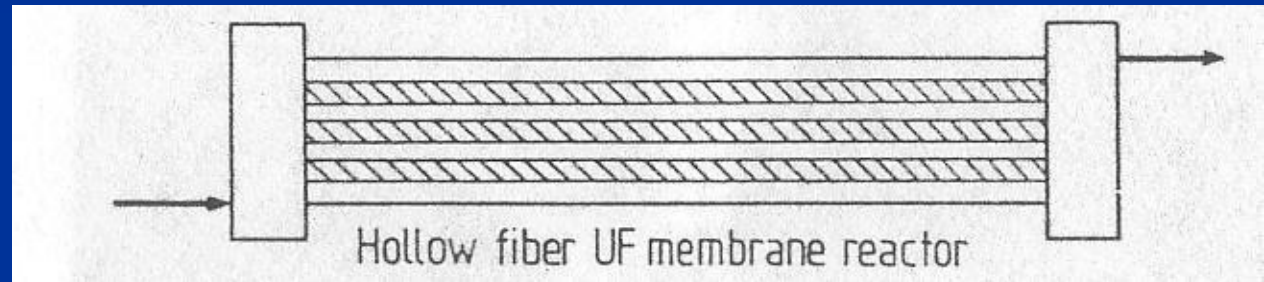
- Szubsztrát visszavezetése, teljes konverzióig
- Reaktorok sorbakötése



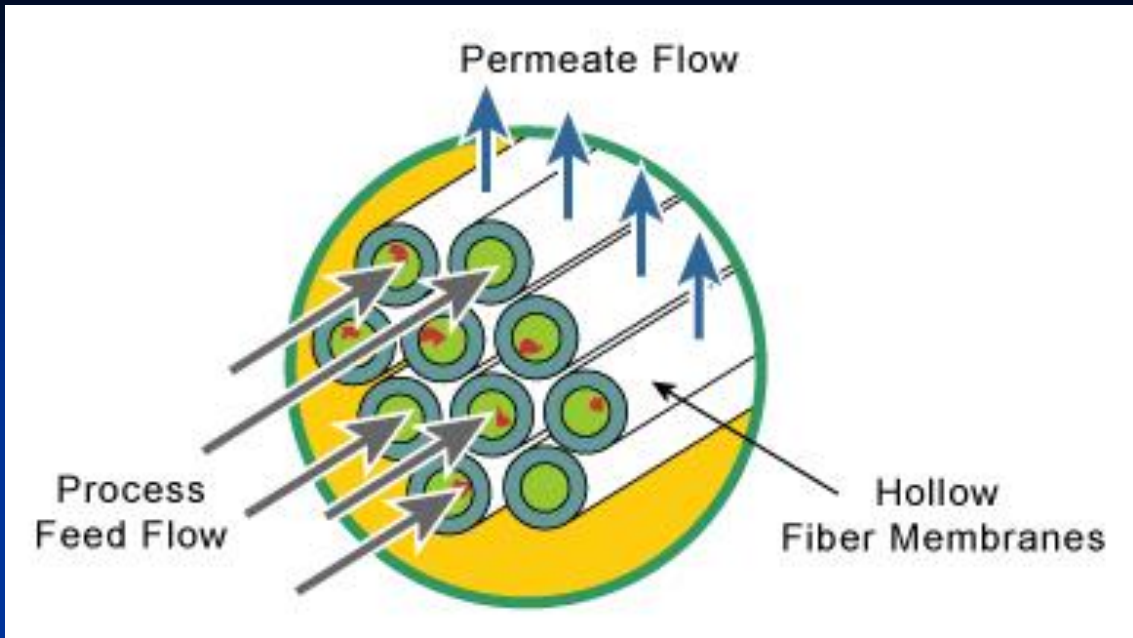
Ultraszűrő reaktorok

Az ultraszűrő membránok lehetővé teszik a kis és nagy molekulásúlyú reaktánsok elválasztását

Depolimerizációs reakcióhoz ezek a legalkalmasabbak, oldható enzimek használatával biztosítható bennük a legjobb érintkezés a szubsztrátokkal (makromolekulák)

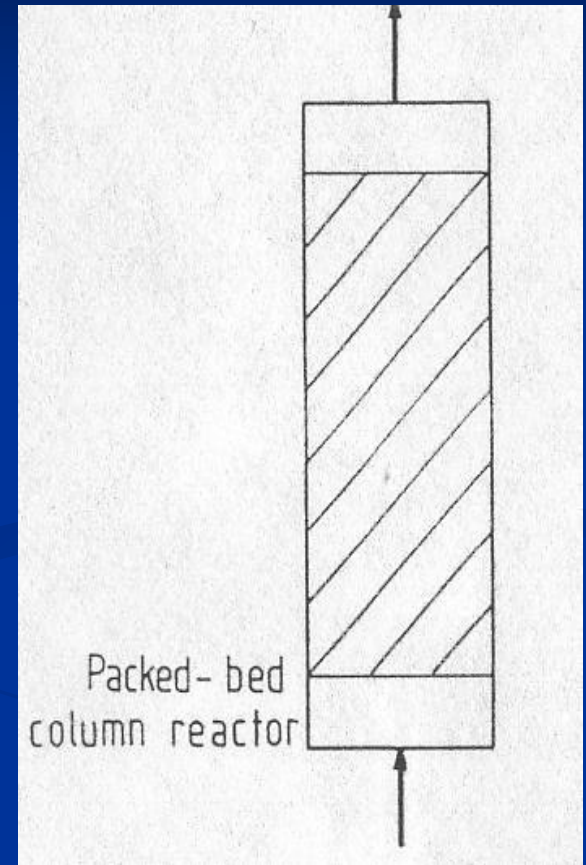


- Visszatartják az enzimeket és a sejteket, amik a membránszálakon belül találhatóak, viszont a szubsztrátokat és termékeket átengedik, miközben azok keresztülfolynak a reaktoron
- A pórusméret megválasztásával elérhető, hogy a membrán csak a terméket engedje át, a szubsztrátot ne, így elkerülhető a termékinhibíció



Töltött ágyas oszlopreaktor

- Immobilizált enzimek vagy sejtek alkalmazhatók benne biokatalizátorként
- A laboratóriumi és az ipari folyamatos reaktorok fő típusa



Note! Az enzim preparálása nem mindig szükséges.

teljes sejt immobilizálás: költségkímélő (l. intracelluláris enzimek...)
természetes környezet
védelem
koenzimregenerálás

a módszerek ugyanazok

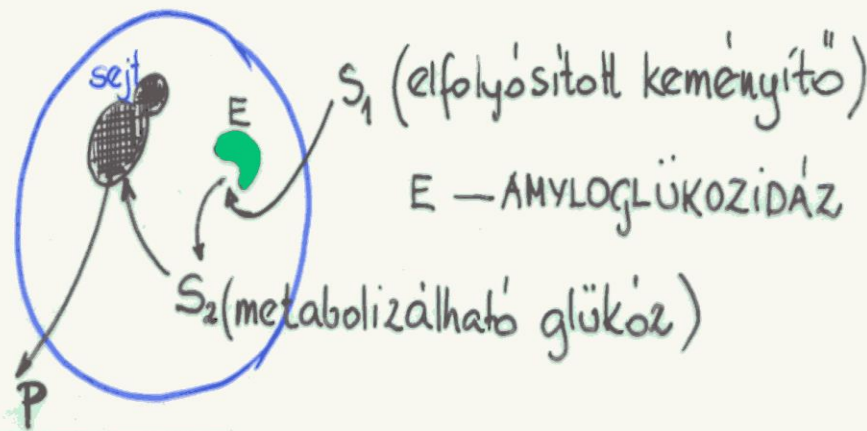
Élő sejt

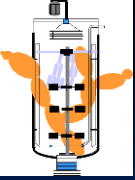
Nem élő sejt preparátum

koenzimes átalakítások

permeabilizálás egyszerű átalakítások (pl laktózhidrolízis)

-KOMBINÁLT TECHNOLÓGIÁK (MAXAFERM)





RÖGZITETT ENZIMEK

IPARI ALKALMAZÁSOK:

Aminoaciláz	D,L-AS rezolúciós
Glikózizomerase	gl → fr ($> 8 \cdot 10^6 t$)
Pen. amidaáz	<u>G-APA előállítás</u>
β -Galaktozidaáz	Lac → gl + gal (TEF)
Lipáz	zsírok de-észterezése
Nitril-hidrataáz	akrilonitril → akrilamid
Aspartáz	L-asparaginsav ea'

Alapfogalmak az enzimtechnológiában

Konverzió: átalakult molok száma/ kiindulási molok száma

$$X_S = \frac{n_{S_0} - n_S}{n_{S_0}}$$

Hozam=yield : szintetizált molok száma/ kiindulási molok száma

$$\eta_P = \frac{n_P - n_{P_0}}{n_{S_0}} \left(\frac{v_S}{v_P} \right)$$

Ahol n_P termék mol a reakció végén

n_{P_0} termék mol a reakció elején

n_{S_0} szubsztrát a reakció elején

v_S a szubsztrát sztöhiometriai faktora

v_P a termék sztöhiometriai faktora

Szelektivitás: szintetizált molok száma / konvertált molok száma

$$\sigma_P = \frac{n_P - n_{P_0}}{n_{S_0} - n_S} \left(\frac{v_S}{v_P} \right)$$

Annál jobb minél közelebb van az 1-hez.

Ha nem, minél távolabb, annál több a melléktermék ill szennyezés

A előző három fogalom összefüggése:

$$\eta = \sigma \cdot X_S$$

Hozam = szelektivitás . Konverzió

$$\eta_P = \frac{n_P - n_{P_0}}{n_{S_0}} \left(\frac{v_S}{v_P} \right)$$

$$\sigma_P = \frac{n_P - n_{P_0}}{n_{S_0} - n_S} \left(\frac{v_S}{v_P} \right)$$

$$X_S = \frac{n_{S_0} - n_S}{n_{S_0}}$$

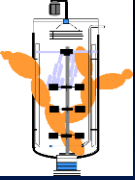
Enantiomer felesleg:

a két enantiomer különbségének viszonya az összegükhöz,
(Azaz a teljeshez képest mennyire van feleslegben az egyik,
az adott enantiomer „tisztaságát méri)

$$ee_R = \frac{n_R - n_S}{n_R + n_S}$$

Egy enzim sztereo szelektivitása: az S- és az R-enantiomer
átalakítási sebességének hányadosa
egy racém keverékből

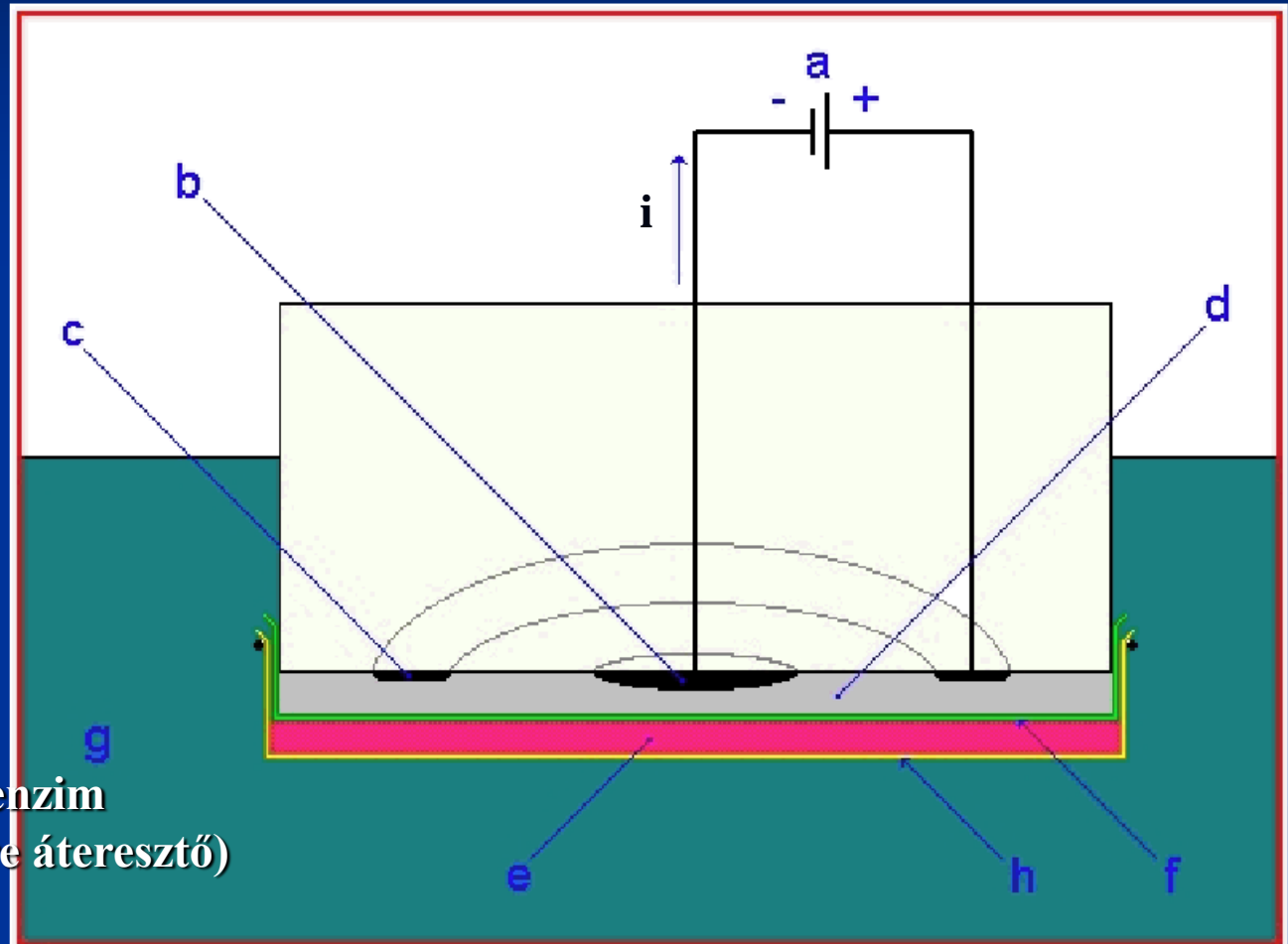
$$E = \frac{v_S}{v_R} = \frac{\ln \left(\frac{1 - ee_S}{1 + \frac{ee_S}{ee_R}} \right)}{\ln \left(\frac{1 + ee_S}{1 + \frac{ee_S}{ee_R}} \right)}$$



Enzimlektród 1

Speciális alkalmazás

AMPEROMETRIÁS



a.) FESZÜLTÉSÉG

b) platina katód

c) ezüst anód

d) Telített KCl oldat

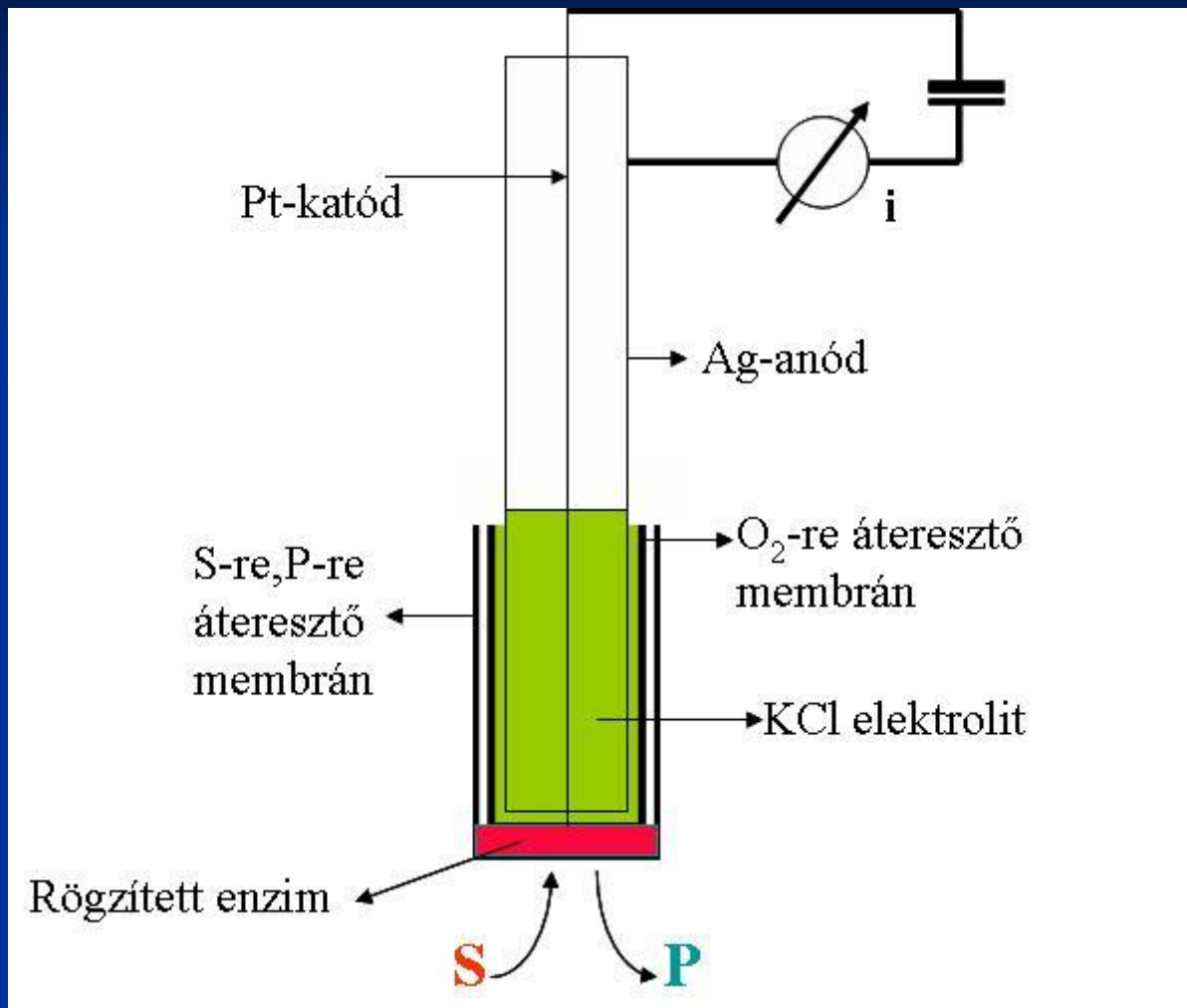
e.) biokatalizátor rögzített enzim

f) acetát membrán (oxigénre áteresztő)

g) analyte

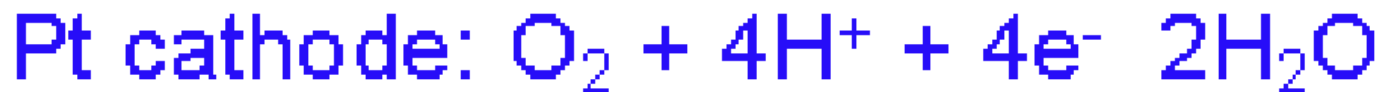
h) polycarbonate membrán (permeábilis oxigénre, szubsztrátra termékre)

i) az elektródok között folyó áram



Enzimlektród 2

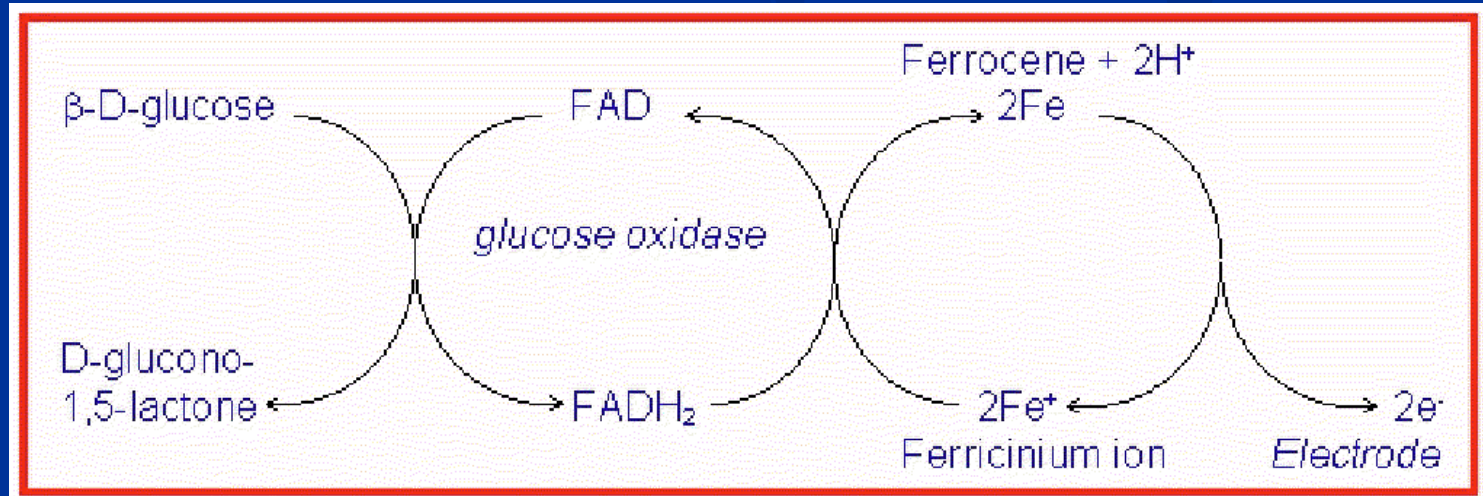
ELEKTRÓDFOLYAMAT



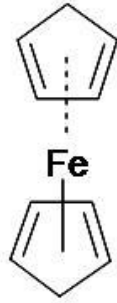
PÉLDA



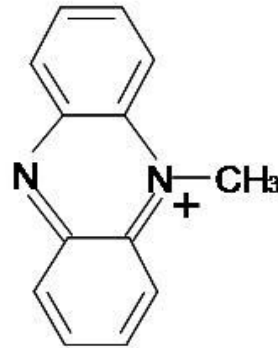
MEDIÁTOR



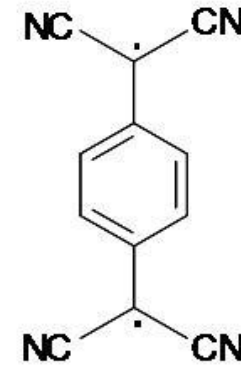
MEDIÁTOROK



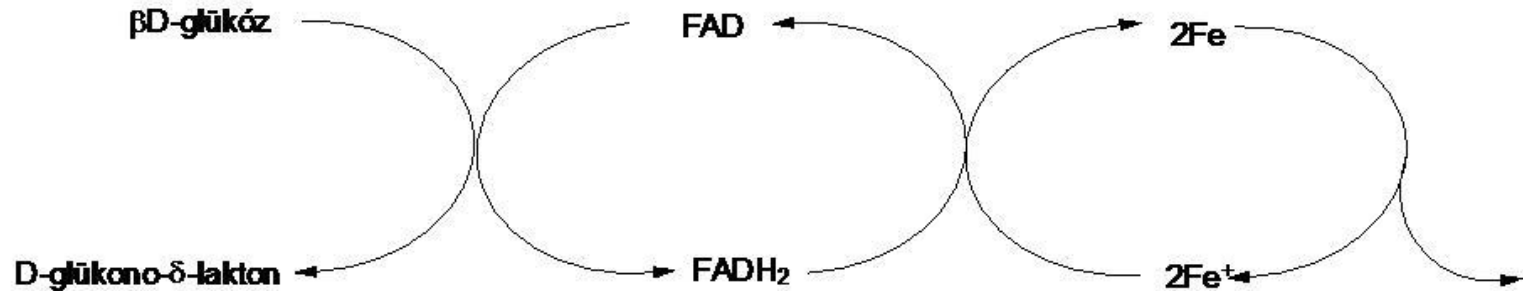
Ferrocén



N-Me-fenazin kation



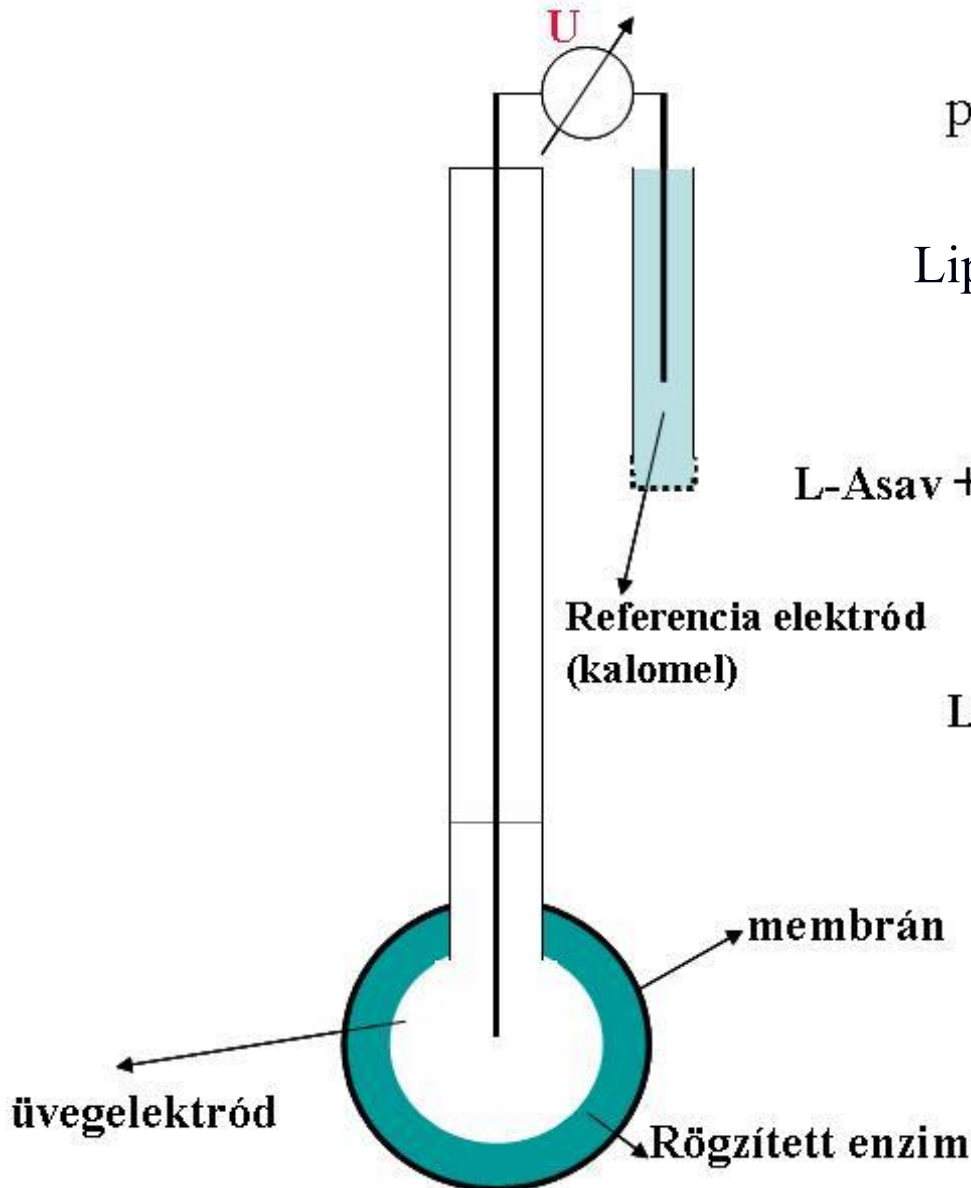
Tetraciano-kinodimetán
gyök anion

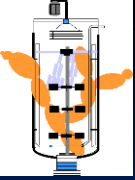


Elektronvezető szerves só, kötődik a flavoenzimhez

Enzimlektród 3 pH és NH_3^+

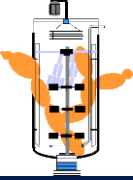
POTENCIOMETRIÁS





Enzimlektrod 4

Analyte	Enzyme
Amygdalin	β -Glucosidase
Asparagine	Asparaginase
Cholesterol	Cholesterol oxidase
Esters	Chymotrypsin
Glucose	Glucose oxidase
H ₂ O ₂	Catalase
Lipids	Lipase
Penicillin G	Penicillinase
Peptides	Trypsin
Starch	Amylase
Sucrose	Invertase
Urea	Urease
Uric acid	Uricase



Enzimlektrod 5

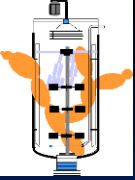
Table 2.2. Characteristics of immobilized enzyme electrodes^a.

Analyte	Enzyme	Sensor	Immobilization Procedure	Response Time	Detection Range
Galactose	Galactose oxidase	H ₂ O ₂	Covalently bound on collagen membrane	5-6 min (std) ^a 1 min (kin) ^b	5 x 10 ⁻⁷ - 6 x 10 ⁻³ M
Ethanol	Alcohol dehydrogenase	Pt(+350 mV)/ FeCN ₆ ⁴⁻	Glutaraldehyde/ cellulose triacetate	<5 min	10 ⁻⁴ - 5 X 10 ⁻³ M
Urea	Urease	O ₂	Entrapped; dialysis membrane	NI ^c	10 ⁻³ - 8 x 10 ⁻² M
Pyruvate	Pyruvate oxidase	O ₂	Acetylcellulose	2 min	Up to 8 x 10 ⁻⁴ M
Cholesterol	Cholesterol oxidase	H ₂ O ₂	Covalently bound on collagen membrane	<5 min (std) <1 min (kin)	10 ⁻⁷ - 8 x 10 ⁻⁵ M
Lactose	β-Galactosidase + Glucose oxidase	O ₂	Glutaraldehyde and BSA; magnetic film	NI	10 ⁻³ - 4 x 10 ⁻³ M
Aspartame	Chymotrypsin (CT) + alcohol oxidase (AOD)	O ₂	Gel of AOD sandwiched between teflon and retaining membrane; CT in solution	3-5 min	80-800 ppm
Bilirubin	Glucose oxidase + horse radish peroxidase	H ₂ O ₂	Entrapped; gelatin dialysis membrane	2 min	5 x 10 ⁻⁶ - 5 x 10 ⁻⁵ M

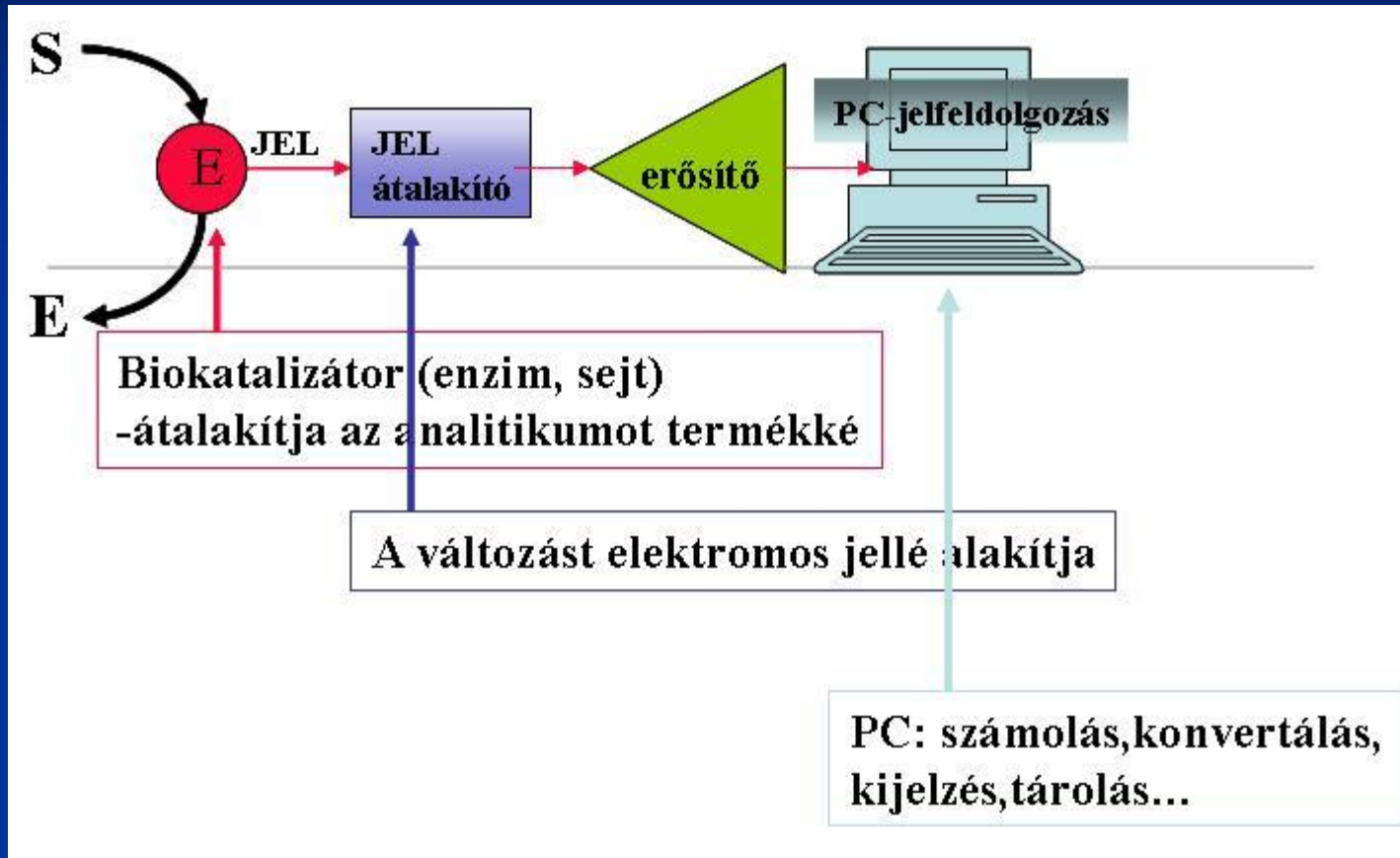
^aSteady-state response

^bKinetic, dynamic response

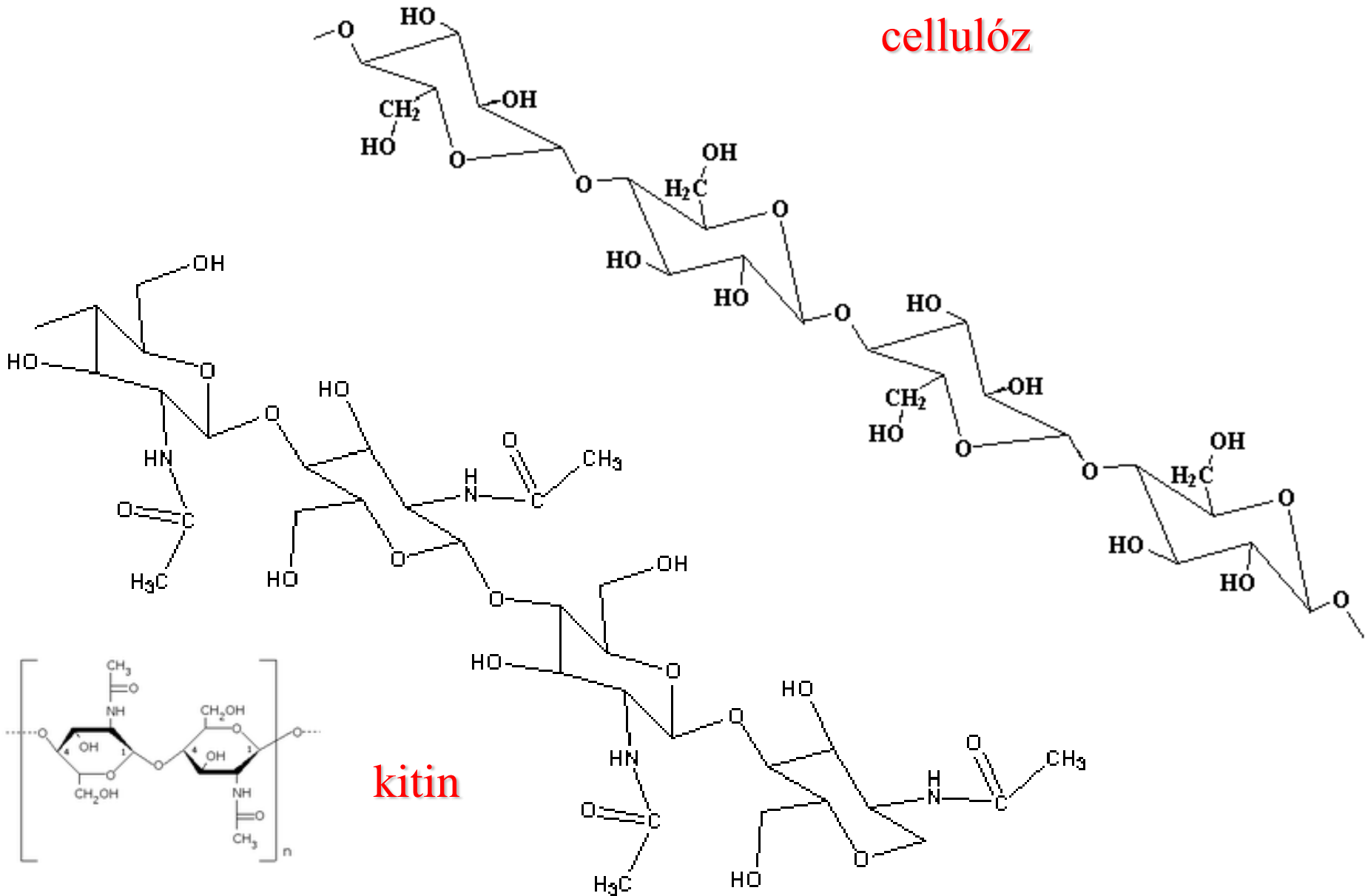
^cNot indicated



BIOSZENZOR



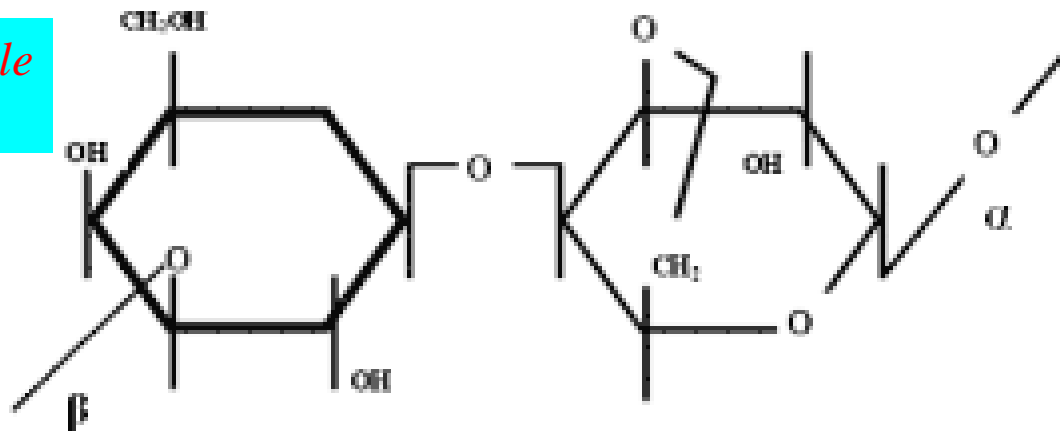
cellulóz



kitin

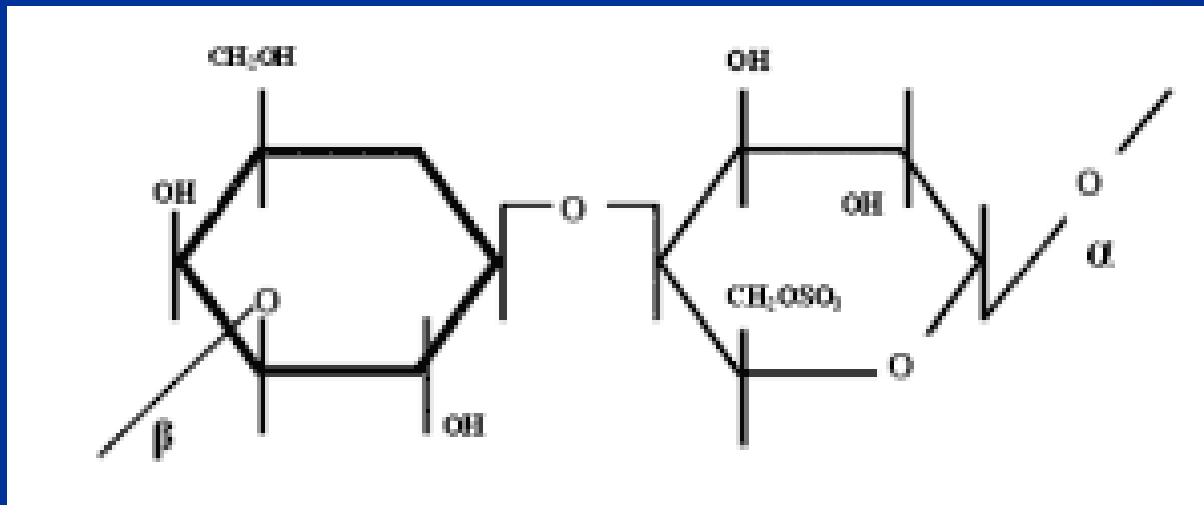
Gelidium sesquipedale
virágmoszat

agar



Agaróz, erősen gélesítő nemionos poliszaharid

1,3- kötött β -D-galactopyranóz és
1,4-kötött 3,6-anhydro- α -L-galactopyranóz egységekből



Agaropektin, kevésbé jól definiált, komplexebb poliszaharid.
Szulfát tartalmú

