

Enzimirögítési módszerek nanostruktúrált rendszerekben

BALOGH-WEISER Diána^{ab*}

^aBudapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Szerves Kémia és Technológia Tanszék,
Szent Gellért tér 4. 1111, Budapest, Magyarország,

^bBudapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék,
Budafoki út 8. 1111, Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A modern szintetikus és diagnosztikai eljárások között az enzimmatalizált folyamatok kiemelt fontosságúak, a gyógyszer- és finomkémikália ipar, az élelmiszeripar, a textilipar, az energiatermelés vagy a modern orvostudomány nélkülözhetetlen elemivé váltak.¹ Enzimekkel hatékonyabban juthatunk az értékes optikailag tiszta vegyületekhez, mint a klasszikus szintetikus útvonalak alkalmazásával.^{2,3} A természetben az enzimek többnyire oldott állapotban működnek, azonban a homogénfázisú reakciókból izolálásuk igen nehézkes, visszaforgatásuk, regenerálásuk szinte lehetetlen. Komoly problémát jelenthet emellett, hogy az oldott, natív enzim nehezen tolerálja az adott reakció körülményeit, így aktivitását, szelektivitását elveszítheti. Ezekre a komoly technológiai és nem utolsó sorban gazdasági problémákra megoldást jelenthetnek a különböző enzimirögítési technikák.^{4,5}

Napjainkban sokféle enzimirögítési eljárás létezik, melyek sok esetben jól illeszkednek az adott biotranszformációs folyamat körülményeihez. A modern biotechnológia eszköztárában egyre nagyobb teret hódítanak a két vagy három dimenziójában is nano mérettartományba eső anyagok, az úgynevezett szerkezeti és funkcionális nanoanyagok. Az enzimek és a nanostruktúrált anyagok között hatékony és finomhangolt kölcsönhatások hozhatóak létre, melyek révén egy adott enzim stabilan, vagy akár szelektíven is immobilizálható. Az így előállítható nagy fajlagos felületű nanobiokatalizátorok növelik az anyagtranszport folyamatok sebességét, ami összességében magasfokú katalitikus hatékonyságot eredményez.⁶ Az enzimek változatos rögzítésére ez idáig sikeresen alkalmaztak különböző nanorészecskéket, belőlük szerveződő nanoszerkezetű mátrix rendszereket, nanopórusos anyagokat, nanoszálakat, nanocsöveket és üreges nanorudakat is.⁷

Doktori munkám célja olyan nanostruktúrált anyagok kifejlesztése és vizsgálata volt, melyek alkalmasak lehetnek enzimek immobilizálására. A kísérletek során alkalmazott enzimek (lipázok és ammónia-liázok) releváns biokatalizátorok ipari és orvos diagnosztikai alkalmazásokban. Részletesen vizsgáltuk a különböző nanoanyagok (nanopórusos térhálók, nanoszálak, nanocsövek és nanorészecskék) segítségével előállított rögzített enzimmátrix biokatalitikus képességeit és stabilitását.

Kutatásaink egyik célja szol-gél módszerrel előállítható nanoszerkezetű szilícium-dioxid (és hibrid: szubsztituált szilán tartalmú) térhálók előállítása, amelyek képesek enzim molekulákat magukba zárni, rögzített biokatalizátort eredményezve.⁸ A szol-gél térháló prekursoraiként egyszerűen és kétszeresen szubsztituált organoszilánokat vizsgáltunk, melyek várhatóan nagy hatással lehetnek a térhálóba ágyazott enzim biokatalitikus működésére és stabilitására. Enzimekből felépített nanopórusos térhálók kialakítása során vizsgáltuk az enzimek között kovalens keresztkötéseket létrehozó bifunkciós ágensek hatását a rögzített enzimmátrix biokatalitikus működésére és stabilitására.⁹ Célunk volt egy új keresztkötő ágens révén stabilabb és aktívabb, egyszerűen létrehozható rögzített biokatalizátorok kifejlesztése, melyek jól alkalmazhatóak szerves és vizes közegben végbemenő biotranszformációkra.

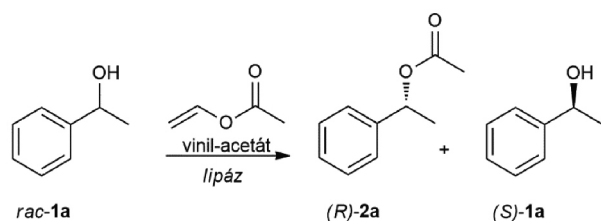
Célunk volt továbbá a nanoszálakban történő enzimirögítés vizsgálata elektrosztatikus szálképzés segítségével.¹⁰ A nanoszálba ágyazás során nem-ionos felületaktív anyagokat és organoszilánokat alkalmaztunk additívként, melyek befolyásolhatják a rögzített enzim biokatalitikus képességeit. Szén nanocsövek különböző felületi funkcionálizálása révén olyan hordozók előállítását terveztük, melyek képesek lehetnek enzimek stabil és hatékony rögzítésére.¹¹ Végezetül enzimirögítésre alkalmas mágneses nanorészecskék előállítását céloztuk meg, melyek hatékonyan alkalmazhatóak mikrofluidikai rendszerekben megvalósított szelektív biotranszformációkra.^{12,13}

2. Eredmények

2.1. Enzimirögítés szol-gél térhálókban

Lipázok szol-gél mátrixba zárását kétszeresen szubsztituált organoszilán prekursorokkal (DPDEOS: difenildietoxiszilán, DMDEOS: dimetildietoxiszilán, MPDEOS: metil, fenildietoxiszilán) valósítottuk meg, melyek ilyen célú alkalmazása nem ismert az irodalomban ezáidáig. Az új prekursorok hatását, a szakirodalom és korábbi kutatásaink alapján egyszerűen szubsztituált szilánokkal (PTEOS: feniltrietoxiszilán, OTEOS: oktiltrietoxiszilán) hasonlítottuk össze.^{14,15} A különböző prekursorokkal szol-gélbe ágyazott lipázok biokatalitikus működését a *racém*-1-feniletanol (*rac-1a*) kinetikus reszolválásában vizsgáltuk (1. ábra).

* Dr. Balogh-Weiser Diána; Tel.: +3614632230; e-mail: dweiser@mail.bme.hu



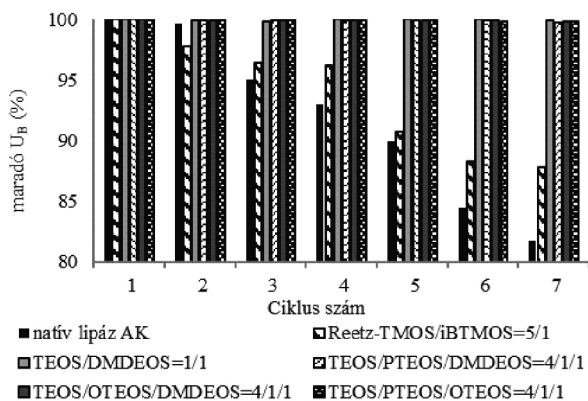
1.Ábra. A *rac-1a* kinetikus resolválása lipáz biokatalizátorokkal

A szol-gél mátrixba ágyazott lipázokkal végzett resolválásban képződő termék enantiomertisztasága ($ee_{(R)-2a}$) javult és az elért konverzió (c) szinte minden szol-gél mátrixba ágyazott lipáz esetében meghaladta, a nem rögzített natív lipázzal elértet (1. Táblázat). Míg az enzimmészítmények biokatalitikus aktivitása (U_B) összemérhető a natív lipázéval, addig fajlagos enziaktivitásuk (Y_A) minden esetben többszörösére növekedett, mivel a rögzített lipázkészítmények enzimtartalma jóval kevesebb, mint a natív lipázé. Kiemelkedően jó eredményt mutatott a kétszeresen szubsztituált DMDEOS prekursor alkalmazása, mellyel megközelíthető volt az elméleti maximális konverzió ($c = 47,2\%$), nagyfokú enantiomertisztaság mellett ($ee_{(R)-2a} = 99,3\%$).

1.Táblázat. Natív és szol-gél mátrixban immobilizált lipáz biokatalitikus hatékonysága 4 óra reakcióidő után a *rac-1a* kinetikus resolválásában.

Szilán prekursor	c (%)	$ee_{(R)-2a}$ (%)	E	U_B (U g ⁻¹)	Y_A (%)
natív lipáz	29,7	97,9	>100	10,0	100
TEOS	27,5	98,3	»200	9,1	350
TEOS:PTEOS	30,6	98,3	>100	10,5	360
TEOS:OTEOS	49,4	98,3	»200	17,0	374
TEOS:DPDEOS	14,4	98,8	>100	5,0	750
TEOS:MPDEOS	28,9	98,8	>200	8,2	900
TEOS:DMDEOS	47,2	99,3	»200	16,3	994

Az eddigiekben legjobb eredményeket hozó szol-gél készítményeink visszaforgathóságát összehasonlítottuk a rögzítetlen lipázzal (natív lipáz AK), és egy az irodalomban egyik jól ismert szol-gél lipázzal (Reetz-TMOS/iBTMOS = 5/1).¹⁶ A 2. ábrán látható eredmények alapján elmondható, hogy a vizsgált hét visszaforgatási ciklus alatt az általunk előállított szol-gél enzim készítmények aktivitása változatlan maradt, míg a rögzítetlen és kereskedelmi forgalomban kapható szol-gél lipáz jelentősen veszített aktivitásából.



2.Ábra. A lipáz biokatalizátor aktivitás változása (maradó U_B , %) a *rac-1a* kinetikus resolválásában hét visszaforgatási ciklus során.

2.2. Enzimek rögzítése nanoszálakban elektrosztatikus szálképzés segítségével

Lipázok poli(vinil-alkohol) (PVA) nanoszálba zárását elektrosztatikus szálképzés segítségével valósítottuk meg, mely során elsőként a szálak enzimmegkötő kapacitását vizsgáltuk *Pseudomonas fluorescens* lipáz (lipáz AK) esetében (2. Táblázat). Az egyre nagyobb enzim mennyiséget tartalmazó nanoszálakkal végzett *rac-1a* szubsztát kinetikus resolválásában az 5%-os enzim mennyiség bizonyult előnyösnek, mivel ebben az esetben volt elérhető a legmagasabb specifikus, azaz enzim mennyiségre vonatkoztatott aktivitás ($Y_A = 178\%$).

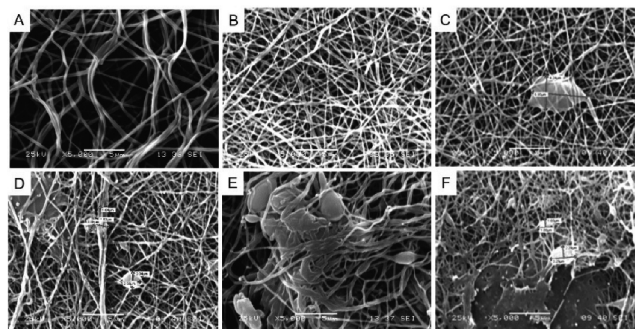
2.Táblázat. Különböző enzim mennyiséget tartalmazó PVA nanoszálak által katalizált *rac-1a* kinetikus resolválása

Enzim tartalom (%)	c^a (%)	$ee_{(R)-2a}$ (%)	U_B (U g ⁻¹)	Y_A (%)
natív enzim	48,3±0,03	95,2±0,03	33,3	100
5	4,2±0,04	99,4±0,03	2,9	178
10	5,9±0,14	99,4±0,01	4,1	126
15	10,2±0,18	99,6±0,03	7,0	143
20	18,4±0,88	99,6±0,05	12,7	169
25	20,6±1,93	99,5±0,07	14,2	155
33 ^b	-	-	-	-

^a2 óra reakció idő

^bsikertelen szálképzés

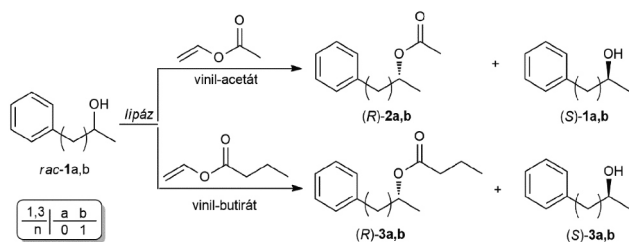
Az elérhető biokatalitikus aktivitás (U_B) és enantiomertisztaság ($ee_{(R)-2a}$) mellett a biokatalizátor morfológiája, szerkezeti homogenitása is fontos szempont a készítményfejlesztés során. Ezért a különböző enzimtartalmú mintákat pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) segítségével is megvizsgáltuk (3. Ábra), ahol azt tapasztaltuk, hogy 5 %-os enzimtartalom felett már fehérje aggregátumok, illetve jelentősebb szál heterogenitások jelennek meg a készítményekben. Ez az eredmény egybehangzik a kinetikus resolválásban tapasztaltakkal, ugyanis az 5%-nál több lipázot tartalmazó PVA nanoszálak fajlagos enzimaktivitása csökken.



3.Ábra. SEM felvételek a különböző lipáz AK tartalmú PVA nanoszálakról: enzimtartalom 0% (A), 5% (B), 10% (C) 15% (D), 20% (E) és 25% (F).

A PVA nanoszálakban történő enzimmegkötési kísérleteket a *Candida antarctica* B lipázzal (CaLB) is elvégeztük, azonban ezúttal különböző aditívek hatását vizsgáltuk a beágyazott lipázok biokatalitikus működésére (Brij30: polietilén-glikol dodecil éter, PEG400: polietilén-glikol 400,

PTEOS: feniltriethoxiszilán, OTEOS: oktiltriethoxiszilán). Az enzimkészítményeket a racém-1-feniletanol (*rac-1a*), valamint a *racém*-1-fenil-2-propanol (*rac-1b*) kinetikus reszolválásában vizsgáltuk (4. Ábra).



4.Ábra. *rac-1a,b* kinetikus reszolválása PVA nanoszálakban immobilizált CaLB-vel vinil-acetát és vinil-butirát acilezőszerek jelenlétében.

Az eredmények azt mutatták, hogy a nanoszálakban rögzített lipázok minden esetben jóval meghaladták a natív enzim képességeit, a CaLB enzim fajlagos aktivitása több tízszeresére javult a reszolválási reakciókban a rögzítés során alkalmazott PEG400 és Brij30 aditíveknek köszönhetően, a fenil- és oktiltriethoxiszilán (PTEOS és OTEOS) jelenléte bizonyos esetekben szintén fokozta az enzim aktivitást (3. Táblázat).

3. Táblázat. Aditívek hatása PVA nanoszálba zárt CaLB biokatalitikus képességeire a *rac-1a,b* kinetikus reszolválásában.

Additív	<i>c</i> (%) ^a			<i>ee</i> (%)			<i>Y_A</i> (%)		
	(<i>R</i>)- 2b	(<i>R</i>)- 3a	(<i>R</i>)- 3b	(<i>R</i>)- 2b	(<i>R</i>)- 3a	(<i>R</i>)- 3b	(<i>R</i>)- 2b	(<i>R</i>)- 3a	(<i>R</i>)- 3b
^b	21,0	0,8	7,5	99,2	98,4	97,9	100	100	100
^c	5,5	0,5	4,3	98,4	96,5	99,6	280	237	115
Brij30	27,6	16,0	38,2	99,5	99,9	98,3	1311	8496	6362
PEG400	29,6	14,0	34,3	99,5	99,7	99,0	1406	7438	9157
PTEOS	3,2	0,3	2,1	98,2	95,7	98,7	158	183	354
OTEOS	2,4	0,5	3,3	96,0	97,4	99,0	116	269	542

^a2 óra reakció idő

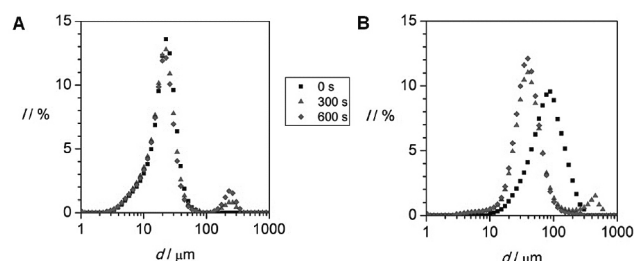
^bnatív CaLB

^cPVA nanoszálban rögzített CaLB aditív nélkül

A vizsgált aditívek közül a Brij 30 és a PEG származékok ismert szubsztrát analógjai a lipázoknak. Alkalmazásukkal elérhető, hogy az enzim aktív konformációjában rögzül a nanoszálba ágyazás során. Organoszilánok szubsztrát analóghént kifejtett hatása azonban az irodalomban nem ismert. Pozitív hatásuk megértése okán molekula modellezés segítségével a PTEOS, OTEOS, DMDEOS szilánokat beillesztettük az CaLB aktív centrumába. A modellezés során bizonyítottuk, hogy az organoszilánok szintén kedvező enzim-szubsztrát tetraédres köztiterméknek megfelelő analóg molekulák, melyek képesek lipázok aktív konformációját fenntartani immobilizálásuk során. Ezzel magyarázható a rögzített enzimkészítmények nagyfokú hatékonysága, amit a kísérleti eredmények is alátámasztottak.¹⁷

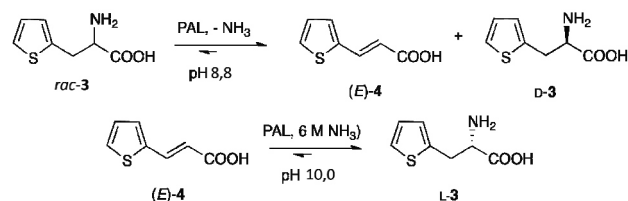
2.3. Fehérje térhálók, kovalensen kereszt kötött enzimaggregátumok

Fenilalanin ammónia-liáz (PAL) enzimből olyan térhálós aggregátumot állítottunk elő, melyben a fehérje molekulákat egymással az irodalomban eddig nem ismert módon, biszepoxi vegyülettel (glicerín-diglicidil-éter, GDE) kapcsoljuk össze. A PAL molekulák kereszt kötését irodalmi példa alapján egy elterjedt kereszt kötő ágenssel, glutáraldehiddel (GA) is elvégeztük. A kétféle ágenssel kereszt kötött enzimkészítmények mechanikai stabilitását erős ultrahangos behatás segítségével vizsgáltuk. A fényszóródáson alapuló mérések során a készítmények átlagos részecskeméret eloszlását határoztuk meg az ultrahangozási idő függvényében (5. Ábra). Azt tapasztaltuk, hogy míg a biszepoxi vegyülettel kereszt kötött (5. Ábra, A) enzim erős ultrahang hatására is stabil maradt, addig a glutáraldehiddel térhálósított enzim jellemző részecske mérete csökkent, ami a készítmény instabilitására, degradációjára utal (5. Ábra, B).



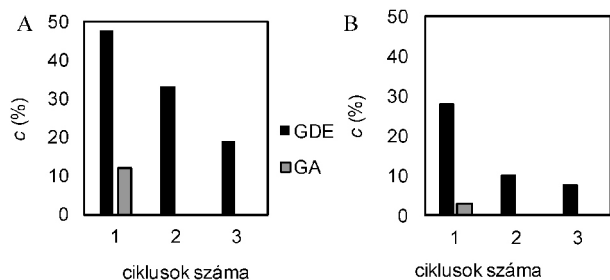
5.Ábra. Glicerín-diglicidil-éter A) és glutáraldehid B) alkalmazásával kereszt kötött PAL enzimkészítmények részecskeméret eloszlása az ultrahangozási idő függvényében.

A kereszt kötött PAL készítmények biokatalitikus aktivitását úgy a *racém*-2-amino-3-(tiofén-2-il)propánsavból (*rac-3*) történő ammónia eliminációban, mint az (*E*)-3-(tiofén-2-il)akrilsavra [(*E*)-4] végmenő ammónia addíciójában vizsgáltuk (6. Ábra).



6.Ábra. PAL által katalizált ammónia elimináció és addíció.

A kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy mind az eliminációs, mind az addíciós reakcióban a glutáraldehiddel kötött PAL biokatalitikus aktivitása lényegesen alacsonyabb, mint a biszepoxi ágenssel kötött PAL készítményé. Ezen felül a glutáraldehid esetében az enzim már az első ciklus után inaktiválódott (7. ábra).¹⁸



7.Ábra. Keresztkötött PAL enzimkészítmények működése *rac-3*-ból történő ammónia eliminációban A) és (*E*)-4-re végbemenő ammónia addícióban B).

2.4. Kovalens enzimrögzítés szén nanocsöveken

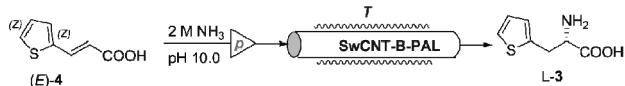
A fenilalanin ammónia-liáz (PAL) kovalens rögzítését kétféle módszer szerint karboxi-funkcionalizált egyfalú szén nanocső hordozón (SwCNT) végeztük el. Egyik esetben az enzim karboxilcsoportokhoz közvetlenül kapcsolódik a hordozóhoz (SwCNT-A-PAL). A karboxilcsoportokkal funkcionizált hordozók jól ismertek enzimrögzítési célokra. A másik esetben egy új funkcionizálási eljárás során a szén nanocsöveken epoxicsoportokat alakítottunk ki, a korábban is jó eredményeket mutató gliceril-diglicidil-éter segítségével, melyen keresztül a PAL kovalensen kötődött a hordozóra (SwCNT-B-PAL).¹⁸ Az immobilizált PAL készítményeket a 6. Ábrán bemutatott eliminációs és addíciós reakcióban vizsgáltuk hét visszaforgatási cikluson át (4. táblázat). Mindkét hordozótípus esetében az immobilizált PAL hasonló konverziót ért el, valamint a készítmények jó stabilitással bírtak az elimináció vizsgált hét ciklusa alatt. Az ammónia addíció során azonban a SwCNT-A-PAL hordozón savamid kötésekkel rögzült PAL csak három ciklus erejéig volt működőképes, míg az epoxi csoportokkal kötött PAL négy körön át alig veszített aktivitásából, még a hetedik ciklusban is csekély mértékben ugyan, de működőképes volt a biokatalizátor.

4.Táblázat. Különbözőképp funkcionizált szén nanocsöveken rögzített PAL biokatalizátorok (SwCNT-A-PAL és SwCNT-B-PAL) összehasonlítása *rac-3*-ból történő ammónia eliminációban és (*E*)-4-re végbemenő ammónia addícióban.

Ciklus	Elimináció <i>rac-3</i> , TRIS-puffer c (%) ^a		Addíció (<i>E</i>)-4, 6 M NH ₃ c (%) ^a	
	SwCNT-A-PAL	SwCNT-B-PAL	SwCNT-A-PAL	SwCNT-B-PAL
1	48,4	49,2	36,9	36,7
2	49,2	48,5	24,2	37,2
3	49,0	48,8	3,8	36,2
4	49,3	47,4	-	34,2
5	45,6	46,3	-	17,5
6	43,7	42,4	-	5,7
7	42,5	42,3	-	2,2

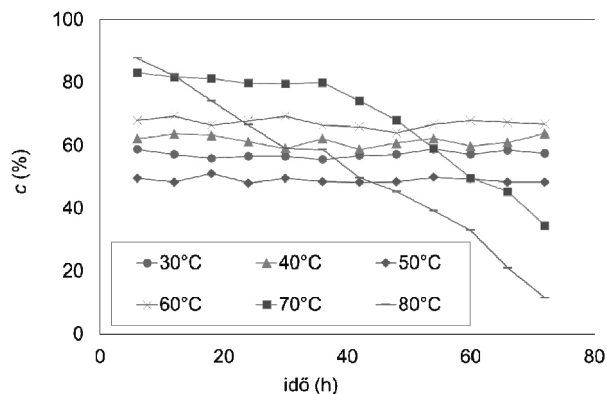
^areakció idő 17 óra

A hagyományos rázatott lombikos rendszerekben jól működő immobilizált PAL (SwCNT-B-PAL) készítményt folyamatos üzemű mikroreaktorban is alkalmaztuk (8. Ábra) az (*E*)-4 akrilsavra történő ammónia addíciós reakciójában, mely során enantiomertiszta L-aminosav állítható elő.



8.Ábra. Szén nanocsövön immobilizált PAL (SwCNT-B-PAL) készítménnyel katalizált (*E*)-4 akrilsavra történő ammónia addíció folyamatos üzemű mikroreaktorban.

Az átfolyásos reaktor alkalmazása jóval hatékonyabb biotranszformációkat tesz lehetővé, mint az eddig vizsgált szakaszos, rázatott lombikos rendszer, hiszen 30°C-on már 2 óra elteltével 60 %-os konverzió (*c*) volt elérhető (9. Ábra). Érdekes jelenség azonban, hogy 50°C-nál a konverzió 60 %-ról 49 %-ra csökken, ezt követően a hőmérséklet emelésével a konverzió emelkedik. Ez a jelenség az enzim szerkezet hőmérsékletfüggésével magyarázható. Az enzim másodlagos szerkezeti elemei 40-50°C között reverzibilis változást szenvednek. Ettől magasabb hőmérsékleten 60°C-on, a szén nanocsöveken rögzített PAL 80 órán át stabilan működik folyamatos üzemben (9. ábra).



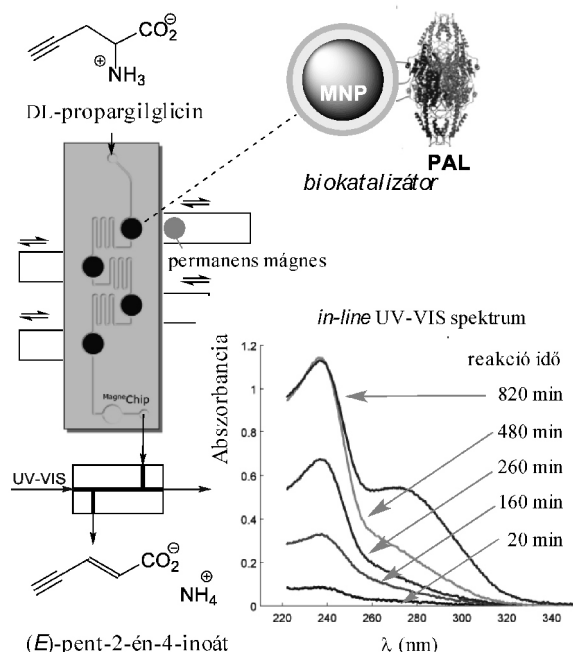
9.Ábra. Szén nanocsövön immobilizált PAL (SwCNT-B-PAL) készítménnyel (*E*)-4 akrilsav ammónia addíciójának hőmérsékletfüggése folytonos átfolyású mikroreaktorban.

A GDE bisepoxi vegyülettel módosított szén nanocsövekkel tehát egy új, stabil hordozórendszert hoztunk létre, amely több reakciócikluson keresztül erélyes körülmények között is hatékonyan alkalmazható aminosavak enantiomertiszta szintézisére szakaszos és folyamatos üzemű reaktorokban is.¹⁹

2.5. Fenilalanin ammónia-liáz vizsgálata, új aciklikus, nem-aromás szubsztráttal MagneChip mikrofluidikai eszköz segítségével

Ez idáig nem született egységesen, elfogadott mechanizmus az ammónia-liázok katalitikus működésével kapcsolatban. A javasolt mechanizmusok közti dilemmákat egy aciklusos aminosavat segítségével döntöttük el. Amennyiben a PAL az aciklusos, nem aromás aminosavat szubsztráttaként elfogadja, úgy az kizárhatná az eddig leginkább javasolt *Friedel-Crafts* típusú mechanizmust.²⁰ Kísérleteinkhez a racém *racém*-propargilglicint (PG), mint aciklusos aminosavat választottuk, a PAL enzimet pedig mágneses nanorészecskékhez rögzítettük (MNP). A PG és főképp a belőle keletkező eliminált termék rendkívül instabil. A hagyományos enzimkinetikai mérések instabil anyag esetében nehézkesek, sok anyagot, gyors munkavégzést és

szigorú körülményeket igényelnek. A PG enzimkatalizált próbareakcióját ezért a kis anyagmennyiségeket igénylő, gyors, és folyamatosan *in-line* követhető mágneses nanorészecskékkel feltölthető mikrofluidikai eszközben (*MagneChip*) vizsgáltuk (10. Ábra). Az enzim reakciót deuterált oldószerben hajtottuk végre, így módon a chip-et elhagyó minta egyidejűleg ^1H NMR segítségével is vizsgálható.



10. Ábra. A racém-propargilglicin eliminációjának vizsgálata MNP-PAL biokatalizátorral töltött *MagneChip* mikrofluidikai eszközben

A chipben folytatott mérések során azt tapasztaltuk, hogy már 20 perc eltelté után $\lambda = 242$ nm hullámhossz körül abszorbancia növekedés látszik a chipet elhagyó oldat teljes UV-VIS spektrumában. Az az idő függvényében abszorbancia folyamatosan növekedett, majd 480 perc után maximalizálódott ($A_{242} = 1,2$). A spektrumban megjelenő jellegzetes abszorbancia növekedés, majd a telítődés jelensége nagy valószínűséggel az enzim reakció jelenlétére utal. Ezt igazolta az összegyűjtött minta ^1H NMR spektruma is, melyben termékként várt (*E*)-pent-2-én-4-inoátra egyértelműen utaló olefinkötések $\delta = 6,34$ (*d*) és $6,85$ (*d*) ppm csatolási állandókkal azonosíthatóak voltak. A *MagneChip* kísérletek és NMR mérések egyértelműen arra utalnak, hogy a PAL katalizálja a racém-propargilglicin ammónia eliminációt, tehát sikerült kísérletesen kizárni a *Friedel-Crafts* típusú reakciómechanizmust és megerősíteni az *N*-MIO intermedieren át történő mechanizmust.²¹

3. Összefoglalás

Doktori munkám során olyan különböző nanostruktúrált rendszerek létrehozásával foglalkoztam, melyek alkalmasak lehetnek enzimek hatékony immobilizálására. Célunk volt olyan, variábilis és robusztus nanoszerkezetű biokatalizátorok fejlesztése, melyek eredményesen és jól alkalmazhatóak szakaszos üzemű, illetve folytonos átfolyású mikroreaktorokban történő biotranszformációkra. Enzimek

nanopórusos szol-gél mátrixba ágyazásával és funkcionizált szén nanocső hordozókon történő kovalens rögzítésével sikeresen hoztunk létre olyan biokatalizátorokat, melyek kevesebb enzimmennyiséggel hatékonyabb biokatalitikus folyamatokat tesznek lehetővé. A mátrixba zárt enzimek több reakció cikluson át aktivitás és enantiomerszelektivitás vesztes nélkül alkalmazhatóak, valamint eredményesek folytonos üzemű biotranszformációkban is. Elektrosztatikus szálképzéssel polimer nanoszálakban immobilizált lipázok aktivitását többszöröse fokoztuk egyszerű additívek alkalmazásával, melyek a későbbiekben ígéretesek lehetnek folytonos üzemű membrán reaktorokkal megvalósítható enantiomerszelektív szintézisekben. Mágneses nanorészecskéken rögzített enzimekkel mikrofluidikai *chipekben* hatékony biotranszformációkat valósítottunk meg, melyek rendkívül egyszerűen és gyorsan adhatnak kísérletes bizonyítékot egy adott enzim működési mechanizmusával kapcsolatos feltételezésekre, segítségükkel karakterizálható, finomhangolható egy adott biotranszformációs folyamat.

4. Kísérleti leírások

4.1. Lipáz rögzítése szol-gél módszerrel

390 μl TRIS pufferhez (0,05 M, pH 7,5), 200 l PEG1000 oldatot (4% v/v vizes oldat) és 200 l 2-propanolt (IPA) adtunk, majd az elegyet szobahőmérsékleten 10 percen át rázattuk (450 rpm). Ezt követően 50 mg *Pseudomonas fluorescens* lipáz készítményt, 3 mmol szilán prekursor megfelelő molarányú elegyét, végül 100 l nátrium-fluorid oldatot (1 M, vizes oldat) adtunk az elegyhez, folyamatos intenzív rázatás mellett. A mintákat 12 órán át szobahőmérsékleten rázattuk, majd a létrejött géleket üvegszűrőn IPA, desztillált víz, IPA és *n*-hexán (minden esetben 10 ml) segítségével mostuk, a kapott fehér por állagú mintákat 24 órán át szobahőmérsékleten száradni hagytuk.

4.2. Fenilalanin ammonia-liáz térhálósítása kovalens keresztkötő ágensekkel

1 ml fenilalanin ammonia-liáz enzim TRIS pufferes oldatához (enzim koncentráció 2 mg ml⁻¹, TRIS: 0,1M; lipáz esetében pH 7,5; ammónia-liáz esetében pH 8,8) 3 ml kicsapószerrel adtunk (lipáz esetében acetont, ammónia-liáz esetében etanolt), majd az elegyet 10 percen át 4°C-on vagy szobahőmérsékleten rázattuk. Ezt követően 80 μl glutaraldehidet (GA) vagy glicerol diglicidil étert (GDE) adtunk az elegyhez folyamatos rázatás mellett. 24 óra elteltével a mintákat centrifugáltuk (2200 \times g, 15 min, 8°C), a felülúszót dekantáltuk, majd az üledéket háromszor TRIS pufferrel (0,1M; pH 8,8), végül etanollal mostuk.

4.3. Lipáz rögzítése poli(vinil-alkohol) (PVA) nanoszálakban elektrosztatikus szálképzés segítségével

100 μl lipáz oldathoz (enzim koncentráció: 35,5 mg ml⁻¹ nátrium-foszfát pufferben; 0,1 M, pH 7,5) hozzáadtuk a megfelelő additívet (5 v/v % az enzimdathra vonatkoztatva) majd az elegyet 10 percen át rázattuk szobahőmérsékleten. Ezt követően az elegyhez 675 mg PVA oldatot adtunk (10 m/m%-os vizes oldat), majd a mintát 20 percen keresztül

ultrahangoztuk. Az *electrospinning* készülékben a mintát fecskendő pumpa segítségével (0,8-1,0 ml h⁻¹ áramlási sebességgel) az emitterbe juttattuk, majd a rendszert nagyfeszültség alá helyeztük (U~20 kV). A képződő terméket alufóliával borított lap kollektoron gyűjtöttük (emitter-kollektor távolság 10 cm).

4.4. Fenilalanin ammonia-liáz rögzítése funkcionizált szén nanocsöveken

20 mg karboxil- vagy epoxicsoportokkal funkcionizált szén nanocső hordozóhoz 1 ml fenilalanin ammonia-liáz TRIS pufferes oldatát adtuk (enzim koncentráció: 2 mg ml⁻¹, TRIS: 0,1 M; pH 8,8), majd az elegyet szobahőmérsékleten egy éjszakán át intenzíven rázattuk. Ezt követően a mintát membránszűrő segítségével szűrtük (0,45 μm), majd háromszor desztillált vízzel mostuk.

4.5. MNP-PAL alkalmazása MagneChip mikrofluidikai eszközben megvalósított biotranszformációban

4 mg MNP-PAL készítményhez és 4 mg PEG 4000-et és 1,5 ml ultratiszta víz és 2-propanol 5:1 arányú (v/v) elegyét adtuk, majd 15 percen keresztül ultrahangozás segítségével

szuszpendáltuk. Ezt követően a folyamatosan rázatott szuszpenziót enyhe levegőnyomással (0,2-0,3 bar) a MagneChip belsejébe juttattuk, ahol az MNP-PAL biokatalizátort neodímium mágneselek segítségével rögzítettük a reakciókamrákban. A rendszert 35°C-ra termosztáltuk, majd a feltöltött chipet 1 ml nátrium-karbonát tartalmú deutérium-oxiddal (50 mM) 20 percen keresztül mostuk, majd DL-propargilglicin (DL-6) nátrium-karbonát tartalmú deutérium-oxidos oldatát (DL-6: 40 mM; nátrium-karbonát 50mM) tápláltuk rá a chipre (0,6 μl perc⁻¹ áramlási sebességgel). A MagneChipet elhagyó reakcióközeget *in-line* átfolyó cellás UV-VIS spektrofotométer segítségével követtük nyomon, majd a mintát ¹H NMR segítségével analizáltuk.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket szeretnénk kifejezni az NKFIH-nak (NN-103242-) és az új Széchenyi Terv Programnak (TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0002) és a COST Action CM1303 (SysBiocat) programnak a kutatás anyagi háttérének biztosításáért.

Hivatkozások

- Schmid, A.; Dordick, JS.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. *Nature*. **2001**, *409*, 255-268. <https://doi.org/10.1038/35051736>
- Demarche, P.; Junghanns, C. Nair, RR.; Agathos, SN.; *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 933-953. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.013>
- Hanefeld, U.; Cao, L.; Magner, E. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6211–6212. <https://doi.org/10.1039/c3cs90042h>
- Sheldon, RA.; Pelt, S. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223-6235. <https://doi.org/10.1039/C3CS60075K>
- DiCosimo, R.; McAuliffe, J.; Poulouse, AJ.; Bohlmann, G. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6437-6474. <https://doi.org/10.1039/c3cs35506c>
- Ansari, SA.; Husain, Q. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 512–523. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.005>
- Gupta, MN.; Kaloti, M.; Kapoor, M.; Solanki, K. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* **2011**, *39*, 98-109. <https://doi.org/10.3109/10731199.2010.516259>
- Avnir, D.; Coradin, T.; Lev, O.; Livage, J. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 1013-1030. <https://doi.org/10.1039/B512706H>
- Sheldon, RA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92*, 467-477. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3554-2>
- Huang, XJ.; Chen, PC.; Huang, F.; Ou, Y.; Chen, MR.; Xu, ZK. *J. Mol. Cat. B.* **2011**, *70*, 95-100. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.02.010>
- Feng, W.; Pi, J. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 889-895. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.007>
- Govan, J.; Gunko Y. *Nanomaterials*. **2014**, *4*, 222–241. <https://doi.org/10.3390/nano4020222>
- Ender F., Weiser D., Nagy B., Bencze L. C., Paizs C., Pálóvics P., Poppe L.: *J. Flow. Chem.* **2016**, *6*, 43–52. <https://doi.org/10.1556/1846.2015.00036>
- Tomin, A.; Weiser, D.; Hellner, G.; Bata, Z.; Corici, L.; Péter, F.; Koczka, B.; Poppe, L. *Proc. Biochem.* **2011**, *46*, 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.021>
- Weiser, D.; Boros, Z.; Hornyánszky, G.; Tóth, A.; Poppe, L. *Proc. Biochem.* **2012**, *47*, 428–434. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.11.023>
- Reetz, MT.; Tielmann, P.; Wiesenhöfer, W.; Könen, W.; Zonta, A. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 717–728. <https://doi.org/10.1002/adsc.200303016>
- Weiser, D.; Solti, P.L.; Bánóczy, G.; Bódai, V.; Kiss, B.; Gellért, Á.; Nagy, ZK.; Koczka, B.; Szilágyi, A.; Marosi, G.; Poppe, L. *Tetrahedron*. **2016**, *72*, 7335–7342. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.06.027>
- Weiser, D.; Varga, A.; Kovács, K.; Nagy, F.; Szilágyi, A.; Vértessy, GB.; Paizs, C.; Poppe, L. *ChemCatChem*. **2014**, *6*, 1463–1469. <https://doi.org/10.1002/cctc.201300806>
- Bartha-Vári, JH.; Toşa, MI.; Irimie, FD.; Weiser, D.; Boros, Z.; Vértessy, BG.; Paizs, C.; Poppe, L. *ChemCatChem*, **2015**, *7*, 1122–1128. <https://doi.org/10.1002/cctc.201402894>
- Poppe, L.; Rétey, J. *Angew. Chem.* **2005**, *44*, 3668–3688. <https://doi.org/10.1002/anie.200461377>
- Weiser, D.; Bencze, CL.; Bánóczy, G.; Ender, F.; Kókai, E.; Szilágyi, A.; Vértessy, GB.; Farkas, Ö.; Paizs, C.; Poppe, L. *ChemBioChem*, **2015**, *16*, 2257–2402. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500520>

Nanostructured systems for enzyme immobilization

During my PhD work I developed various nano structured systems that could be used for effective enzyme immobilization. Our aim was to develop such variable and robust nanostructured bio catalysts, which can be well-applied in biotransformations in batch or continuous flow reactors.

During embedding enzymes in nonporous sol-gel matrix mono- and di- substituted organosilane molecules have been used as gelling precursors. Di-substituted precursors (dimethyl, diphenyl, methylphenyl-dietoxysilane) have not yet been applied for immobilizing enzymes in sol-gel method. By example of lipase it has been showed that precursors containing two methyl groups are able to create matrices which can be multiple specific activity of enzymes and also provide support for effective selection of enantiomers. Sol-gel matrix containing di-substituted precursors is able to stabilize enzymes, which can be used without loss of activity and selectivity during many reaction cycles. Enantiomerically pure compounds can be produced by embedded lipases immobilized in sol gel matrices using continuous-flow reactor.

Enzyme crosslinking has been performed successfully by new bis epoxides. Lipase and ammonia-lyase preparations have stable morphology due to their covalent binding epoxy groups. They have significantly better bio catalytic activity comparing to frequently applied enzymes crosslinked by glutaraldehyde. Bisepoxydes are less toxic and they can be proper agents in crosslinking enzymes and functioning of variety of substrate.

Lipase immobilization has been carried out successfully by electrostatic spinning in poly (vinyl alcohol) fibers. The specific activity of enzymes fixed in nano fibers with high specific surface area has been dramatically increased comparing to non immobilized native enzymes. By using substrate analog additives the activity and enantiomer

selectivity of lipases could be further enhanced. Polyethylene glycol 400 showed outstanding performance on functionality of immobilized lipases. Organosilane additives (octyl and phenyltriethoxysilane) are able to behave as analogies of lipase substrates. They can promote the immobilization of lipases in active conformation resulting improved activity of biocatalyzers.

Phenylalanin ammonia-lyase covalent binded on carboxyl and epoxy functionalized carbon nano tubes have been applied successfully in elimination and creation of chiral amino acids. Stable immobilization could be achieved between enzyme and carrier by advantageous carbon nano tubes modified with bis epoxides. Immobilized enzyme products can be applied in several cycles efficiently in creation of several enantio pure amino acids in batch or continuous flow reactors. It was able to create stable magnetic functionalized nano particles which can be used for effective immobilization of enzymes.

Phenylalanine ammonia-lyase immobilized on magnetic nano particles can be effectively used as biocatalyst in continuous flow micro fluidic reactor so called Lab-On-a-Chip (MagneChip). Biocatalytic activity of enzyme can be increased three times in MagneChip reaction chambers comparing to can be increased three times compared to conventional batch reactor systems.

We are able to identify MagneChip can give answer to opportunity for extremely small amount of materials in a short time to respond to clear long-lasting questions about operating mechanism of the enzyme.

This part contains a detailed and descriptive extract of the article in English using 9pt letters, single spacing, justified paragraphs and a 10pt space after the paragraphs. This part should not contain any schemes or tables but it might refer to those in the body of the main article.