



MIKROBIÁLIS EREDETŰ LIPOLITIKUS ENZIMEK ALKALMAZÁSA BIOKATALIZÁTORKÉNT

HELLNER GABRIELLA
doktori (Ph.D) értekezés tézisei

Budapesti Corvinus Egyetem
Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

Budapest, 2011

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszer-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Dr. Fodor Péter**
az MTA doktora
BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

Témavezetők: **Dr. Maráz Anna**
Egyetemi tanár
A biológiai tudomány kandidátusa
BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
Élelmiszertudományi Kar,
Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

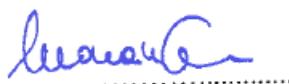
Dr. Poppe László
Egyetemi tanár
az MTA doktora
BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar,
Szerves Kémia és Technológia Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

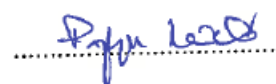
Az Iskola- és a témavezetők jóváhagyó aláírása:



Az iskolavezető jóváhagyása



A témavezetők jóváhagyása



1. BEVEZETÉS

A biokatalízis egyre inkább teret hódít a nagy mennyiségű ipari vegyszergyártásban, a gyógyszeripari és agrokémiai intermedierek, aktív hatóanyagok, valamint élelmiszeripari alapanyagok előállításában. Az alkalmazások mérsékelt száma éppen a biokatalizátorok vélt vagy valós korlátaiból ered, mint pl. a korlátozott hozzáférés az enzimekhez, a szubsztrátok korlátozott köre vagy a működési stabilitásból eredő problémák. Az újkeletű tudományos áttörések, mint a genomika, a molekuláris genetika (genetikai szekvenciák meghatározása, génexpresszió, „site-directed mutagenesis”, stb.), a biológiai rendszerek szerkezetkutatása, a bioinformatika, biodiverzitás illetve ezek egyre fejlődő és bővülő módszereinek kiaknázása segíthet legyőzni ezeket az akadályokat.

A kémikusok világszerte teljes erőbedobással a szintetikus módszerek fejlesztésén és a „zöld” technológiák megvalósításán dolgoznak, amelyek elősegítik a fenntartható környezettudatos fejlődést. A szintetikus szerves kémikusok és technológia-fejlesztő mérnökök manapság már a biokatalitikus transzformációkat, mint gazdaságilag és ökológiailag versenyképes technológiákat, – a finomvegyzerek, gyógyszerek, agrokemikáliák sőt még a tömegárak előállításánál is – új előállítási alternatívaként veszik számba.

A piaci kereslet személyre szabott, speciális alkalmazásokhoz szükséges biokatalizátorok irányába tolódik, amelynek az új enzimek felfedezése, tulajdonságaik finomhangolása, „újraszabhatósága” a hajtó ereje. A finomvegyzerek előállításához az ipar folyamatosan igényli az egyre szelektívebb és hatékonyabb katalizátorokat, technológiákat. Az enzimnek, mint katalizátornak szerkezetéből fakadó szelektivitása egyre inkább kiaknázhatóvá válik, mivel az enantiomertiszta anyagok, gyógyszerek iránti kereslet is folyamatosan növekszik.

A hidrolázok széleskörű alkalmazásának számos nyilvánvaló oka van, melyek közül kiemelkedő, hogy az enzimosztályok terjedelme technológiai szempontból nézve jelentősen növekszik és egyenesen növekszik a különböző laborszintről sikeresen ipari léptékre növelt biotechnológiák száma is. Ez a növekedés nagymértékben a stabil, mely az igény szerinti aktivitással és szelektivitással bíró biokatalizátorok egyre növekvő hozzáférhetőségének köszönhető. Mindez a molekuláris biológia, a nagyhatékonyságú tesztelési technikák és a mérnöki területek fejlődését is tükrözi.

A biokatalízis ipari, szintetikus kémiai használata mára már jelentős léptékű. A biotranszformációk szerves oldószeres és vizes közegben egyaránt kivitelezhetők. A biokatalizátorok új hatékony lehetőségeket biztosítanak a modern szerves kémia számára és környezetbarát technológiát jelentenek az élettudományokhoz köthető szinte összes iparágban (gyógyszeripar, élelmiszeripar, takarmányozás és agrár területen). Az újszerű összetevők szintéziséhez lipáz enzimeket használó eljárások új területeket hódítanak meg és növekedni látszik az ipari alkalmazások száma is.

Napjainkban az egyik legnagyobb kihívás– amivel a szerves kémia szembenéz– az egyre nagyobb számú összetett, biológiailag aktív anyagok gazdaságos szintézise. A különböző iparágak (főként gyógyszeripar, emellett műanyag-, kozmetikai- és élelmiszeripar) számára egyértelműen szükségessé vált a nagytisztaságú enantiomerek előállítása és felhasználása. Valós veszélyt jelent egy hatékony gyógyszer aktív enantiomer formája mellett a másik enantiomer jelenléte. Erre az egyik legismertebb példa az (*R*)-thalidomide (α -ftálimido-glutárimid, Contergan), amely altató, nyugtató hatású, viszont enantiomer párja – az (*S*)-thalidomide – kis mennyiségben is teratogén hatású.

A sztereoselektív szintézismódszerek iránti megnövekedett igény és a környezetvédelmi kérdések fokozatos előtérbe kerülése könnyen érthetővé teszi a "hagyományos" kémiai módszerek mellett a biokatalitikus eljárások iránti érdeklődés robbanásszerű megjelenését mind laboratóriumi, mind ipari méretekben. Az enantiomerek eltérő biológiai hatásainak és a környezeti kérdések súlyát bizonyítja, hogy a világ vezető gyógyszergyárai óriási pénzüsszegeket fordítanak az e kérdések megoldását kereső kutatási és fejlesztési projektekre.

A folyamatos technológia környezetbarát és gazdaságilag is hatékony megoldás lehet; bár az integrált folyamatos üzemű eljárások kis-, közepes- és nagyléptékben jelentős előrelépést jelenthetnek, de olyan ipari technológiák, amelyek laboratóriumi mérettől üzemi méretig működnének ma nagy általánosságban még nem vagy csak szórványosan érhetők el. Csak alig néhány példát lehet találni hidroláz típusú enzim által katalizált, enantiomer szelektív, folyamatos üzemű technológia ipari alkalmazására. Annak ellenére, hogy a rögzített biokatalizátorok jól használhatók folyamatos üzemű rendszerekben, a legtöbb eddig közölt folyamatos üzemű eljárást főleg relatíve nagy léptékben használták rögzített lipázzal töltött ágyas reaktorokban királis gyógyszeripari intermedierek előállítására.

Csak újabban alkalmaztak lipáz-katalizált kinetikus rezolválási reakciókat kutatási célokra, rozsdamentes acélból készült folyamatos üzemű, töltött ágyas bioreaktort felhasználva a hőmérséklet, nyomás és áramlási viszonyok tanulmányozására.

A XXI. század emberének olyan krónikus betegségekkel kell felvennie a harcot, mint a túlsúly (elhízás), magas vérnyomás és koleszterinszint, cukorbetegség, szív- és érrendszeri megbetegedések valamint a vastagbélrák. Ma már biztosan állíthatjuk, hogy a genetikai háttér és az életmód mellett a táplálkozásnak is óriási szerepe van a betegségek kialakulásában. Ezért figyelmünket inkább a megelőzésre kell összpontosítanunk, mint a már kialakult betegségek kezelésére.

Napjainkban egyre jelentősebb szerepet kapnak a funkcionális élelmiszerek, melyek jótékony élettani hatást fejtenek ki az emberi szervezetre és/vagy csökkentik a krónikus betegségek kialakulásának veszélyét. Az élelmiszeriparnak meg kell felelnie az új kihívásoknak és egyre nagyobb figyelmet kell fordítani az ún. „kíméletes” eljárások bevezetésére. Ilyen lehetőséget biztosít a biokatalízis alkalmazása a funkcionális élelmiszerek összetevőinek előállítására.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám a biokatalízis lehetőségeit felhasználva, enzimkatalizált módszerrel előállított specifikus strukturált lipid és növényi szterinészter-keverék tanulmányozását, valamint a szol-gél rendszerben történő lipáz rögzítés szisztematikus továbbfejlesztését és a lipáz enzimrögzítési módszer további javítására alkalmas elv, a “bioimprinting” vizsgálatát tűzte ki célul.

Célkitűzéseim a következők voltak:

- integrált enzimes módszer fejlesztése értéknövelt triglicerid és növényi szterinészter keverék előállítására, különös tekintettel a természetes forrásból származó alapanyagokra és a kizárólag enzimesen történő előállításra, és ezáltal a nemkívánatos *transz*-zsírsavak képződésének visszaszorítására
- szintézis módszer fejlesztése a specifikus strukturált lipid is növényi szterinészter keverék hatékony előállítására
- a lipáz enzim kompozit szol-gél rögzítéséhez használt különböző alkiltriethoxiszilánok (alkilTEOS), feniltriethoxiszilán (PhTEOS) és tetraethoxiszilán (TEOS), mint termer szilán prekursor rendszerek biokatalitikus tulajdonságokra gyakorolt hatásának szisztematikus vizsgálata
- a szol-gél és az adszorpciós kompozitrögzítés együttes hatásának feltárása,
- a biner és termer szilán prekursor rendszerek hatásának tanulmányozása a kompozit szol-gél rögzítésre
- a lipázok kísérleti kristályszerkezetében található szubsztrát(szerű) bioimprinting molekulák szol-gél rögzítésre kifejtett hatásának vizsgálata
- biokatalitikus hatékonyság vizsgálata folyamatos üzemű reaktorban és multisubsztrát rendszerekkel
- hatékony rögzített biokatalizátor fejlesztése folyamatos üzemben megvalósított kinetikus rezolváláshoz

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Anyagok

3.1.1 Enzimek

Doktori munkámban a következő mikroba eredetű lipáz enzimeket használtam fel: Novozym[®] 435 (rögzített *Candida antarctica* lipáz B – jelenleg *Pseudozyma antarctica* nem specifikus), Novozym CaLB L (folyékony, szabad enzim), Lipozyme TL IM (1,3-specifikus, *Thermomyces lanuginosus*-ból származó lipáz) Novozymes A/S-től (Bagsværd, Dánia). CaLA-T2-150 (*Candida antarctica* lipáz A (CaLA, Novozymes Bagsværd, Dánia) a Chiral Vision BV terméke.

Amano Lipáz PS (*Burkholderia cepacia* lipáz (szin.: *Pseudomonas cepacia*); >30.000 U/g; nem specifikus) és Amano Lipáz AK (nem specifikus, *Pseudomonas fluorescens*-ból származó lipáz; >20.000 U/g) az Amano Pharmaceutical Co. Ltd-től (Nagoya, Japan). Lipáz A *Pseudozyma antarctica*-ból, korábbi nevén *Candida antarctica* – specifikus) és *Candida rugosa*-ból (nem specifikus; korábbi neve: *Candida cylindracea*) származó lipáz a Fluka-tól. Lipozyme, *Rhizomucor miehei*-ből (1,3-specifikus, korábbi neve: *Mucor miehei*) származó rögzített lipáz a Sigma-tól.

A kísérletek során felhasznált szterinészteráz aktivitással rendelkező biokatalizátorok, *Aspergillus oryzae* NRRL 6270 (AoSSF) és *Aspergillus sojae* NRRL 6271 (AsSSF) szilárd fázisú fermentációjából (solid state fermentation, SSF) származtak, amelyeket downstream műveletben csak szűrtek és levegőn szárítottak.

3.1.2 Vegyszerek, oldószerek, sztenderdek, nyersanyagok

A strukturált lipidek szintéziséhez a következő triglicerideket állítottuk elő: MMM (tricaprilin), LML (olajsav-kapriilsav-olajsav), MLM (kapriilsav-olajsav/linolsav-kapriilsav), LLM (olajsav/linolsav-olajsav/linolsav- kapriilsav), MML (kapriilsav-olajsav / linolsav -kapriilsav).

A bioimprinting rögzítéshez a következő anyagokat szintetizáltuk: hexán-2-il-acetát, heptán-2-il-acetát, octanol-2-il-acetát, nonan-2-il- acetát, dekán-2-il-acetát dodekán-2-il- acetát, tetraetilén glikol dilauril észter (L-TEG-L), 1-(thiofén-2-il)etanol and 1-(thiofén-2-il)etilacetát.

3.2 Eszközök, műszerek

Doktori munkám során méréseimhez a következő műszereket használtam: a szintetikus standardok (sztenderdek) tisztaságának és a végtermékek regioizomer összetételének meghatározásához PL-ELS 1000 (Polymer Laboratories, 40 °C) detektorral és Ultra C-18 oszloppal felszerelt Alliance Waters 2690 HPLC készüléket használtam. A növényi szterinek acilezésének és a trigliceridek átészterezésének a konverzióját

FID detektorral, HP-1 oszlopon (25 m × 200 μm i.d. × 0,11 μm, Agilent Technologies) és apoláris szilika előtét-kolonnával (0,53 mm i.d., Supelco) szerelt Hewlett Packard 6890 GC berendezésen követtem nyomon. A szol-gél rögzítési és bioimprinting reakciók konverzióját FID detektorral és Hydrodex β-6TBDM [25 m × 0,25 mm × 0,25 μm heptakis-(2,3-di-O-methyl-6-O-*t*-butyldimethylsilyl)-β-cyclodextrin] oszloppal szerelt Hewlett Packard 6890 GC gázkromatográfval követtem nyomon. A kísérletek kiértékelése során pásztázó elektronmikroszkópos (scanning electron microscopy, SEM) felvételeket és mágneses magrezonancia (NMR) méréseket is végeztünk.

3.3 Kísérleti leírás

3.3.1 Enzimes előállítási folyamatok „egy edényes” (one-pot) specifikus strukturált lipid és növényi szterinészter keverék előállításához

Két különböző biokatalizátort, azAoSSF-t (*Aspergillus oryzae* NRRL 6270 készítmény, szterinészter szintézishez) és a Lipozyme-t (rögzített lipáz *Mucor miehei*-ből strukturált lipid szintéziséhez) felhasználva hat különböző módszerrel valósítottam meg az egy edényben történő integrált enzimes specifikus strukturált lipid és növényi szterinészter előállítását. A reakciókat mmolos mennyiségben standard reakciókörülmények között 0,12 w/w% (a kiindulási komponens tömegére vonatkoztatva) víz hozzáadásával végeztem. Mindegyik reakciótípust 3-3 párhuzamos kísérletben végeztem el, három különböző fitoszerin:napraforgóolaj:kaprilsav arányt (1:2:12, 1:2:18 és 1:2:24) felhasználva. Naponta vettem mintát a reakcióelegyből, (50 μl mintát oldottam 1 ml diklórmetánban) a strukturált lipid és szterinészter képződést VRK módszerrel illetve GC és HPLC analízissel követtem nyomon.

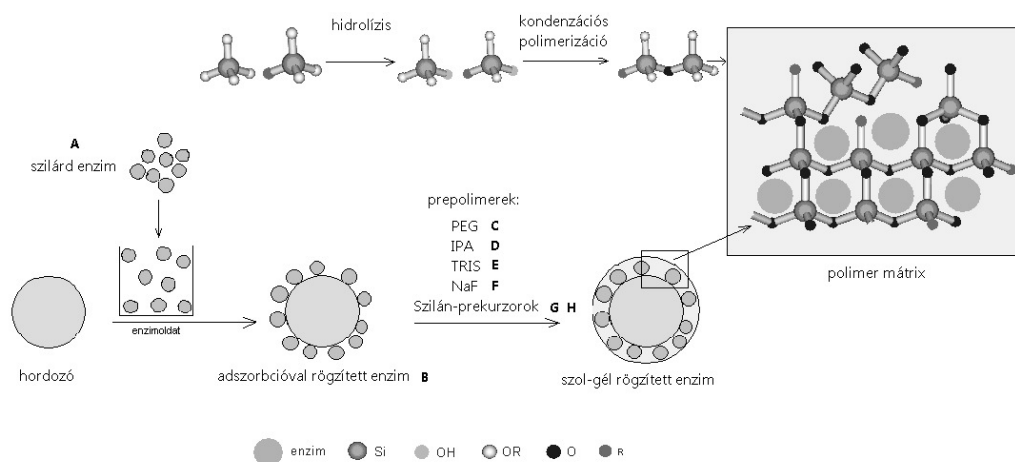
3.3.2 Lipáz AK szol-gél rendszerben történő rögzítése Celite® 545 hordozóra biner vagy terner prekursor szilán rendszerek felhasználásával

A lipáz AK rögzítését kétlépéses eljárással végeztük.

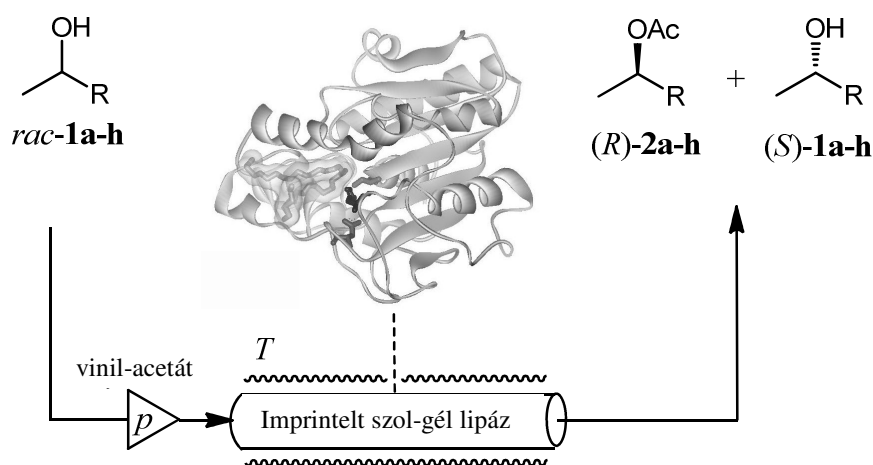
Lipáz AK preadszorpciója Celite® 545 hordozóra: A lipáz AK enzimet (a standard eljárásnál, 50 mg; az enzim mennyiségének a biokatalizátorra kifejtett hatásának vizsgálatánál 50, 125, 250, 375, 500 mg enzim mennyiségek) TRIS-HCl pufferben (0,1 M; pH 7,5; 780 μl) feloldjuk, majd 10 percen keresztül 4°C-on kevertetjük. Hozzáadunk Celite® 545-t (500 mg) és folyamatos, intenzív kevertetés mellett -18 °C-os acetont adagolunk az enzim-Celite rendszerhez (10 ml perc⁻¹ sebességgel). A szilárd anyagot szűrjük, acetonnal mossuk (2×5 ml), majd 12 órán át levegőn száradni hagyjuk. Az így elkészült Celite-re preadszorbeált enzimet a következő lépésben használjuk fel.

Szol-gél immobilizálás: A rögzítéshez TRIS-HCl puffer (390 μl), izopropanol (200 μl), PEG (4 %, 200 μl), NaF (4 %, 200 μl) elegyét egy 20 ml-es üvegben 10 percen keresztül rázógépen kevertetjük (1000

rpm). Folyamatos kevertetés mellett hozzáadjuk az szilán prekursorokat, biner rendszer esetén alkilTEOS:TEOS (1,5 mmol alkilTEOS és 1,5 mmol TEOS), terner rendszer esetén alkilTEOS:PhTEOS:TEOS keveréket (3 mmol összesen; alkilTEOS:PhTEOS:TEOS mólarányt 0,1:0,9:1 és 0,9:0,1:1 között változtattuk 0,1 léptékben), majd gélesedés elkezdődése előtt az enzim:Celite preadszorbeált rendszert (250 mg) is hozzáadjuk. A polimerizáció teljessé tételéhez a szol-gél rendszert további 12 órán át kevertetjük, majd a kész preparátumot izopropanollal (7 ml), desztillált vízzel (5 ml), izopropanollal (5 ml) és végül hexánnal (5 ml) mossuk, 5 órán keresztül, majd vákuum exsziátorban szárítjuk. Az immobilizált enzimeket szobahőmérsékleten tároljuk.



3.3.3 A lipáz készítmények aktivitás tesztje multiszubsztrát rendszerben és folyamatos üzemű reaktorban



4. EREDMÉNYEK

4.1 „Egy edényes” specifikus strukturált lipid és növényi szterinészter szintézis

A biokatalizátorok alkalmazásának új ágaként az egy edényes szintézis több kedvező vonással rendelkezik, például kevesebb reagens, munkafázis szükséges és sokszor nyereségesebb, termelékenyebb a módszer.

Több tanulmány is alátámasztja, hogy a különféle élelmiszeripari alkalmazásokban felhasználható specifikus strukturált lipid és növényi szterinészter elegy *transz*-zsírsavmentes előállítására csak enzimikus eljárásokkal valósítható meg. Ezek alapján feltételezhető, hogy egy tisztán enzimikus lépésekből álló, kémiai átészterezést nem tartalmazó eljárás előnyösebb lehet a már ismert módszereknél. Várható tehát, hogy az enzimikusan előállított, értéknövelt termékek mind fizikai, mind pedig fiziológiai tulajdonságaikat tekintve egyenértékűek vagy jobbak, mint a kémiai módszerekkel előállított strukturált lipid és növényi szterinészter keverékek.

A fentiek tükrében célunk, értéknövelt triglicerid és növényi szterinészter keverék integrált enzimikus szintézis módszerrel történő előállítása volt, különös tekintettel a természetes forrásból származó alapanyagokra és a kizárólag enzimikusan történő előállításra. A növényi szterinek a növényolajgyártás melléktermékeként könnyen hozzáférhetőek. Munkám során repceből és napraforgóból származó szterinkeveréket használtam, melynek fő komponensei: brasszicaszterin, kampezszerin, sztigmaszterin és β -szitoszterin. Kísérleteinkben természetes kiindulási anyagként kaprilsavat, – amely közepes szénláncú zsírsav, fő forrása a kókusz – továbbá napraforgóolajat, mint linolsavban gazdag (48-74% összes zsírsavra nézve) trigliceridet használtuk fel.

A strukturált lipid és növényi szterinészter keverék a szterinészteráz által katalizált zsírsav (kaprilsav) és növényi szterin közötti átészterezési reakciót követő vákuumos víztávolítással, majd az azt követő rögzített lipáz (*Rhizomucor miehei* – Lipozyme) katalizálta átészterezési reakciójával állítható elő a leghatékonyabban. A szterinészterek konverziója így 92,1%, míg a strukturált lipidek (MLM/MML) konverziója 44,1%. A kívánt termékek keveréke a biokatalizátorok kiszűrését követően egyszerű módszerrel, a feleslegben alkalmazott szabad zsírsavak vákuum desztillációs eltávolításával tisztítható. Az alkalmazott enzimikus átészterezésnek köszönhetően a *transz*-zsírsavtartalom sem emelkedett a kiindulási szinthez képest.

Az integrált strukturált lipid és növényi szterinészter keverék előállítására fejlesztett eljárás során kizárólag élelmiszerminőségű biokatalizátorokat alkalmaztunk, az így az enzimikusan előállított keverék felhasználható élelmiszerekben, üdítőitalokban, vagy funkcionális élelmiszerekben. A biokatalízis

alkalmazásával a minőségi zsírbevitel fejleszhető lenne, amely alternatív megoldást nyújthat az elhízás elleni küzdelemben.

4.2 Biokatalizátorok katalitikus tulajdonságainak fejlesztése, lipázok szol-gél rögzítéshez használt szilán prekursorok finomhangolása

A lipázok robusztus rögzítési formájaként, a kutatócsoport korábbi munkái alapján igen alkalmasnak bizonyult szol-gél rögzítési technika további optimalizálását választottuk. A szisztematikus vizsgálatok (prekursor / hordozó / rögzítési körülmények / adalékok hatásai) összehasonlíthatósága érdekében a kísérleteket zömében a *Pseudomonas fluorescens* lipáz (lipáz AK) enzimmel végeztük. A módszer (normál, ill. kompozit szol-gél) más lipázra (lipáz PS) és hordozóra történő kiterjesztésével is foglalkoztunk.

A szol-gél mátrix kialakítását biner és terner szilán rendszerek kialakításával végeztük. Biner rendszerek esetében alkiltriethoxi- (alkilTEOS) és tetraethoxiszilánok (TEOS) rögzített mólarányú keverékével, míg terner rendszerek esetében alkiltriethoxiszilán [$R'-Si(OEt)_3$ / alkilTEOS], feniltriethoxiszilán [$PhSi(OEt)_3$ / PhTEOS] és tetraethoxiszilán [$Si(OEt)_4$ / TEOS] kombinációival hoztuk létre a polimer hálót. A kísérletek során nyolc különböző alkiltriethoxiszilán komponenst vizsgáltunk: propilTEOS (PrTEOS), hexilTEOS (HexTEOS), oktilTEOS (OcTEOS), perfluorooktilTEOS (PFOctTEOS), decilTEOS (DecTEOS), dodecilTEOS (DodTEOS), oktadecilTEOS (OctdTEOS) és fenilTEOS (PhTEOS). Szilárd hordozóval történő együtt-rögzítéssel az egységes szemcseméret eloszlás megmarad és a rögzített enzim fajlagos enzimaktivitása jelentősen megnő. Ezért az enzimeket minden esetben Celite[®] 545 hordozóra adszorbeáltuk majd szol-gél rendszerben rögzítettük. A hordozó és a lipáz mennyiségét 10:1, 10:2.5, 10:5, 10:7.5 és 10:10 arányokban változtattuk. Az elkészült preparátumokat pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM) vizsgáltuk. A gázkromatográfiás analízis alapján 10:1 hordozó:enzim arány az optimális, melyet a elektronmikroszkópos felvételek is igazolni látszanak.

A biokatalizátorokat a legegyszerűbb aromás szekunder alkohol, a racém 1-feniletanol kinetikus rezolválási reakciójával teszteltük. Összehasonlításként egy alacsonyabb szelektivitással átalakítható alifás szekunder alkohol, a 2-heptanol acilezési reakcióját is vizsgáltuk. Az eredmények értékelésénél referenciaként minden esetben a kereskedelmi forgalomban elérhető szabad és szol-gél rögzített lipázok, illetve a hordozó nélküli szol-gél rögzített lipázok szolgáltak. A készítmények biokatalitikus tulajdonságait a következő paraméterekkel jellemezhetjük: specifikus biokatalizátor aktivitás, specifikus enzim aktivitás, enantiomer szelektivitás és enantiomer tisztaság.

A szol-gél rögzítésnél trialkoxiszilán [$R'-Si(OR)_3$] komponensként leggyakrabban metoxiszilán származékokat [$R'-Si(OR)_3$, R= Me] alkalmaztak. A metoxi (R= Me) és etoxi (R= Et) származékok hatása

között jelentős különbség nincs, azonban tapasztalataink alapján az etoxiszilánok olcsóbbak és hosszabb gélesedési idejük kísérleti szempontból előnyösebb, így minden esetben etoxiszilán származékokkal dolgoztunk.

A biner rendszerek közül szelektivitás és produktivitás tekintetében a PhTEOS:TEOS=1:1 mólarányú összetétel bizonyult a legjobbnak. A kétkomponensű rendszer eredményeit a terner rendszerek optimalizálásánál felhasználtuk. A háromkomponensű szol-gél mátrixok (alkilTEOS:fenilTEOS):TEOS 1:1 mólarányú összetételeinek finomhangolása során az (alkilTEOS:fenilTEOS):TEOS rendszerek mólarányát 0,1:0,9:1 és 0,9:0,1:1 között 0,1 léptékben változtattuk. A specifikus aktivitások tekintetében a közepes lánchosszúságú szilánkomponensek, mint hexil-, oktil-, perfluorooktiltrietoxiszilánok bizonyultak a legjobbaknak. Az enantiomer szelektivitások tekintetében a hosszabb szénláncú alkilcsoportokat tartalmazó prekursorok (decil-, dodecil-, oktadecilTEOS) katalitikus tulajdonságra kifejtett hatása eredményesnek bizonyult. Mindhárom paraméter (specifikus aktivitás, biokatalizátor aktivitás, szelektivitás) acilezési reakcióra kifejtett hatásánál közös optimumot keresve a terner rendszerek esetében is egyértelműen a PfoctTEOS a legkiemelkedőbb prekursor. Célunk a finomhangoláson és az optimális összetétel meghatározásán felül a biokatalizátorok gazdaságos és költséghatékony módon történő előállítására és méretnövelésére. Katalitikus paraméterek és az ár együttes figyelembe vételével a közepes alkillánc-hosszúságú OctTEOS:PhTEOS:TEOS háromkomponensű rendszer tűnt a legalkalmasabbnak a szol-gél rögzítési módszer továbbfejlesztésére.

A hordozó porozitásának hatását két különböző inert szilárd hordozón (Celite[®] 545 és szilikagél), két különböző enzimet (lipáz AK és PS) alkalmazva vizsgáltuk. Az enzimek szol-gél mátrixba zárását a tapasztalatok alapján biner, oktiltrietoxiszilán (OcTEOS) és tetraetoxiszilán (TEOS) prekursorok 1:1 mólarányú keverékkel végeztük. Az aktivitásokat két különböző enzim-hordozó aránynál vizsgáltuk (1:5 és 1:10 enzim-hordozó arányok). Lipáz AK esetében a két különböző enzim-hordozó arány nem befolyásolja a konverzió, a szelektivitás és a specifikus biokatalizátor aktivitás értékeit. Az enzim mennyiségét felére csökkentve a specifikus enzimaktivitás duplájára növekszik. Lipáz PS enzimmel ez a hatás jóval mérsékeltebb. A enzim optimális felületi megkötődését Celite[®] 545 hordozó esetében 1:5, míg szilikagél esetében 1:10 enzim-hordozó aránynál értük el.

Bármely katalitikus tulajdonságot jellemző paramétert vizsgáltuk, az általunk előállított enzimkészítmények sok esetben jóval meghaladják a kereskedelmi forgalomban lévő szol-gél immobilizált enzimek produktivitás, szelektivitás vagy konverzió értékeit.

4.3 Újszerű szol-gél lipázok előállítás bioimprintinggel

A bioimprinting lipázok szol-gél rögzítésére gyakorolt hatásának tanulmányozásával az volt a célunk, hogy nagymértékben továbbfejlesztett, újszerű, rögzített biokatalizátorokat állítsunk elő folyamatos üzemű reaktorban végzett biotranszformációkhoz. Az imprinting adalékként felhasználni kívánt szubsztrát analógokat vagy szerkezetileg hasonló molekulákat, az eddig meghatározott kísérleti lipáz röntgenszerkezetek (Protein Data Base, PDB) aktív centrumában fellelhető molekulák alapján szisztematikusan választottuk ki. Négy lipázt (lipáz AK, lipáz PS, *Candida antarctica* lipáz B és *Candida rugosa* lipáz) rögzítettünk szol-gél módszerrel, az így kiválasztott kilencféle bioimprinting molekulával és a tetraetoxiszilán (TEOS), feniltetoxiszilán (PhTEOS), oktiltetoxiszilán (OcTEOS) valamint a dimetildietoxiszilán (DMDEOS), mint szilán prekursorok különböző kombinációjának alkalmazásával. A rögzített lipázok biokatalitikus tulajdonságait két különböző, racém szekunder alkoholokat tartalmazó multisubsztrát eleggyel (egy kétkomponensű szekunder alkohol rendszer: *rac-1a,b* és egy ötkomponensű szekunder alkohol rendszer: *rac-1c-g*) szakaszos és folyamatos üzemű reaktorokban kivitelezett enantiomerszelektív acilezési reakciókban teszteltük. A legjobb imprintelt szol-gél lipáz katalizátorok katalitikus alkalmazhatóságát racém 1-(tiofén-2-il)etanol (*rac-1h*) szubsztrát szakaszos és folyamatos üzemű rendszerekben végzett kinetikus rezolválása során mutattuk be.

A szol-gél rögzítés során az enzim egy bizonyos konformációban rögzül vagyis „megfagy” a szerkezete, így érthető, hogy a rögzített lipáz szerkezetének miért olyan nagy a jelentősége. A megfelelően kiválasztott körülmények és paraméterek is nagyban hozzájárulnak a lipáz konformációjának egy sokkal stabilabb állapotban történő rögzítéséhez. Ezért amennyiben a lipáz nyitott állapotban tartható, vagyis az enzim aktív konformációja rögzíthető, abban az esetben a rögzített lipáznak szerves oldószeres közegben is elvárhatóan nagy lesz az aktivitása.

Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a szol-gél mátrix összetételétől függetlenül (biner vagy terner rendszer) a lipázok kísérleti kristályszerkezete alapján kiválasztott szubsztrátanalógszerű molekuláknak volt a legjelentősebb imprinting hatása. A Lipáz PS enzimet vizsgálva (*Burkholderia cepacia* lipáz szerkezetében a sztearinsav volt jelen) a laurinsavat találtuk a leghatékonyabb imprinting molekulának, míg a *Candida* sp. (CaLB, CrL) esetében tetraetilén-glikol-dodecil-éter (BRIJ 30) mutatta a legjobb imprinting hatást.

A trialkoxiszilánokat (pl. OcTEOS, PhTEOS) tartalmazó szol-gél rendszerek nagy hatékonysága azzal a feltételezéssel magyarázható, hogy ezeknek a szilánoknak vagy részlegesen elhidrolizált származékainak is imprinting hatása van. Ez a feltételezés lehet a magyarázata annak, hogy a lipáz AK miért nem igényelte külön imprinting molekula hozzáadását a maximális fajlagos aktivitás eléréséhez.

Az ésszerűen kiválasztott imprinting molekulák a megfelelő szilán prekursorokkal ötvözve nagyléptékben is lehetővé tennék a szol-gél lipázok előállítását a különböző alkalmazások számára. A

kiválasztott négy lipáz robusztus szol-gélben rögzített formája (lipáz AK, lipáz PS, *Candida antarctica* lipáz B és *Candida rugosa* lipáz) ideális biokatalizátor lehetne olyan biotranszformációkban, mint pl. racém alkoholok szakaszos és folyamatos üzemű rendszerben végzett kinetikus rezolválása.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

I. Enzimes speciális strukturált lipid és növényi szterinészter szintézis területén:

T1. Bebizonyítottam, hogy természetes alapanyagokból értékes, az egészségre jótékony hatású specifikus strukturált lipid és szterinészter elegendő, mint egészséges élelmiszer összetevő előállítható kizárólag enzimes szintézissel, szerves oldószermentes közegben.

T2. Megállapítottam, hogy a speciális strukturált lipid és növényi szterinészter keverék szintéziséhez a szterinészteráz által katalizált zsírsav és növényi szterin közötti átészterezési reakciót követő vákuumos víztávolítási lépés, majd az azt követő rögzített lipáz (*Rhizomucor miehei* – Lipozyme) katalizálta átészterezési reakció bizonyult a legjobb előállítási folyamatnak, amelyben a szterinészterek konverziója 92,1%, míg a strukturált lipidek (MLM/MML) konverziója 44,1%. Emellett az eredeti *transz*-zsírsav tartalom sem emelkedett.

II. A szilán prekursorok összetételének finomhangolása a lipázok szol-gél rögzítési módszerében

T3. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokkal bebizonyítottam, hogy az 1:10 lipáz AK:Celite arány vékony felületi borítottságot eredményez a nagyobb enzim-hordozó arányokhoz (1:1, 1:2, 3:4) képest. A diffúziós korlátokat figyelembe véve a SEM felvételek alapján az 1:10 enzim-Celite aránynál figyelhető meg a vékony felületi borítottság, így a szilárd hordozóra (Celite) történő kicsapást követő szol-gél polimerizációval nyert biokatalizátorok számos előnyös sajátossággal bírnak; a hordozó viszonylag egységes szemcseméret eloszlása megmaradt és a rögzített enzim fajlagos enzimaktivitása egy nagyságrenddel megnövekedett ($Y_a > 200\%$)

T4. Termer szilán prekursor rendszerek alkalmazásával megerősítettem a finomhangolás szükségességét, mivel az alkalmazott termer rendszerek mindegyike felülmúlta a biner rendszerekkel kapott eredményeket.

Az $[R'-Si(OEt)_3:Si(OEt)_4]$ biner szol-gél rendszerekkel előállított biokatalizátorok katalitikus tulajdonságainak vizsgálatánál mindent figyelembe véve (konverzió, enantiomer szelektivitás, enzimaktivitás, fajlagos enzimaktivitás), arra a következtetésre jutottunk, hogy a PhTEOS:TEOS=1:1 mólarányú összetétel bizonyult a legjobbnak. A kétkomponensű rendszer eredményeit a továbbiakban felhasználtuk a terner rendszerek optimalizálásánál. A specifikus aktivitások tekintetében a közepes lánchosszúságú szilánkomponensek, mint hexil-, oktil-, perfluorooktiltrietoxiszilánok bizonyultak a legjobbnak. Az enantiomer szelektivitások esetében a hosszabb szénláncú alkilcsoportokat tartalmazó prekursorok (hexil-, oktil-, perfluorooktil-, decil-, dodecil-, oktadecilTEOS) katalizátorra kifejtett hatása jó szelektivitásokat eredményezett. Mindhárom paraméter (specifikus enzimaktivitás, fajlagos enzimaktivitás és enantiomerszelektivitás) acilezési reakcióra kifejtett hatásánál közös optimumot keresve a terner rendszerek esetében is egyértelműen a PfoctTEOS a legkiemelkedőbb prekursor.

Miután célunk a finomhangoláson és az optimális összetétel meghatározásán felül a biokatalizátorok gazdaságos és költséghatékony módon történő előállítása és méretnövelése, katalitikus paraméterek és az ár együttes figyelembe vételével a közepes alkilánchosszúságú TEOS:OctTEOS:PhTEOS háromkomponensű rendszert találtuk a legalkalmasabbnak a szol-gél mátrixok továbbfejlesztésre.

T5. Sikeresen fejlesztettem tovább a lipázok hordozóhoz kötött szol-gél rögzítési módszerét. A saját módszerrel előállított új biokatalizátorok jobb katalitikus tulajdonságokat mutattak, mint a kereskedelmi forgalomban kapható szol-gél lipáz készítmények. Saját készítményekkel kereskedelmi forgalomban kapható szol-gél rögzített enzimekhez képest 1,4-szeres (109-242%) fajlagos aktivitásnövekedést sikerült elérni.

III. Újszerű szol-gél lipázok előállítása “bioimprinting” módszerrel

T6. Igazoltam, hogy a lipázok kísérleti kristályszerkezete alapján ésszerűen kiválasztott szubsztrátanalógszerű molekuláknak volt a legjelentősebb imprinting hatása. Laurinsavat találtam a leghatékonyabb imprint molekulának a Lipáz PS számára (*Burkholderia cepacia* lipáz szerkezetében a sztearinsav volt jelen) míg a *Candida* sp. (CaLB, CrL) esetében tetraetilén-glikol-dodecil-éter (BRIJ 30) mutatta a legjobb imprint hatást.

- T7. Rávilágítottam arra, hogy a trialcoxiszilánokat (pl. OcTEOS, PhTEOS) tartalmazó szol-gél rendszerek nagy hatékonysága azzal a feltételezéssel magyarázható, hogy ezeknek a szilánoknak vagy részlegesen elhidrolizált származékainak imprinting hatása van. Ez a feltételezés lehet a magyarázata annak, hogy a lipáz AK esetében miért nem szükséges külön imprinting molekula hozzáadása a maximális fajlagos aktivitás eléréséhez.
- T8. A rögzített lipázok biokatalitikus tulajdonságának tesztelésére egy újszerű módszert dolgoztam ki. A szakaszos és folyamatos üzemű reaktorokban kivitelezett lipáz-katalizált racém multisubsztrát eleggyel történő acilezési reakciók enantiomerszelektív GC elválasztási módszerén alapul. Irodalmi adatok alapján, a szol-gélbe zárt enzimek produktivitásának és szelektivitásának összehasonlítása multisubsztrát rendszer alkalmazása még újdonságnak számít.
- T9. Bebizonyítottam a legjobb imprintelt szol-gél lipáz katalizátorok: imprintelt lipáz AK (2x-es enzim mennyiség, TEOS:PhTEOS:DMDEOS 4:1:1 szilán prekursor rendszerben, imprint molekula hozzáadása nélkül készült) és imprintelt CaLB (2x-es enzim mennyiség, TEOS:PhTEOS:DMDEOS 4:1:1 szilán prekursor rendszerben, BRIJ 30 imprint molekula hozzáadásával készült) katalitikus használhatóságát racém 1-(tiofén-2-il)etanol (*rac-1h*) szubsztrát szakaszos és folyamatos üzemű rendszerben végzett kinetikus rezolválása során.

6 PUBLIKÁCIÓS LISTA

Impakt faktoros folyóiratcikkek

A. Szydłowska-Czeraniak, Gy. Karlovits, **G. Hellner**, Cs. Dianóczki, E. Szlyk, Effect of Enzymatic and Hydrothermal Treatments of Rapeseeds on Quality of the Pressed Rapeseed Oils PART I: Antioxidant Capacity and Antioxidant Content, *Process Biochemistry* 45, 2010, 7-17 (impakt faktor: 2.648)

A. Szydłowska-Czeraniak, Gy. Karlovits, **G. Hellner**, E. Szlyk, Effect of Enzymatic and Hydrothermal Treatments of Rapeseeds on Quality of the Pressed Rapeseed Oils PART II: Oil Yield and Oxidative Stability, *Process Biochemistry* 45, 2010, 247-258 (impakt faktor: 2.648)

G. Hellner, E.R. Tőke, V. Nagy, Gy. Szakács, L. Poppe, Integrated enzymatic production of specific structured lipid and phytosterol ester compositions *Process Biochemistry* 45, 2010, 1245-1250 (impakt faktor: 2.648)

A. Tomin, D. Weiser, **G. Hellner**, Zs. Bata, L. Corici, F. Péter, B. Koczka, L. Poppe, Fine tuning the second generation sol-gel lipase immobilization with ternary alkoxy silane precursor systems *Process Biochemistry* 46, 2011, 53-58 (impakt faktor: 2.648)

G. Hellner, Z. Boros, A. Tomin, L. Poppe, Novel sol-gel lipases by designed bioimprinting for continuous-flow kinetic resolutions, *Advanced Synthesis & Catalysis*, *IN PRESS* (impakt faktor: 5.25)

Nem impakt faktoros folyóiratcikk

G. Hellner, Zs. Kemény, K. Kővári, K. Recseg, Hydrolysis of Sunflower Lecithin by a Novel Microbial Phospholipase, *Olaj Szappan Kozmetika*, 4, 2004, 137-141, (2004)

Publikáció konferencia kiadványban Magyar nyelvű összefoglalók

Hellner G., A napraforgó lecitin enzimes hidrolízise, XXVI. OTDK, (Kaposvár) 2003.

Hellner G., Tőke E. R., Nagy V., Szakács Gy., Poppe L., Értéknövelt Triglicerid és Növényi Sztérinterkeverék "One-Pot" (Egy Edényes) Enzimes Előállítás, Lippai-Ormos-Vas Tudományos Űlésszak, (Budapest) 2009

Z. Boros, **G. Hellner**, B. Brém, Zsóka P., L. Poppe Kéntartalmú, heterociklusos szekunder alkoholok kinetikus rezolválásának vizsgálata szakaszos és folyamatos bioreaktorokban, MKE 1. Nemzeti Konferencia, (Sopron) 2011

Nemzetközi összefoglalók

G. Hellner, Zs. Kemény, K. Kővári, K. Recseg Application of Phospholipase A₁ in modification of sunflower lecithin, 16th International Plant Lipid Symposium Budapest, 2003

G. Hellner, E.R. Tőke, V. Nagy, Gy. Szakács, L. Poppe, Enzymatic One-Pot Production of Specific Structured Lipids and Plant Sterol Esters, 2nd Central European Forum For Microbiology (Keszthely) 2009

Zs. Kemény, **G. Hellner**, A. Radnóti, Timo Erjomaa, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Removal from Coconut Oil, 9th Euro Fed Lipid Congress, Rotterdam, The Netherlands, 2011

Szakma specifikus alkotások
Szakmai elismerés, szakmai díjak

Bunge Europe Innovation and Excellence Award, 2009

Bunge Europe Innovation and Excellence Award, 2010

Tudományos utánpótlás-nevelés

Konzulensi munka (diplomamunka, szakdolgozat, TDK témavezetés)

Pichler Gábor *The impact of bleaching conditions on the removal of color materials in rapeseed oil*
szakdolgozat 2010