

HAGYOMÁNYOS ÉS NEM-KONVENCIÓNÁLIS
KÖZEGŰ ÖSSZETETT ENZIMES REAKCIÓ
KINETIKAI VIZSGÁLATA

NEMESTÓTHY NÁNDOR

DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

TÉMAVEZETŐ:
BÉLAFINÉ DR. BAKÓ KATALIN
TUDOMÁNYOS FŐMUNKATÁRS
MŰSZAKI KÉMIAI KUTATÓ INTÉZET



VESZPRÉMI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI DOKTORI ISKOLA
2005

**Hagyományos és nem-konvencionális
közegű összetett enzimes reakció
kinetikai vizsgálata**

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

Írta:
.....Nemestóthy Nándor....

**Készült a Veszprémi Egyetem Vegyészmérnöki..... iskolája keretében

Témavezető:Bélafiné Dr. Bakó Katalin.....

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

(aláírás)**

A jelölt a doktori szigorlaton % -ot ért el,

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: igen /nem

.....
(aláírás)

Bíráló neve: igen /nem

.....
(aláírás)

***Bíráló neve: igen /nem

.....
(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján% - ot ért el

Veszprém/Keszthely,

.....
a Bíráló Bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése.....

.....
Az EDT elnöke

Megjegyzés: a * közötti részt az egyéni felkészülők, a ** közötti részt a szervezett képzésben résztvevők használják, *** esetleges

Tartalomjegyzék

Kivonat	5
Abstract	6
Auszug	7
1. Bevezetés.....	8
2. Irodalmi áttekintés.....	10
2.1. Enzimes reakciók és közegek	10
2.2. Enzimkinetika	12
2.3. Inhibíciós kinetikák.....	13
2.4. Az összetett enzimes reakciók fajtái	14
2.5. A ping-pong bi-bi mechanizmus.....	17
2.6. Keményítő enzimes hidrolízise.....	22
2.7. Lipázos reakciók, észterezés	29
3. Kísérleti anyagok és módszerek.....	35
3.1. Felhasznált anyagok.....	35
3.1.1. Enzimek	35
3.1.2. Egyéb vegyszerek	37
3.2. Mérési módszerek	38
3.2.1. Glükóamiláz aktivitásának mérése	38
3.2.2. Keményítő hidrolízis rázatott lombikban	38
3.2.3. Lipázos kinetikai mérések rázatott lombikban	39
3.2.4. Az észterezési reakció analitikai vizsgálata.....	39
3.2.5. Kezdeti reakciósebesség meghatározása	40
4. Eredmények.....	42

4.1. Keményítő hidrolízis vizsgálata.....	43
4.1.1. Stabilitás vizsgálata	43
4.1.2. Kinetikai vizsgálatok	48
4.1.3. Integrált rendszer	51
4.2. Lipázos észterezés kinetikai vizsgálata.....	56
4.2.1. A reakció időbeli lefutása	56
4.2.2. Kinetikai paraméterek meghatározása	63
4.2.3. A víz hatása	76
4.2.4. A modell gyakorlati felhasználása.....	79
5. Összefoglalás.....	84
6. Irodalomjegyzék.....	89
Tézisek	95
Theses.....	97
7. Publikációk.....	99
8. Függelék	102
8.1. A kezdeti reakciósebesség meghatározása.....	102
8.2. A kinetikai állandók meghatározása	103
8.2.1. Az egyenlet linearizálásán alapuló módszerek.....	103
8.2.2. A nem lineáris regresszió alapuló módszerek	104
Köszönetnyilvánítás	109

Kivonat

Ebben a disszertációban olyan hagyományos és nem-konvencionális közegű enzimes reakciók kerülnek ismertetésre, ahol a folyamatban több szubsztrát vesz részt, többféle termék képződik vagy a reakció több lépésből áll, illetve inhibíciós jelenségek, és/vagy oldhatósági problémák nehezítik a kinetika leírását. Az ilyen fajta összetett enzimes reakciók kinetikájának pontos meghatározásához a Michaelis-Menten modell módosított illetve kibővített verziói szolgálnak alapul.

A szerző két enzimes folyamatot, a glükóamilázos keményítő hidrolízist és a lipázos olajsav-i-amil-észter szintézis lefutását, viselkedését vizsgálja. Előbbinél a megújuló növényi forrásból származó alapanyagból glükóz nyerhető, mégpedig hulladékmentes eljárással, kíméletes körülmények között, vizes közegű enzimes reakcióval. Utóbbi folyamán pedig olyan biokenőanyag állítható elő szerves oldószeres reakció során, amely biológiai eredetű, környezetbarát és az élővizekre nézve nem toxikus.

Az *Aspergillus awamori* fermentációjával előállított glükóamiláz enzim stabilitás és részletes kinetikai vizsgálata után szakaszos kevert reaktorban, valamint folyamatos működésű síkmembrán modulban valósítja meg a keményítő hidrolízist, összehasonlítva a két rendszer hatékonyságát.

A szerző az olajsav és az i-amil-alkohol Novozym® 435 lipázzal történő észterezésének kinetikáját, három- négy- és ötparaméteres ping-pong bi-bi típusú modellek segítségével figyelembe véve az i-amil-alkohol és az olajsav szubsztrát gátlását. Vizsgálja a víztartalom hatását a négyparaméteres modell változatlan alkalmazása mellett, a látszólagos aktivitást változtató modell segítségével. Az előzőekben leírt enzimkinetikai modell segítségével optimális kiinduló paraméter tartományt határoz meg, amely a lehető legnagyobb hatékonyságú észter előállítás eredményezi.

Abstract

Kinetics studies of multireactant enzymatic reactions in aqueous and non-conventional media

In this work kinetics of two multireactant kinetics systems was investigated.

Glucoamylase enzyme for starch hydrolysis was produced extracellularly by fermentation of strain *Aspergillus awamori*, which was genetically modified to have high level glucoamylase activity. The enzyme has deactivated quickly, a liquid protease inhibitor cocktail was selected and applied to enhance stability of the enzyme. The enzyme preparation is being used for glucose production from starch in a flat-sheet membrane bioreactor.

Esterification of oleic-acid and i-amyl alcohol by lipase enzyme results i-amyl-oleate which is widely used as a bio-lubricant, easily degradable compound. It was suggested that the kinetics of the reaction was a so called “Ping-Pong Bi-Bi” mechanism. Mathematical model of the reaction in batch system and integrated with continuous water removal was applied to describe the processes. Several simulations were carried out shows that this integration can efficiently enhance the reaction.

Auszug

In dieser Arbeit wurde die Kinetik von zwei multireaktanten kinetischen Systemen untersucht.

Das Glucoamylase Enzym für die Hydrolyse von Stärke ist extrazellulär durch Fermentation des Stammes *Aspergillus awamori* produziert, das genetisch modifiziert wurde, um die Aktivität von Glycoamylase zu erhöhen. Das Enzym wurde schnell deaktiviert, und ein flüssiges Protease Hemmer-Koktail wurde ausgewählt und angewandt, um die Stabilität des Enzymes zu erhöhen. Das Enzympräparat wurde zur Glukoseproduktion aus Stärke in einem Flachmembranbioreaktor verwendet.

Die Veresterung von Ölsäure und i-Amyl-alkohol durch Lipase Enzyme resultiert i-Amyl-oleat, ein breit verwendetes Bioschmierstoff, eine leicht abbaubare Verbindung. Es war vermutet, daß die Kinetik der Reaktion entsprach dem „Ping-Pong Bi-Bi“ Mechanismus. Mathematisches Model der Reaktion wurde verwendet, um das Prozess in Batch und integriertem System mit kontinuierlichen Wasserentfernung zu beschreiben. Verschiedene Simulationen sind ausgeführt worden, die klar beweisen, dass die Integrierung die Reaktionsgeschwindigkeit wesentlich erhöht.

1. Bevezetés

A biomérnöki kutatás az elmúlt évtizedekben teret nyert a vegyészmérnöki tudományterületen belül. Az enzimek segítségével végrehajtott reakciónak számos előnye van a hagyományos szerves kémiai szintézishez képest, például:

- Szelektív reakció, nem képződnek melléktermékek,
- Enyhe, kíméletes reakció körülmények,
- Sztereoszelektív átalakítás lehetősége, tiszta enantiomer a termék,
- Környezetbarát eljárás.

Doktori munkám során olyan hagyományos és nem-konvencionális közegű enzimes reakciók kinetikájának tanulmányozása a cél, ahol a folyamatban több szubsztrát vesz részt, többféle termék képződik vagy a reakció több lépésből áll, illetve inhibíciós jelenségek, és/vagy oldhatósági problémák nehezítik a kinetika leírását. Az ilyen fajta összetett enzimes reakciók kinetikájának pontos meghatározásához a Michaelis-Menten modell módosított illetve kibővített verziói szolgálnak alapul.

Az enzimek által katalizált folyamatok gyakori jellemzője, hogy a keletkezett termék nagymértékben csökkenti a termékképződési sebességet. A sebességcsökkenés mértékét és okát az inhibíciós enzimkinetika vizsgálja.

Az enzimkinetika kezdetben a szerkezetvizsgálat és egyéb biokémiai alapkutatási kérdések megválaszolásának eszköze volt, mára a modern nanotechnológiai módszerek ezt háttérbe szorították. Igen jól használható azonban, ha egyes folyamatokat, konkrét reakciókat akarunk megismerni, optimalizálni, akár vegyészmérnöki szempontokat (oldószer, berendezés, stb.) is figyelembe véve.

A konkrét vizsgálatokhoz két alapreakciót választottunk ki: a glükóamilázos keményítő hidrolízist és a lipázos i-amil-oleát szintézist. Előbbinél a megújuló, növényi forrásból származó alapanyagból glükóz, egy fontos gyógyszer- és élelmiszeripari alapanyag nyerhető, mégpedig hulladékmentes, környezetbarát módon, kíméletes körülmények között, vizes közegű enzimes reakció alkalmazásával. A lipázos reakció folyamán olyan biokenőanyag állítható elő, amelynek egyrészt biológiai eredetű kiinduló anyagai vannak: a növényi/állati zsírokból/olajokból nyerhető olajsav ill. az alkohol desztillációnál keletkező melléktermék, a kozmaolaj, amelynek fő komponense az i-amil-alkohol; másrészt nem jelent

veszélyt az élővizekre, amelyet a zebrahalakkal elvégzett toxicitás teszt igazolt (nem toxikus, $LC_{50} > 100$ mg/l). Ezt az enyhe körülmények közt zajló enzimes észterezést, illetve kinetikáját szerves oldószerben vizsgáltam.

Mindkét enzimes reakció több-szubsztrátos, összetett folyamatnak fogható fel, hiszen a keményítő hidrolízis során a glükóamiláz enzim glükóz egységeket hasít le a poliszacharid láncból, (egy-egy vízmolekula felvétele közben), s így annak mérete egy-egy egységgel csökken. Az észter szintézisnél az olajsav és az i-amil-alkohol a két szubsztrát, s reakciójuk folyamán két termék: észter és víz keletkezik (bi-bi reakció). Így mindkét enzimes folyamatnál kulcsszerepe van a víznek. A keményítő hidrolízisénél nemcsak reakciópartner, de egyben oldószer is, az észter szintézisének pedig termék, melynek koncentrációja befolyásolja az enzim viselkedését.

A két enzimes reakció ugyanakkor sok tekintetben különbözik is egymástól. A keményítő hidrolízis vizes közegben megy végbe, így a víz - mint reakciópartner - tulajdonképpen végtelen feleslegben van jelen, s így látszólag egy szubsztrátos reakciónak tekinthető. A lipázos észterezés viszont szerves oldószerben játszódik le.

A kinetikai vizsgálatokhoz kiválasztott két enzimes reakció ipari szempontból is fontos, s a laborkísérleteket követő méretnöveléshez, a nagyobb léptékű megvalósításhoz alapvető, hogy a folyamatok kinetikai viselkedésének részletei tisztázottak legyenek.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Enzimes reakciók és közegük

Az élő szervezetekben olyan reakciók is lejátszódnak, melyek az élő anyagon kívül azonos körülmények között nem, vagy sokkal lassabban mennek végbe. Az ily módon zajló különleges reakciókat Berzelius tanulmányozta először, keményítő hidrolízisét kénsav és burgonya diasztáz jelenlétében vizsgálva. Megállapította, hogy az anyagok a reakcióban nem vesznek részt, de nélkülük a reakció nem játszódik le. Az ilyen hatást, mint a kémia törvényeivel összeegyeztethetlent, katalitikus hatásnak nevezte. 1878-ban Kühne élesztőkkel kísérletezve enzimeknek, élesztőből származóknak nevezte el az élő szervezetekben található katalitikus hatású anyagokat [Keleti, 1978]. Büchner 1897-ben végzett kísérleteket, melyekkel *in vitro* bebizonyította, hogy a katalitikus hatás nem az élő szervezet, hanem valamilyen anyag tulajdonsága.

A reakciót katalizáló enzimen kívül a reakció közege is jelentős hatással van az ilyen rendszerekre. A reakció típusok aszerint, hogy milyen közegben játszódnak le, két csoportba sorolhatóak [Davison, 1997]:

- A *konvencionális* eljárások azok, amelyekben az enzim, a szubsztrát és a termék is vizes fázisban van jelen. A kezdeti kutatások erre a reakcióközegre irányultak és az ipari alkalmazások többsége is ebbe a kategóriába sorolható.
- A *nem-konvencionális* eljárások közé azok a folyamatok sorolhatóak, melyek nem az előbbi kategóriába tartoznak, ahol a reakció közege nem a víz, hanem pl.:
 - szerves oldószer,
 - ionos folyadék,
 - szuperkritikus folyadék.

A biokatalitikus reakciórendszerek leírására egy 3 karakterből álló jelölés szolgál. Az egyes betűk a kritikus reakciókomponenseket: az enzimet, a szubsztrátokat és a termékeket

szimbolizálják a megadott sorrendben. Az egyes betűk jelentése a következő: a rendszer lehet vizes (A), szerves (O), gőz (V) vagy szuperkritikus (Sc) fázisban. A kritikus reakciókomponensekre vonatkozó további információkat a nagybetűkhöz kapcsolt indexjelölés közli. I index utal arra, hogy a komponens rögzített állapotban van, H jelöli az enzim hidratáltságát (vízburok), az S index pedig a szilárd halmazállapotra vonatkozik.

I. hagyományos közeg AAA

II. nem-konvencionális közeg

A. nem-vizes közeg O⁻⁻, O_H⁻⁻, O_I⁻⁻

1. Csekély vizes fázis OAA,OAV,OAD,OVA,OOA
2. Szerves és gőz fázis OOV,OVO
3. Csak szerves fázis OOO
4. Gőz fázis OVV

B. nem-hagyományos vizes reaktor A—

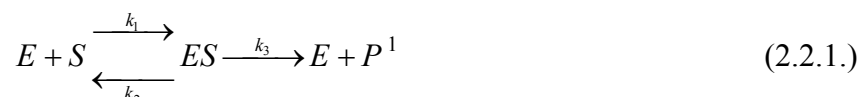
1. Kétfázisú rendszerek AAO,AOO,AOA
2. Gőz fázis AAV,AVA,AVV
3. Multi-fázis AOV,AVO
4. Speciális esetek A₁A₂A₃

C. szuperkritikus közeg O_HOO, ScScSc

A speciális esetek közé sorolható az ionos folyadék, amiben csak 2000-ben végezték el az első enzimes reakciót.

2.2. Enzimkinetika

Az enzimkatalizált folyamatokat tanulmányozva hamar kiderült, hogy a reakció sebessége nem követi a másodrendű kinetikát [Brown, 1902]. Általánosan elfogadott leírást Michaelis és Menten 1913-ban tettek közzé. Enzim-szubsztrát komplex kialakulását feltételezték Henri nyomán [Henri, 1902] az alábbi mechanizmus szerint:



Feltételezték, hogy a reakció sebességét (a termékképződés sebességét) az enzim-szubsztrát komplex bomlása határozza meg, azaz:

$$v_0 = k_3 [ES] \quad (2.2.2.)$$

Ez akkor igaz, ha a három sebességi állandó közül k_3 a legkisebb. Kifejezték a reakcióelegyben levő szabad enzimkoncentrációt, az enzim-szubsztrát komplex disszociációs állandóját felhasználva:

$$[E] = \frac{K_s [ES]}{[S]} = [E]_T - [ES] \quad (2.2.3.)$$

A reakció sebessége akkor éri el maximumát, ha az összes enzim enzim-szubsztrát komplex formában fordul elő. Ekkor az alkalmazott szubsztrátkoncentráció végtelen nagy. Vagyis a kezdeti reakciósebesség v_0 és a maximális sebesség V_{\max} megfelel $[ES]$ és $[E]_T$ arányának.

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_s + [S]} \quad (2.2.4.)$$

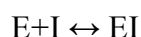
Ez a leírás vált szinte minden további enzimkinetikai megoldás alapjává, bár számos igen korlátozó megszorítást tartalmaz. Ezen túl további problémát jelent a modell kísérleti alkalmazásánál a kezdeti reakciósebesség mérése, meghatározása. Különösen, ha a közvetlen mérési módszerek nem alkalmazhatóak.

¹ A reakciósebességi állandókat kizárólag pozitív indexekkel jelölöm, páratlan számokkal a balról jobbra hatókat (a reakciót a termékképződés irányába vivők), páros számokkal az ellentétes irányúakat.

2.3. Inhibíciós kinetikák

Az előző példában csak az enzim és a szubsztrát vett részt a reakcióban, természetesen ilyen „tisztá” helyzetek csak ritkán fordulnak elő (pl. oldószermentes reakció kezdeti pillanata). Ha az enzimhez, az enzim-szubsztrát komplexhez más anyag is képes kötődni, és a kötődés által az enzim, enzim-szubsztrát komplex tulajdonságai megváltoznak, specifikus gátlások alakulhatnak ki.

Enzimkinetikai értelemben gátlásnak csak az enzim, vagy az enzim-szubsztrát komplex részvételével lejátszódó folyamatokat nevezzük (enzim gátlás, inhibíció). A gátló anyagokat a kapcsolódási helyük szerint csoportosíthatjuk. Eszerint megkülönböztetünk az enzim aktív centrumához vagy más kötőhelyre (kompetitív, nem kompetitív) és az enzim szubsztrát komplexhez kötődő (unkompetitív) inhibitorokat. A kompetitív gátlás leírására a Michaelis-Menten kinetikát a legegyszerűbb esetben az alábbi lépéssel egészítik ki [Fromm, 1975]:



Itt I a gátló anyagot, az inhibitor jelöli, amely reverzibilis módon kötődik az enzimhez. Felírhatjuk K_M -el analóg módon az enzim-inhibitor komplex disszociációs állandóját K_I -t ($K_I = [E][I]/[EI]$), bevezetve az inhibitor jelenlétében kialakuló relatív sebességet:

$$\frac{v_i}{V} = \frac{[ES]}{[E]_{\text{össz.}}} \quad (2.3.1.)$$

Ami kifejezhető az enzim anyagmértékét felírva ($[E]_{\text{össz.}} = [E] + [ES] + [EI]$):

$$v_0 = \frac{V_{\max} S}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + S} \quad (2.3.2.)$$

A fenti mechanizmus szerint lejátszódó *termékinhibíció* esetén is alkalmazható az összefüggés, - például a glükózt eredményező enzimes keményítő hidrolízisnél -, ilyenkor a gátló inhibitor helyett a termék koncentrációját kell alkalmazni.

2.4. Az összetett enzimes reakciók fajtái

Az enzimek által katalizált reakciókat sokféle szempont szerint lehet csoportosítani (az enzim típusa, felhasználás, eredet, in vivo, in-vitro stb.), azonban ha mint kémiai reakciókat tekintjük őket, akkor a két legelterjedtebb az Alberty és a Cleland-féle csoportosítás:

Alberty két szempont szerint osztotta be az enzimreakciókat:

1. a reakció sztöchiometriája szerint,
2. a reakció folyamán kialakuló komplexek száma és jellege alapján.

A reakció sztöchiometriája itt azt jelzi, hogy az enzimen kívül hány, sztöchiometrikus viszonyok szerint reagáló szubsztrát szerepel a reakcióban.

Egy szubsztrátos reakció esetén az enzim hatására egy anyag alakul át egy végtermékké. Ilyenek a tautomerázok, egyes izomerázok, racemázok stb. által katalizált reakciók.

Látszólag egy szubsztrátos reakciónak nevezik azokat, melyekben ugyan két szubsztrát vesz részt, az egyik azonban a víz, melynek koncentrációja – a hagyományos vizes rendszerekben – végtelen nagy, vagyis a reakció folyamán állandó lévén nem szerepel a sebességi egyenletekben. Ilyen pl. a fumaráz, az aktokináz, akrotonáz, az enoláz, a dehidrázok, hidrolázok stb. által katalizált reakciók.

Két szubsztrátos reakció esetén két anyag alakítja kölcsönösen át egymást az enzim katalitikus hatására. Ide tartozik majdnem minden koenzimmel működő enzim és számos más enzim által katalizált reakció: a dehidrogenázok nagyobb része, foszforilázok, hexokináz, foszfatázok stb.

A három szubsztrátos reakciókhoz tartoznak a különböző szintetázok, transzaminázok, a *Lactobacillus* piruvátoxidáza stb. által katalizált reakciók.

A fent említett típusok mind a két irányban azonos sztöchiometriájú reakciók.

Vegyes sztöchiometriájú reakciónak nevezzük azokat, melyek egyik irányban más sztöchiometriájúak, mint a másik irányban. Így pl. a különböző észterázok által katalizált reakciók egyik irányban látszólag egy, másik irányban két szubsztrátosak. E módon reagál az

acetilkolinészteráz hatására az acetilkolin a vízzel. Ez utóbbi koncentrációja a reakció szempontjából „végtelen”, így ebben az irányban a reakció látszólag egy szubsztrátos.

A Cleland-féle nomenklatura szerint a reagáló szubsztrátok illetve a termékek számának jelölése uni, bi, ter, quad. Egy olyan reakció tehát, melyben két szubsztrát és két termék vesz részt bi-bi-nek tekinthető. Ilyen a lipázzal történő enzimatis észterezés is. A lehetséges mechanizmusok bi-bi reakcióknál a 2.4.1. ábrán láthatóak [Keleti, 1978].

A rendezett (ordered) bi-bi mechanizmus szerint először mindkét szubsztrát meghatározott sorrend szerint kötődik az enzimhez, majd szintén meghatározott sorrend szerint leválik az egyik termék, majd a másik.

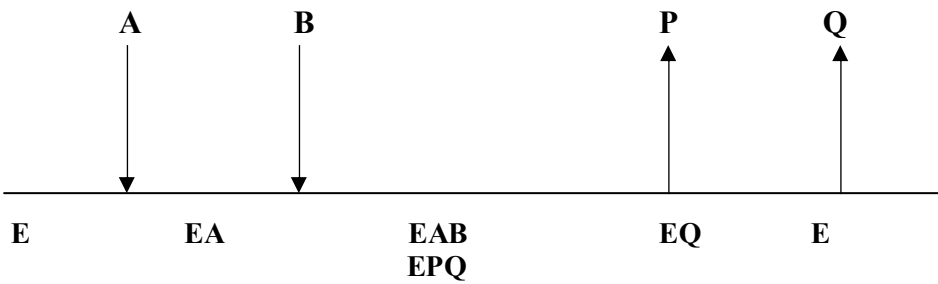
A ping-pong bi-bi mechanizmusnál az egyik szubsztrát kötődését követően rögtön leválik az egyik termék, majd a másik szubsztrát kötődik az enzimhez, s végül leválik a másik termék.

A Theorell-Chance mechanizmus olyan reakciósémát ír le, ahol a második szubsztrát kötődése és az első leválása gyakorlatilag egyidejűleg következik be, így nem tud kialakulni enzim-szubsztrát komplex.

A random bi-bi mechanizmusnál nincs meghatározott sorrendhez kötve az egyes szubsztrátok kötődése illetve a termékek leválása, hanem véletlenszerűen történhetnek meg ezek a folyamatok.

Annak eldöntésére, hogy a bi-bi mechanizmusok közül melyik érvényes az adott enzim reakciónál, a klasszikus grafikus eljárásokat célszerű első lépésben alkalmazni [Keleti, 1978]. A dupla reciprok módszerrel kapott $1/\text{sebesség} - 1/\text{szubsztrát koncentráció}$ egyenesek számos esetben – de nem mindig – elárulják a mechanizmust. Ha pl. a különböző kiindulási koncentrációnál kapott reciprok egyenesek párhuzamosak, a ping-pong bi-bi mechanizmus valószínűsíthető. Ha viszont egy közös pontban metszik egymást, akkor a rendezett mechanizmus tűnik érvényesnek. Ha nem egyeneseket kapunk, nagy valószínűséggel gátlások léptek fel. Ilyen esetekben a grafikus módszerek alkalmazása nem nyújt megfelelő támpontot.

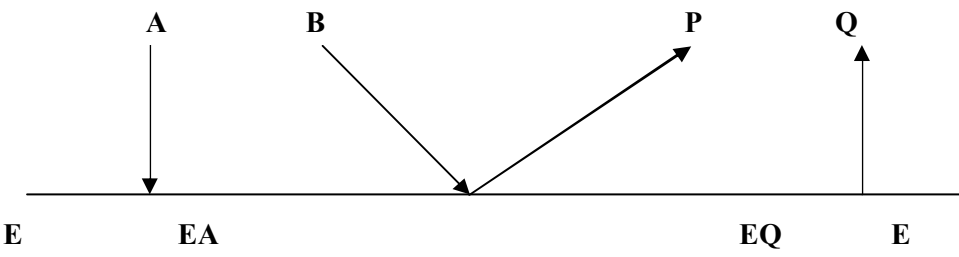
RENDEZETT BI-BI MECHANIZMUS



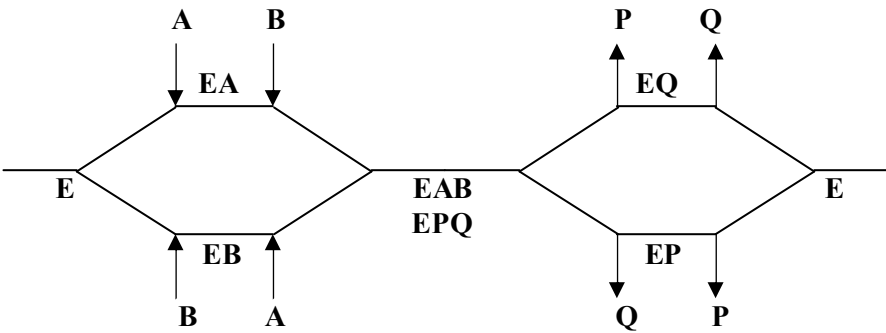
PING-PONG BI-BI MECHANIZMUS



THEORELL-CHANCE MECHANIZMUS



RANDOM BI-BI MECHANIZMUS

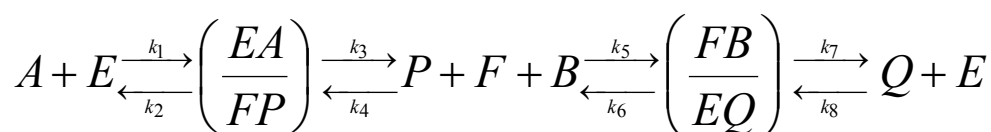


2.4.1. ábra: A bi-bi reakciók mechanizmusai

2.5. A ping-pong bi-bi mechanizmus

A lipázos észterezésekkel foglalkozó irodalomban a ping-pong bi-bi mechanizmust tartják a legvalószínűbbnek [Chulalaksananukul, 1990; Bousquet-Dubouch, 2001], bár néhány adat található az ordered útra is, ahol a víz lehet az elsőként leváló termék [Garcia 1999].

A ping-pong bi-bi mechanizmust a 2.5.1. ábrán bemutatott sebességi állandók szemléltetik.



2.5.1. ábra: A ping-pong bi-bi reakció mechanizmusa Cleland szerint

Mint látható, első lépésként a szabad állapotú enzimvel egyensúlyi folyamatban az A-val jelölt szubsztrát reagál, és így kialakul az EA jelű enzim-szubsztrát átmeneti komplex. Az átmeneti komplex belső átrendeződéssel (ami szintén megfordítható folyamat, sebessége azonban nem összemérhető az egyes elkülönített nyíllal jelölt lépésekével), FP jelű módosult enzim-termék komplex formába alakul át. A termék elválik az enzim aktív centrumától, és szabad állapotba, az oldatba kerül, k_3 sebességi állandónak megfelelően. Az így visszamaradó módosult enzim (F) a B-val jelölt szubsztráttal reagál, létrehozva az FB-val jelölt módosult enzim-szubsztrát komplexet. A módosult enzim szubsztrát-komplexből - az EA \rightarrow FP átalakuláshoz hasonlóan - létrejön az EQ enzim-termék komplex. A Q jelű termék k_7 sebességgel keletkezik és távozik az enzim felületéről. A folyamat végén a szabad enzim eredeti állapotában k_8 sebességgel reagálhat egy Q termékkel, vagy k_1 sebességgel az A szubsztráttal.

Az egyes lépéseket összegezve felírható a termékképződés sebessége, amelyben az összes sebességi együttható szerepel, a reakciót a jobb oldal felé vivők pozitív, míg a bal oldal felé hatók negatív előjellel. A termékképződés sebessége az állandókon túl függ a kezdeti enzimkoncentrációtól (E_0), a szabad enzim pillanatnyi koncentrációjától (E), a kialakult módosult enzim-termék és szubsztrát komplexek aktuális koncentrációjától, valamint a termékek és a szubsztrátok koncentrációjától. Az összefüggést a 2.5.1. képlet írja le.

$$v = \frac{(k_1 k_2 k_5 k_7 AB - k_2 k_4 k_6 k_8 PQ) E_0}{E + (EA + FP) + F + (FB + EQ)} \quad (2.5.1.)$$

Ennyi önálló paramétert meghatározni és kezelni nem célszerű a reakció leírásához. Az enzim komplexek koncentrációjának meghatározása sokszor nem megoldható, vagy meghatározásuk zavarja a reakciót. Érdemes felírni a sebességet befolyásoló önálló tagokat, determinánsokat és összefüggéseiket a sebességi együtthatókkal.

$$\begin{aligned} E &= k_5 k_7 B(k_2 + k_3) + k_2 k_4 P(k_6 + k_7) \\ (EA + FP) &= k_1 k_5 k_7 AB + k_1 k_4 AP(k_6 + k_7) + k_4 k_6 k_8 PQ \\ F &= k_1 k_3 A(k_6 + k_7) + k_6 k_8 Q(k_2 + k_3) \\ (FB + EQ) &= k_1 k_3 k_5 AB + k_5 k_8 BQ(k_2 + k_3) + k_2 k_4 k_8 PQ \end{aligned} \quad (2.5.2.)$$

A termékképződés sebességét oly módon is le lehet írni, hogy abban közvetlenül nem szerepelnek az átmeneti enzim komplexek, hanem a termékek és a szubsztrátok között kialakuló egyensúlyi állandóként vannak értelmezve. Ezeket az állandókat reakciókinetikai paraméternek nevezzük. A ping-pong bi-bi mechanizmusra érvényes általános összefüggést a 2.5.3. képlet írja le.

$$v = \frac{V_1 V_2 \left(AB - \frac{PQ}{K_{eq}} \right)}{V_2 K_b A + V_2 K_a B + V_2 AB + \frac{V_1 K_q P}{K_{eq}} + \frac{V_1 K_q Q}{K_{eq}} + \frac{V_1 PQ}{K_{eq}} + \frac{V_1 K_q AP}{K_{ia} K_{eq}} + \frac{V_2 K_a BQ}{K_{iq}}} \quad (2.5.3.)$$

A képletben szereplő egyes állandókat Cleland alapján a 2.5.1. táblázatban foglaltam össze.

2.5.1. táblázat: A 2.5.2. egyenletben szereplő kinetikai paraméterek

$V_1 = \frac{k_3 k_7 E_0}{(k_3 + k_7)}$	$V_2 = \frac{k_2 k_6 E_0}{(k_2 + k_6)}$
$K_a = \frac{k_7 (k_2 + k_3)}{k_1 (k_3 + k_7)}$	$K_q = \frac{k_2 (k_6 + k_7)}{k_8 (k_2 + k_6)}$
$K_b = \frac{k_3 (k_6 + k_7)}{k_5 (k_3 + k_7)}$	$K_p = \frac{k_6 (k_2 + k_3)}{k_4 (k_4 + k_7)}$
$K_{ib} = \frac{k_3}{k_5}$	$K_{ip} = \frac{k_3}{k_4}$
$K_{ia} = \frac{k_2}{k_1}$	$K_{iq} = \frac{k_7}{k_8}$

A reakció látszólagos egyensúlyi állandója K_{eq} , amely a jobbra és balra ható sebességi állandók hányadosa, Haldane szerint a 2.5.4. képlet szerint értelmezhető. A képletben a 2.5.1. táblázat reakciókinetikai paraméterei szerepelnek.

$$K_{eq} = \frac{k_1 k_3 k_5 k_7}{k_2 k_4 k_6 k_8} = \frac{K_{ip} K_{iq}}{K_{ia} K_{ib}} = \frac{V_1 K_{ip} K_q}{V_2 K_{ia} K_b} = \frac{V_1 K_p K_{iq}}{V_2 K_a K_{ib}} = \frac{V_1^2 K_p K_q}{V_2^2 K_a K_b} \quad (2.5.4.)$$

Az ismertett modell azonban túlságosan általános a gyakorlati felhasználáshoz. A sok paraméter nehezíti azok egyértelmű meghatározását, mivel kölcsönösen hatnak egymásra is. Különösen könnyű hibát elkövetni, ha az egyes paraméterek értéket nem lineáris regresszióval határozzák meg [Suelter, 1985].

Elméleti és gyakorlati megfontolások alapján felírhatjuk a fő paramétereket, amelyek a termékképződés sebességére hatnak:

1. A másodikként kötődő szubsztrát koncentrációja (B)
2. Az elsőként kötődő szubsztrát koncentráció (A)
3. Az enzim koncentrációja (E)
4. A keletkezett termékek együttes mennyisége (P)

Ha csak az első három tényezőt vesszük figyelembe, tekintettel arra, hogy a kezdeti reakciósebességre nem hat a keletkezett termékek koncentrációja, (mivel $t=0$ pillanatban $P=0$) a 2.5.5 egyenlet írja le a folyamatot, valamint ha figyelembe vesszük a szubsztrát gátló hatását is, a 2.5.6. egyenlettel írhatjuk le a kezdeti reakciósebességet.

$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]}} \quad (2.5.5.)$$

$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{K_A}{[A]} \left(1 + \frac{[B]}{K_{IB}}\right) + \frac{K_B}{[B]}} \quad (2.5.6.)$$

A 2.5.5 képletben látható négyparaméteres modellt tovább lehet bővíteni a teljes reakciót vizsgálva a termékek gátló hatásával. A bővített képlet a 2.5.7. alatt látható. Megfigyelhető, hogy tartalmazza a K'_{AB} paramétert, amely a látszólagos termékképződés sebessége, a reakció ping-pong paramétere. A képletben szereplő kinetikai paramétereket a 2.5.2. táblázatban foglaltam össze.

$$v = \frac{V_m}{1 + \left(\frac{K_A}{[A]} + \frac{K'_{AB} * [P]}{[A] * [B]}\right) \left(1 + \frac{[B]}{K_{IB}}\right) + \frac{K_B}{[B]} * \left(1 + \frac{[P]}{K_{iP}}\right)} \quad (2.5.7.)$$

$$K'_{AB} = \frac{(V_m * K_Q)}{(V_{m,r} * K_{eq})}$$

2.5.2. táblázat: A 2.5.7. egyenletben szereplő reakciókinetikai paraméterek definíciói

$V_m = \frac{k_3 k_7}{k_3 + k_7}$
$K_A = \frac{k_7(k_2 + k_3)}{k_1(k_3 + k_7)}$
$K_B = \frac{k_3(k_6 + k_7)}{k_5(k_3 + k_7)}$
$K'_{AB} = \frac{k_2 k_4(k_6 + k_7)}{k_1 k_5(k_3 + k_7)}$
$K_{iP} = \frac{k_3}{k_4}$
$K_{iB} = \frac{k_5}{k_6}$

Ha a termékek koncentrációja konstans, akkor az összefüggés a 2.5.8. formában írható fel. Az általam tervezett mérések kezdeti szakaszában ezzel az összefüggéssel lehet leírni a reakciót, mivel a rendszer tartalmaz vizet, ami az egyik termék (P), de koncentrációja a kezdeti időszakban, amikor a kezdeti reakciósebességre vonatkozó feltételek teljesülnek, nem változik.

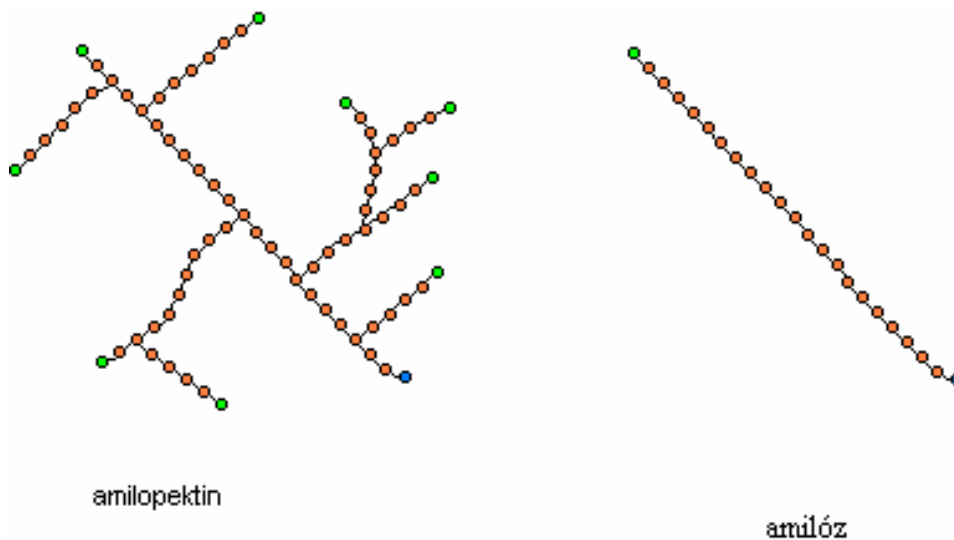
$$v = \frac{V_m}{1 + \left(\frac{K_A}{[A]} + \frac{K_{AB}}{[A]*[B]} \right) \left(1 + \frac{[B]}{K_{iB}} \right) + \frac{K_{BP}}{[B]}} \quad (2.5.8.)$$

Látható, hogy a négy (2.5.6.) és az öt (2.5.8.) paraméteres egyenlet között a fő különbség a K_{AB} tagban található. A K_{AB} tag értéke azonban akkor van jelentős hatással, ha mindkét szubsztrát koncentrációja alacsony. Ilyen nagyon alacsony szubsztrát koncentrációval azonban nem terveztem méréseket, ezért a reakció kezdeti szakaszában használható a négyparaméteres összefüggés a reakció kinetikájának leírására.

2.6. Keményítő enzimes hidrolízise

A keményítő a klorofilltartalmú növények asszimilációs termékéből, a glükózból épül fel és a növényi sejtekben a tartaléktápanyag szerepét tölti be. A keményítő α -D-glükóz-molekulák kondenzációja útján keletkezett poliszacharid, amelyben a glükózrészecskék 1,4-es és 1,6-os kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz.

A „keményítő” megnevezés tehát nem egyetlen, jól definiált összetételű molekulából álló vegyületet jelent, hanem poliszacharidok keverékét. A keményítő a növényi sejtekben különböző alakú és felépítésű, fehér, szilárd szemcsék formájában rakódik le. A szemcsenagyság néhány μm -tól 100-150 μm -ig változik. Mindazonáltal az azonos eredetű keményítőszemcsék mikroszkópi vizsgálattal jól felismerhetők és azonosíthatók, mert külső formájuk és felépítésük jellegzetes, és a szemcsenagyság eloszlása is jellemző arra a növényre, amelyből származnak.



2.6.1. ábra: A keményítő két frakciójának szerkezete

A természetes keményítőszemcsék két különböző (és egymástól el is választható) típusú keményítő frakciókból épülnek fel. Az egyik az ún. *amilóz*, másik az *amilopektin* (2.6.1. ábra). Az amilóz a szemcsék belsejében, az amilopektin pedig főleg a szemcsék külső rétegében rakódik le. Mindkettő α -D-glükózból épül fel. Az amilóz kizárólag 1,4- α -glükozid kötésekkel tartalmaz és molekulái vízben oldva döntően szabályos spirális alakúak (1 spirálmenet 6 glükózegységet foglal magába). Ezzel szemben az amilopektin molekulák

elágazó oldalláncokat is hordoznak, melyek úgy jönnek létre, hogy az óriásmolekulát felépítő glükózegységek némelyikén a 6-os szénatomhoz is kapcsolódik egy glükózmolekula. Az amilopektin kevés foszfort is tartalmaz foszforsavészter-csoportok formájában.

Az amilóz kémiai összetételére jó közelítéssel felírható a $(C_6H_{10}O_5)_n$ összegképlet. Az n (polimerizációfok) értéke amilóz esetében 1000 körül van. Ha eltekintünk a foszforsavészter-csoportoktól, a fenti képlet az amilopektinre is érvényes, és itt n értéke kb. 5000.

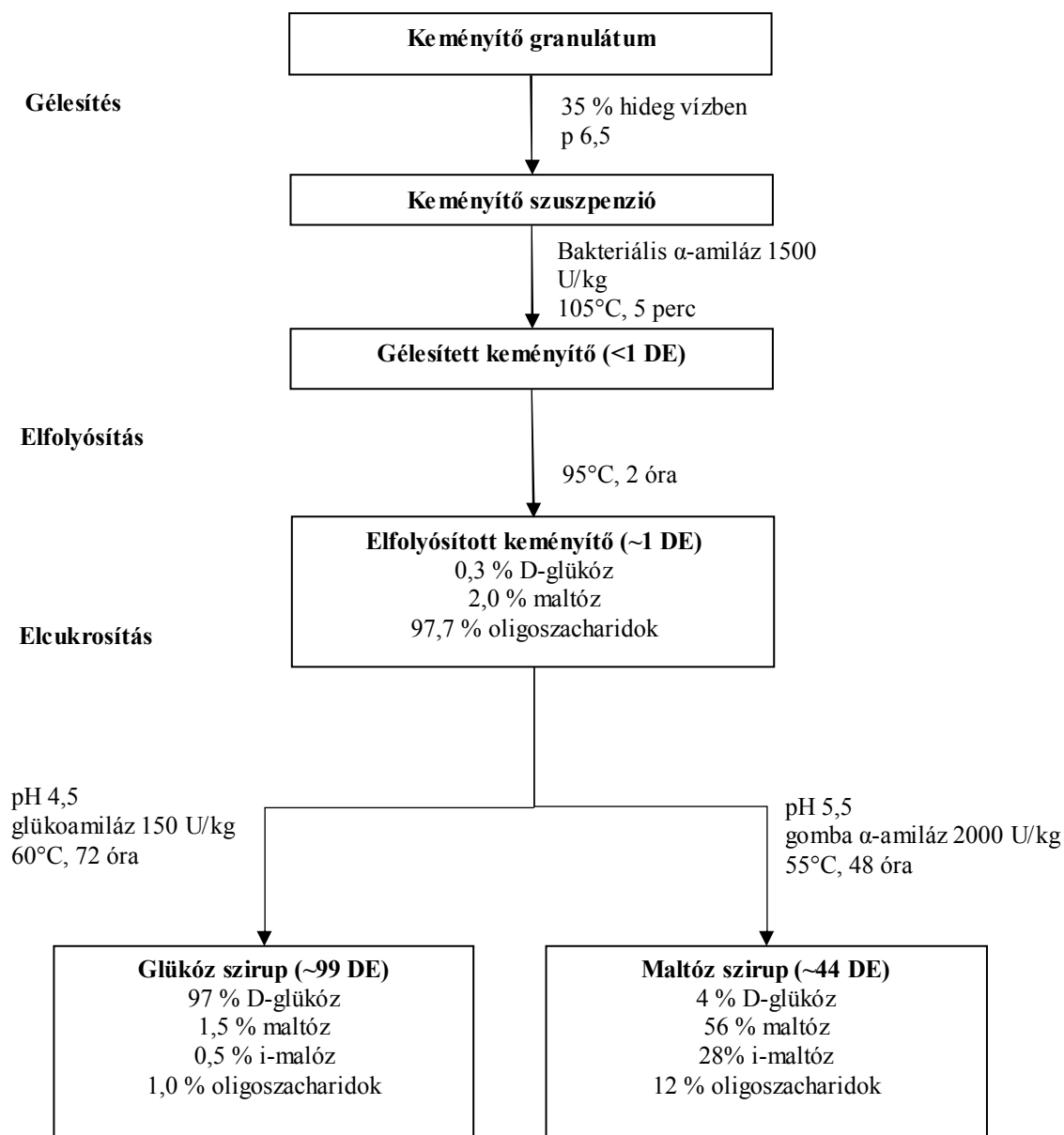
A keményítő számos ipari jelentőségű félkész termék nyersanyagául szolgál, így pl. dextrinek, keményítő szörpök, glükóz. Ezen termékek a keményítő részleges vagy teljes hidrolízisével állíthatók elő. A keményítő hidrolízisekor közbenső terméként a keményítőnél kisebb molekulatömegű poliszacharidok, ún. dextrinek keletkeznek, amelyek további hidrolízise kisebb molekulatömegű dextrinekhez, majd oligoszacharidokhoz, maltózhoz, végül pedig D-glükózhoz vezet.

2.6.1. táblázat: A keményítő hidrolízisben felhasznált enzimek.

enzim	EC besorolás	forrás	reakció
α -Amiláz	3.2.1.1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Kizárólag az 1,4 kötéseket bontja alfa dextrineket állítva elő főként maltózt és 3, 6 és 7-es fokszámú oligoszacharidokat
		<i>B. licheniformis</i>	Kizárólag az 1,4 kötéseket bontja alfa dextrineket állítva elő főként maltózt és 3, 4 és 5-ös fokszámú oligoszacharidokat
		<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. niger</i>	Kizárólag az 1,4 kötéseket bontja alfa dextrineket állítva elő főként maltózt és 3-as fokszámú oligoszacharidokat
Elcukrosító α -amiláz	3.2.1.1	<i>B. subtilis</i> (<i>amylosacchariticus</i>)	Kizárólag az 1,4 kötéseket bontja alfa dextrineket állítva elő főként maltózt és 3-as és 4-es fokszámú oligoszacharidokat valamint legfeljebb 50% glükózt
β -Amiláz	3.2.1.2	árpa csira	Kizárólag az 1,4 kötéseket bontja a nem redukáló oldal felől határ dextrineket és β -maltózt állítva elő
Glükoamiláz	3.2.1.3	<i>A. niger</i>	Az 1,4 és az 1,6 kötéseket is bontja a nem redukáló oldal felől β glükózt előállítva
Pullulanáz	3.2.1.41	<i>B. acidopullulyticus</i>	Kizárólag az 1,6 kötéseket bontja egyenes láncú maltodextrineket eredményezve

A keményítő hidrolízisét manapság már szinte kizárólag enzimes úton végzik, amilázok segítségével [Nagodawithana, 1993]. A szakaszos reaktorokban megvalósított enzimes lebontás – kétlépéses folyamat (2.6.2. ábra). Az első lépésben – elfolyósítás

(*liquefaction*) – a keményítőt vízben szuszpendálják és részlegesen hidrolizálják. A második lépésben – elcukrosítás (*saccharification*) – a keletkezett oligoszacharidokat bontják tovább. A folyamatokhoz főként α - és β -amilázt, illetve glükóamilázt alkalmaznak.



2.6.2. ábra: A keményítő hidrolízis lépései

A növények nagy részében α - és β -amiláz enzimet találunk. Az α -amiláz jelenlétében a keményítő dextrinekig hidrolizál. Ezzel szemben a β -amiláz jelenlétében a keményítő- és a

dextrinmolekulák végeiről maltózmolekulák hasadnak le. Így a természetes keményítő enzimés hidrolízise legfeljebb 70-80 %-os kitermeléssel hajtható végre, mivel az amilopektinből maltóz mellett nehezen hidrolizáló, ún. határdextrinek vagy maradékdextrinek is keletkeznek. Ezek az amilopektin molekula olyan részeiből maradnak vissza, melyekben 1,6-kötés van két glükózrész között, ezt a kötést pedig az amiláz nem ill. csak nagyon lassan bontja.

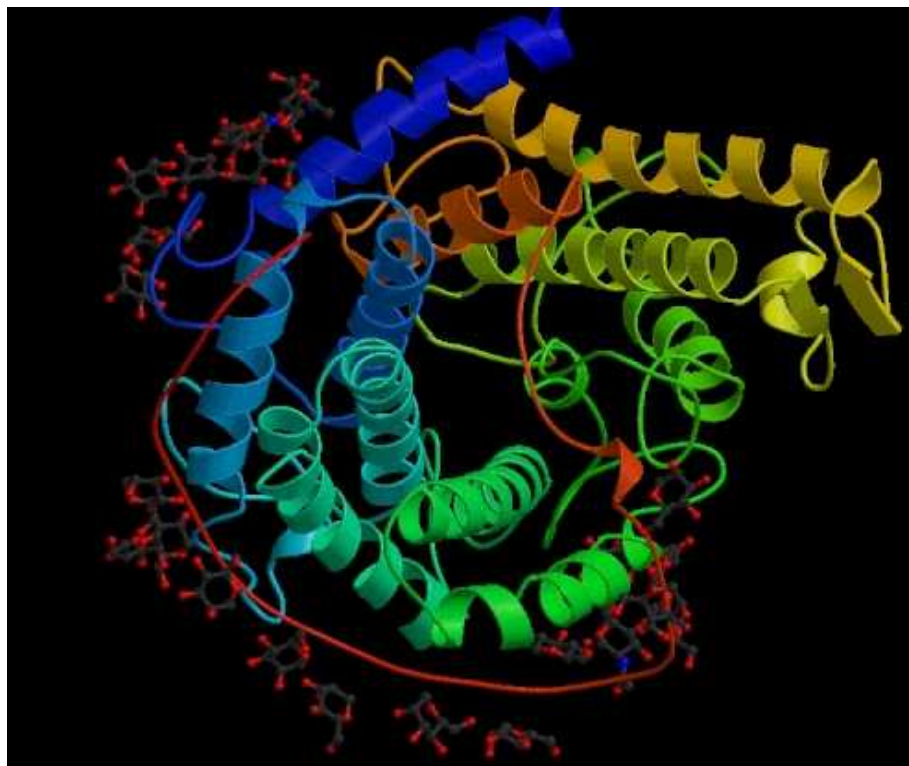
A *glükoamiláz* (E.C. 3.2.1.3. α -1,4-glucan glucohydrolase) azért jelentős, mert mindkét kötésfajtát képes bontani, így a keményítő mindkét frakciójának hidrolízise megvalósítható.

A glükoamiláz működése során a keményítő nem-redukáló láncvégéről hasít le glükóz egységeket [Tucker, 1995], így egyrészt glükóz, másrészt egyre kisebb lánchosszúságú maltodextrin molekulák képződnek: a polimer degradációjának végső periódusában maltohexaóz, -pentaóz, -tetraóz, -trióz, maltóz és végül itt is két glükóz.

A keményítő bontás során az α -amilázos elfolyósítás igen gyors folyamat, mely akár néhány perc alatt 105 °C-on megvalósítható. Gondot okoz azonban, hogy a glükoamilázoknak a termikus aktivitása sokkal kisebb, ezért az oldatot le kell hűteni közel 50 °C-ra és ott végrehajtani a cukrosítási folyamatot, s maga a hidrolízis is lassú folyamat, nem ritkán 48-72 óra tartózkodási időt is alkalmaznak. A Brit Nemzetközösségi Gombakutató Központ (Commonwealth Mycological Institute) már a nyolcvanas évek végén kezdett a glükoamiláz termelő *Aspergillus awamori* törzsekkel foglalkozni, azok relatíve magas termikus stabilitása miatt, azonban aktivitásuk elmaradt az *Aspergillus niger* törzsekétől. Jelenleg az *Aspergillus awamori* genetikai módosítását általában a termikus stabilitás növelése érdekében végzik, bár így aktivitása általában még tovább csökken.

A kísérleteimben is használt 2B. 361 U2/1 módosulat előállításánál azonban nem a termikus stabilitás növelése, hanem a glükoamiláz aktivitás emelése volt a cél, ezért *Aspergillus niger* törzsek genetikai állományát használták fel az előállítás folyamán. A kutatók célul tűzték ki gabonából történő alkohol termelő fermentációkban való használhatóságát is, ezért számukra a proteínbontó aktivitás nem hátrány, hanem előny volt a törzs fejlesztése során. Az előállított törzset azóta már a kutatóközpont értékesítette is, jelenleg az ABM Chemicals kereskedelmi termékeként forgalmazzák [Koutinas, 2003], elsősorban a malomipar számára.

A glükóamilázt sokféle mikroba képes előállítani, az egyik legígéretesebb ezek közül napjainkban az *Aspergillus awamori* törzs, amely extracelluláris úton termeli a glükóamiláz enzimet, így kinyerése egyszerűen centrifugálással történhet. Az enzim szerkezetét a 2.6.3. ábra mutatja.



2.6.3. ábra: Az *Aspergillus awamori*-ból kivont glükóamiláz szerkezete

Szerkezetileg az enzimet egyetlen lánc alkotja, amely 471 aminosavból áll [Aleshin, 1994]. A fehérjelánc 13 jobbra csavarodó α -hélixből épül fel, amint az az ábrán is látható. Az egyes hélixek 9-23 aminosavat tartalmaznak. Ligandumként N-acetil-D-glükózamin (NAG) és α -D-mannóz (MAN) molekulák (összesen 14) kapcsolódnak a fehérjéhez. Ezek szerepe a fehérje stabilizálása.

A napjainkban folyó glükóamilázos kutatások célja újabb, nagyobb aktivitású glükóamilázt termelő mikroorganizmusok előállítása genetikai módszerekkel. Az így kapott enzimek stabilitása azonban még további javításra szorul. A stabilitás is növelhető genetikai módszerekkel, amire jó példát mutat be Nielsen, aki 10 órától 48-ra növelte a glükóamiláz készítmény aktivitásának felezési idejét [Nielsen, 2002].

A keményítő glükóamilázos hidrolízisének a legnagyobb problémát a termék-inhibíció jelenti [Moreira, 2004]: a képződő glükóz és alacsony polimerizációs fokú oligomerek, egy adott koncentráció fölött gátolják a reakciót. Az inhibíció kompetitív típusú, leírására a 2.3. fejezetben bemutatott összefüggés alkalmas. A kis méretű termékeket tehát célszerű folyamatosan eltávolítani a rendszerből. Ehhez pl. membránszeparációt, illetve azon belül is az ultraszűrést érdemes használni [Giorno, 2000].

A makromolekulák enzimikus hidrolízise során a hosszú szénláncú, nagy molekulatömegű szubsztrátot kis méretű vegyületté bontják le, amely gyakran inhibíciót okoz. Ultraszűrő modul segítségével membrán-bioreaktorban megvalósítva a reakciót [Drioli, 1999] a méret szerinti szeparáció alapján működő pórusos membrán egyrészt visszatartja a szubsztrátot és az enzimet, másrészt képes elválasztani az inhibíciót okozó terméket. Ez a fajta folyamat azt igényli, hogy a szubsztrát és a biokatalizátor közvetlenül érintkezessen, amihez a biokatalizátort a membránnak arra az oldalára kell rögzíteni, ahol a szubsztrát áramlik, illetve rögzítés nélkül, egyszerűen a szubsztrátot tartalmazó oldatba keverve is működtethető a rendszer [Gan, 2002].

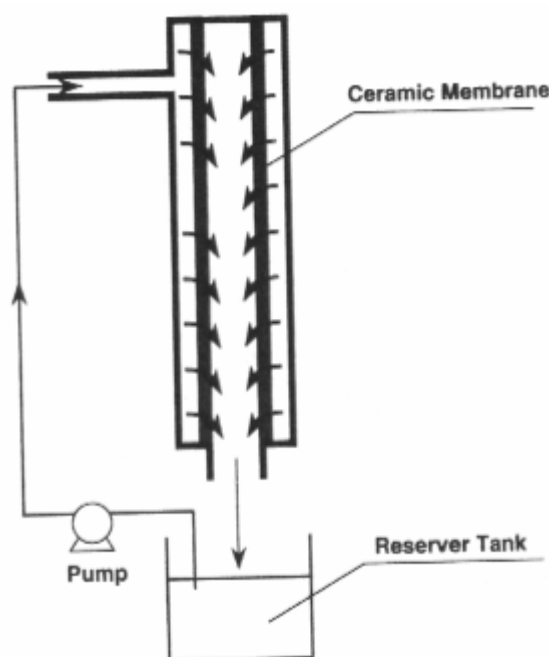
A keményítő és származékainak enzimikus lebontását már többféle, ultraszűrő modullal megépített membrán bioreaktorban leírták. Az egyik első megoldást Tachauer [Tachauer, 1974] ismerteti, ahol árpa malátából nyert α - és β -amilázt használtak szabad állapotban, s 18 kDa vágási értékű ultraszűrő membránt alkalmaztak csőmembrán modulban. Szubsztrátként tiszta keményítőt használtak, és megállapították, hogy a membrán visszatartja az alkalmazott enzimeket és a permeátumban főként glükóz, illetve annál átlagosan 2,5-szer nagyobb molekulásúlyú oligomerek találhatók. A reaktor termelékenységét hagyományos kevert szakaszos megoldásokéval összehasonlítva megállapították, hogy csak alacsony szubsztrátkoncentráció esetén versenyképes a membrán reaktor alkalmazása.

Jóval kisebb (5 kDa) cut off -fal rendelkező membránt használtak spanyol kutatók [Lopez-Ulibarri, 1997]. Ők egy *Aspergillus niger* törzs által előállított glükóamilázt alkalmaztak szabad enzimként hollow fiber modulban. Poliszacharid forrásként manióka lisztet használtak, és termékként 99,9 %-ban tiszta glükózt nyertek a permeátumban.

Hasonló szubsztráton végeztek kísérleteket Paolucci-Jeanjean és munkatársai [Paolucci-Jeanjean, 2000] *Bacillus licheniformis*-ből izolált α -amilázt használva egy 50 kDa vágási értékű Carbosep membrán modulban. Vizsgálták a permeátumba kerülő oligomerek polimerizációs fokát, megállapítva, hogy 1-10 glükóz egységes oligomerek közül mindegyik

közel azonos arányban előfordult, a szerzők ezt a nagyobb pórusméretű membrán alkalmazásával magyarázták.

Említést érdemelnek Ida eredményei, aki *Aspergillus niger*-ből izolált glükóamilázt használt 1,6 µm pórusméretű kerámia membránhoz rögzítve (2.6.4. ábra). A rögzítés előtt a kerámia felületét plazmával módosították a nagyobb hatékonyság érdekében [Ida, 2000]. A speciális rögzítés ellenére nem volt kimutatható növekmény a hagyományos megoldásokhoz képest.



2.6.4. ábra: Az ultraszűrő modul alkalmazása keményítő enzimes hidrolízisénel [Ida, 2000]

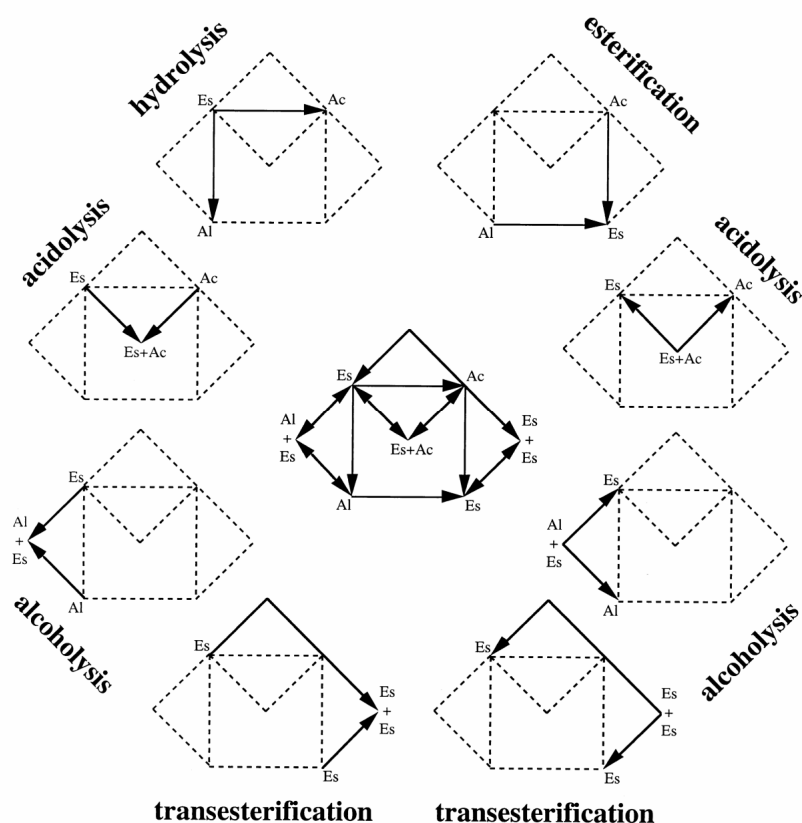
*Aspergillus awamori*t még nem alkalmaztak eddig, pedig célszerű volna, hiszen igen jó glükóamiláz aktivitással rendelkeznek. A membrán bioreaktor kialakításánál az áttekintett szakirodalmak alapján az ultraszűrő membrán pórusmérete fontos szerepet játszik. Úgy tűnik, mindenképpen kompromisszumot kell kötni: vagyis ha kis pórusméretű membránt alkalmazunk, tiszta glükóz oldatot kaphatunk ugyan, de a permeáció sebessége igen kicsi lesz, következésképpen a produktivitás csökken.

A keményítő glükóamilázos hidrolízisének gyakorlati alkalmazását – mint célt szem előtt tartva a rendelkezésre álló szakirodalmi adatok alapján megállapítható, hogy a folyamat ultraszűrő membrán bioreaktor segítségével megvalósítható és jól megválasztott üzemeltetési paraméterekkel hatásfoka a hagyományos eljárásokénál nagyobb.

2.7. Lipázos reakciók, észterezés

Az ipari biokatalízis egyik legjelentősebb enzimszoportja a lipázok. A karboxil észter hidrolázok közé tartozó triacilglicerol hidrolázok (E.C. 3.1.1.3) családját nevezzük összefoglalóan lipázoknak. Az élő szervezetekben általában a nehezen oldódó triglicerideket alakítják át jobban oldódó, így könnyebben felhasználható zsírsavakká és glicerinné.

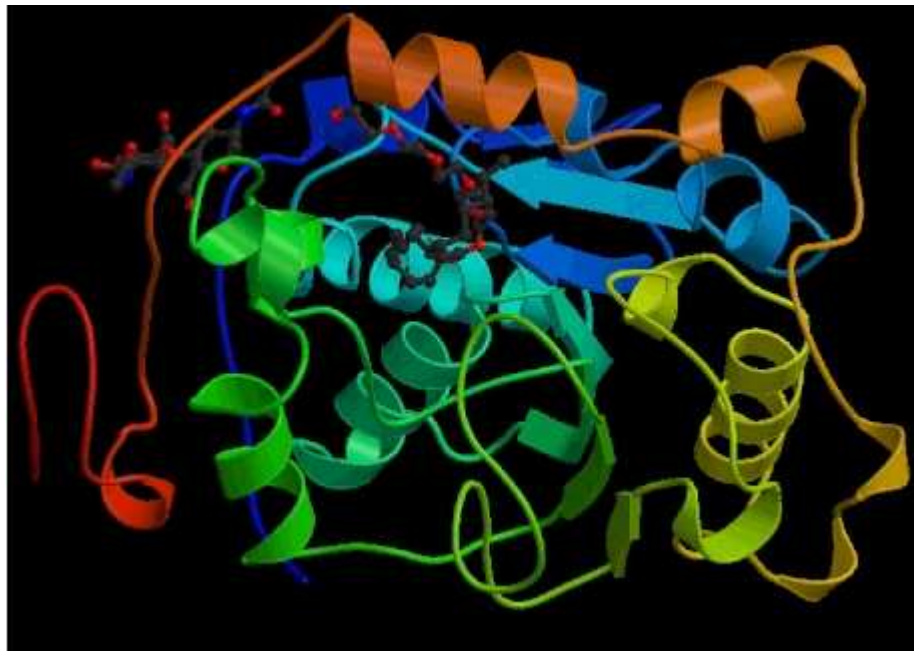
A lipázok mint tökéletes katalizátorok bizonyos körülmények között a fordított irányú reakciót is katalizálják. Felhasználásukat is ez a széles reakció-választék teszi lehetővé. A 2.7.1. ábrán láthatóak a lipáz által katalizált reakció utak [Paiva, 2000].



2.7.1. ábra: A lipáz által katalizált reakció utak [Paiva, 2000]

A lipáz enzim igen sokféle forrásból nyerhető ki, növényi, állati és mikrobiális szervezetből egyaránt különítettek el enzimeket. Szerkezetvizsgálatokkal megállapították, hogy a különböző forrásból nyert lipázok formája, mérete igen változatos. A 2.7.2. ábrán a

méréseim során alkalmazott *Candida antarctica* lipáz szerkezetét mutatom be [Uppenberg, 1994].



2.7.2. ábra: A *Candida antarctica* lipáz felépítése [Uppenberg, 1994]

Ezt a lipáz enzimet 342 aminosav építi fel, fontos szerkezet-stabilizáló eleme a 47. és a 89. aminosav közötti S-S híd, valamint a 99. aminosavhoz kapcsolódó N-acetil-D-glükózamin (NAG) molekula. Aktív centrumát a Ser – Asp – His triád alkotja [Uppenberg, 1994].

A lipázok aktivitását jelentősen befolyásolja negyedleges szerkezetük, három dimenziós alakjuk. Az alak kialakítását pedig legnagyobb mértékben a környezet víztartalma határozza meg. Savak és alkoholok észterezése során az észter mellett víz is képződik, ez így a termék általános hatásain túl is hat az enzimre, az enzimstruktúrát befolyásolja a nem-kovalens kötések keresztül és a hidrogénkötések felszakítása által; a reagensek diffúzióját elősegíti; és a reakcióegyensúlyt befolyásolja. A túl alacsony víztartalom általában csökkenti az enzimaktivitást. A magas víztartalom szintén csökkentheti a reakciósebességet. Az optimális vízmennyiség gyakran egy szűk tartományban van.

A lipáz enzimmel nem konvencionális közegben lejátszódó észterezés alkalmas mind rövid és közepes molekula tömegű észterek, mind hosszabb szénláncú, többértékű észterek szintézisére. Alkalmazható kis molekula tömegű észterek előállítására rövid szénláncú savak

és alkoholok felhasználásával. Így állíthatóak elő az illékony aromaészterek, melyek fontos élelmiszeripari segédanyagok [Bélafi-Bakó, 2003].

Nagy molekula tömegű észterek előállítását is vizsgálták lipáz enzim segítségével, szerves oldószerekben, hosszú szénláncú alkoholokat és szintén hosszú szénláncú savakat alkalmazva szubsztrátként. Halling - aki a zsírsavak és zsíralkoholok észterezését tanulmányozta n-hexánban, *Candida rugosa* lipázzal - az ilyen reakciókat, kinetikai szempontból vizsgálva a bi-bi ping-pong mechanizmus szerinti csoportba sorolja [Halling, 1994]

Eltérő méretű szubsztrátok észterezését is régóta sokan vizsgálták szerves oldószerben pl. különböző rövid szénláncú savak (tejsav) és zsíralkoholok észtereinek előállítását, amelyeknek fontos élelmiszeripari felhasználása van [Kiran, 2001].

Hosszú szénláncú savak, zsírsavak rövid szénláncú alkoholokkal lejátszódó lipáz enzimmel katalizált észterezését azonban jóval kevesebb esetben tanulmányozták. Ezek közül, nagyságrendjüknek köszönhetően, a biodízelle vagyis a metanol zsírsav észtereire összpontosul a legnagyobb figyelem [Shimida, 2002].

Pedig a zsírsavak rövid szénláncú alkoholokkal alkotott észtereinek, számos különböző ipari alkalmazási lehetőségük van [Allen, 1996]. Az olajsav az egyik legfontosabb zsírsav a természetben, növényi olajokból gyártható, propanollal, butanollal és más hasonló alkohollal képzett észterei kenőanyagként alkalmazhatók. A környezetbarát módon gyártott tiszta és természetes kenőanyagok egyre nagyobb figyelmet érdemelnek, mivel nem tartalmaznak toxikus anyagot és biológiailag lebonthatók.

A kozmaolaj szeszipari lepárlási melléktermék, átlagos összetétele: 10 % etanol, 13 % n-propanol, 15 % i-butanol, 51 % i-amil-alkohol, 11 % egyéb alkohol és víz. Manapság a kozmaolajat elégetik, hogy fedezze a desztilláció energiaigényét. A kozmaolaj olajsavval való észterezését kénsav katalizátorral török kutatók tanulmányozták és biokenőanyagot gyártottak ipari célokra [Özgülsün, 2000]. Ez az eljárás azonban nem környezetbarát, s bár a kiinduló anyagai valóban természetes, „bio” eredetűek, a termékben a katalizátorból nyomokban maradó sav nem előnyös a kenőanyag felhasználásánál. Ezért a savkatalízist mindenképpen célszerű lenne enzimes katalízissel kiváltani.

A kozmaolaj komponensek és a zsírsavak észterezését vizsgálták amerikai és indiai kutatók [Gulati, 2003], *Aspergillus terreus*-ből kinyert lipáz enzim segítségével nem-konvencionális közegben. A 2.7.1. táblázatban mutatom be a 48 óra alatt elért konverziókat.

Mint látható, a kozmaolaj komponensei hasonlóan reagáltak a hosszabb zsírsavakkal, de az olajsavval nem volt kimutatható konverzió.

2.7.1. táblázat: *A. terreus* lipáz által katalizált észterezés konverziói n-hexánban 37 °C-on 48 óra elteltével [Gulati, 2003]

Az alkalmazott zsírsav	metanol	i-propanol	i-amil-alkohol	butanol
Mirisztinsav (C _{14:0})	79 %	51 %	62 %	35 %
Palmitinsav (C _{16:0})	64 %	50 %	62 %	20 %
Sztearinsav (C _{18:0})	66 %	62 %	65 %	21 %
Olajsav (C _{18:1})	0 %	0 %	0 %	0 %

A kozmaolaj komponenseihez hasonló alkoholokból kiinduló oleátok előállításáról azonban többen is beszámoltak rögzített *Candida antarctica* lipáz felhasználásával. i-Propil-oleát és további zsírsavészterek enzimes előállításának kinetikai vizsgálatát mutatja be Garcia [Garcia, 1996]. Kinetikai paramétereket is meghatároz, bár megállapítja hogy az alacsony forráspontú i-propanol (82 °C) valószínűsíthető azeotróp képzése miatt azok nem teljesen alkalmasak a rendszer leírására. Az általa meghatározott 13 db kinetikai paraméter miatt azok összehasonlítása is nehézkes és mivel a 13 paramétert egyetlen görbére illesztette, azok definiáltsága sem egyértelmű. Szabad állapotú és immobilizált lipázt is használtak (*Rhizomucor miehei*) Oliveira és munkatársai [Oliveira, 2001] etil-oleát előállítására. A folyamatot kinetikai szempontból vizsgálták terner komplex kialakulását feltételezve, hat-paraméteres modellt használva (2.4. fejezet). Megállapították hogy mind a szabad, mind a rögzített enzim katalizálja az olajsav és etil-alkohol reakcióját, meghatározták a kinetikai modell paramétereit. Szintén etanol és olajsav észterezését vizsgálták Hazirka és munkatársai [Hazirka, 2001], akik ping-pong mechanizmust feltételeztek és meghatározták a kinetikai paramétereket is. Megállapították, hogy az alkalmazott oldószer is jelentős hatással van az elérhető hozamokra, későbbi vizsgálatokhoz a n-heptán, n-hexán jellegű közegeket javasolták.

Azoknak a publikációknak az eredményét, ahol kinetikai szempontból is vizsgálták az olajsav szerves oldószerben lipáz enzimmal történő észterezését, a 2.7.2. táblázatban foglaltam össze. Látható, hogy butil-alkoholnál hosszabb szénláncú alkoholt egyik szerző sem vizsgált. Rövidebb szénláncú alkoholok esetén az alkohol gátló hatását minden esetben valamilyen módon feltételezték, de az olajsav ilyen hatását is említik [Goddard, 2000]. A kinetika leírására a legtöbb esetben a ping-pong bi-bi modellt használták, de található annak szélsőségesen eltorzított alkalmazására is példa, (Oliveira, 15 nagyságrendnyi eltérés a

kinetikai paraméterekben) valamint nagymértékű egyszerűsítések is, pl. egy szubsztrátos reakció [Goddard, 2002]. Több esetben a vázolt kinetika csak nagyon szűk koncentráció tartományban alkalmazható. A táblázatból kitűnik, hogy ezek a részletes kinetikai vizsgálatok nem tekinthetők a reakció megfelelő leírásának. Az észterezési folyamat kinetikájának meghatározásához fejlesztésekre, finomításokra van szükség.

2.7.2. táblázat: Olajsav észterezésének kinetikai vizsgálata

Alkohol	Enzim	Modell	Hivatkozás	Megjegyzés
i-propil-alkohol	Novozym 435 <i>Candida antarctica</i>	ordered bi-bi 13 paraméter, a szubsztrátok és a termékek kompetitív inhibitorok	[Garcia, 1996]	nagy az illesztés hibája, igen sok paraméter egyetlen mérésre illesztve
butil-alkohol	immobilizált <i>Candida rugosa</i>	ping-pong bi-bi 5 paraméter a sav és az alkohol mint inhibitor	[Zaidi, 2002]	28 % a maradó hiba, szűk mérési tartomány (0,1-1 mol/l)
etil-alkohol	immobilizált <i>Rhizomucor miehei</i>	random bi-bi 4 paraméter az alkohol mint inhibitor	[Oliveira, 2001]	15 nagyságrendnyi különbség az egyes paraméterek között, kvázi egy szubsztrátos kinetika
etil-alkohol	immobilizált <i>Rhizomucor mihei</i>	Michaelis-Menten 2+1 paraméter az alkohol mint inhibitor	[Goddard, 2000]	minden alkohol koncentrációra más kinetikát használ, pszeudo egy szubsztrátos kinetika
etil-alkohol	szabad, sertés hasnyálmirigyből izolált	ping-pong bi-bi 4 paraméter az alkohol mint inhibitor	[Hazirka, 2002]	nagyon szűk mérési tartomány 0,3-0,8 mol/l

A sikeres észter előállítási módszerek alapján a MÜKKI-ben észterezésre már használt Novozym 435 *Candida antarctica* B lipáz valószínűleg használható a kozmaolaj komponensek és olajsav észtereinek előállítására nem-konvencionális közegben [Bélafi-Bakó, 2003].

Az általam vizsgált észterezési reakcióban az olajsav és az i-amil-alkohol észterezési reakciója a következőképpen megy végbe:



Ebben a reverzibilis reakcióban a reagensek mólaránya, a hőmérséklet, az enzim és a vízeltávolítás a reakcióelegyből azok a paraméterek, amelyek befolyásolják a konverziót és a reakciósebességet.

A lipáz által katalizált észterezés kinetikai vizsgálatának tapasztalatai alapján (2.7.2 táblázat) én munkámban a ping-pong bi-bi reakciómechanizmus szerinti modellt kívánom alkalmazni.

3. Kísérleti anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált anyagok

3.1.1. Enzimek

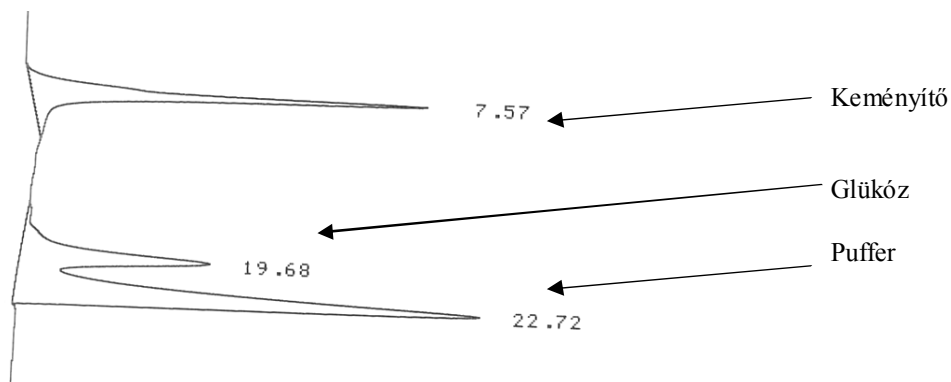
Keményítő lebontáshoz használt enzim

Kísérleteimet *Aspergillus awamori* mikroorganizmusból kinyert glükóamiláz enzimmel folytattam, amelyet géntechnikai úton tettek alkalmassá az emelt szintű glükóamiláz termelésére. A GB-58/99 nyilvántartási számú Brit-Magyar Tét együttműködés keretében partnereink a *Satake Centre for Grain Process Engineering* intézetből (UMIST, Manchester) biztosították számunkra azt az *Aspergillus awamori* (2B. 360 U2/1) törzset, amelynek fermentációjával nyertük az enzimet. A fermentáció különlegességét az adta, hogy teljes őrlésű gabonát (búzát) használtunk fel hozzá. A fermentáció során a glükóamiláz extracelluláris enzimeként képződik, s a fermentléből így könnyen (szűréssel, centrifugálással) kinyerhető. A szűrlet szárazanyag-tartalma 2,9 %, fehérjetartalma 47 % volt (Kjelhdalhmódszer) a szárazanyagra vonatkoztatva.

A UMIST kutatói korábban arra következtettek, hogy a fermentlében található csekély mértékű α -amiláz is, de ezt a későbbiekben nem igazolták. Sőt fermentációs kísérleteikben az α -amiláz aktivitás hiányával támasztották alá a gyengébb eredményeket.

Kísérleteimet nemcsak a redukáló cukor koncentráció mérésével követtem nyomon, hanem néhány esetben egy speciális, cukrok elemzésére, oligoszacharidok elválasztására szolgáló HPLC módszert is alkalmaztam. AMINEX 42 A oszlopon semleges pH-n egyszerre határoztam meg a reakcióelegyek keményítő és egyéb szacharid frakcióit.

Amint az a kromatogramon (3.1 ábra) jól látható, minden esetben kizárólag glükózt és keményítőt mértem, oligoszacharidokat nem tudtam kimutatni még igen koncentrált oldatokból, a kezdeti időpontokban sem. Ezek alapján valószínűsítettem, hogy a kísérletek alatt túlnyomó részben a glükóamiláz enzim volt a meghatározó biokatalizátor, s ennek aktivitását mértem.



3.1 ábra: Keményítő hidrolízis kromatogramja [Aminex 42-A oszlop Bideszt víz 0,5 ml/min 25 °C RI detektor]

Észterezéshez használt enzim

Novozym 435 enzimet használtunk az észterezési reakcióhoz, egy kereskedelmi *Candida antarctica* lipázt (E.C. 3.1.1.3. *Triacylglycerol acylhydrolase*), amely makropórusos akril gyantán volt rögzítve, víztartalma 1-2 % m/m. Az enzim a Novo Nordisk A/S (Dánia) ajándéka volt. A készítmény névleges aktivitása körülbelül 7000 Propil Laurát Egység (PLU/g) volt. Egy propil-laurát egység (PLU) a definíció szerint az az érték μmol -ban kifejezve, amennyi n-propil-laurát keletkezik szabványos körülmények között laurilsav n-propil-alkohollal való észterezésekor 15 perc után, atmoszférikus nyomáson.

3.1.2. Egyéb vegyszerek

Vegyszer	Gyártó	Megjegyzés (tisztaság)
absz. etanol	Reanal	99,8
amil-oleát	Fluka	99,9
citromsav	Reanal	
desztillált víz		bidesztvíz az oldatokhoz
dietil-éter	Spektrum3D	
fenoftalien	Reanal	
i-amil-alkohol	Sigma	
kálium-nátrium-tartarát	Reanal	
kálium-hidroxid	Reanal	99%
kálium-jodid	Reanal	
keményítő	Spektrum 3D	98% nem módosított
kénsav	Reanal	
nátrium-hidroxid	Spektrum3D	
n-hexán	Reanal	99%
olajsav	Reanal	99,9%
réz(II) szulfát	Spektrum3D	
sósav oldat	Reanal	0,1 N (faktora 1,000)
P8514 proteázgátló	Sigma	

3.2. Mérési módszerek

3.2.1. Glükoamiláz aktivitásának mérése

A glükoamiláz aktivitását keményítő szubsztrát segítségével mértem, s a reakciót Schoorl-módszerrel [Erdey, 1958] követtem nyomon. Az enzim aktivitás egységét azzal a mennyiséggel definiáltuk, amely 1 mg redukáló cukrot szabadít fel percenként a meghatározás körülményei között. Azaz az aktivitás egysége: GE: Glükóz Egyenérték

$$U = \frac{\text{mgGE}}{\text{min}} \frac{1}{[\text{g}] \text{ biokatalizátor}}$$

A mérések kivitelezésénél két azonos keményítőtartalmú oldatot állítottam össze 100 ml-es jódszámlombikban. Acetát pufferrel a pH-t 4,1-re állítottam be. A mintákat rázógépbe helyezve homogenizáltam és temperáltam azokat. A reakciót a glükoamiláz oldat (1 ml) hozzáadásával indítottam, majd 5 perc után rövid idejű intenzív forralással állítottam le, ennek hatására az enzimek denaturálódtak.

3.2.2. Keményítő hidrolízis rázatott lombikban

A megfelelő koncentrációjú keményítő oldatokból 25 cm³-t mértem be 100 cm³-es jódszámlombikokba. A reakcióelegyet a New Brunswick G24-es típusú rázó inkubátorba helyeztem és 60 °C-ra termosztáltam. A reakciót az enzim hozzáadásával indítottam. A mintákat azonnal forraltam, így az enzim reakciót leállítottam, a mintákat a reakció után Schoorl-módszerrel elemeztem [Erdey, 1958]. A kezdeti reakciósebesség meghatározásához az 5., 10., 30., és a 60. percen vettem mintát.

3.2.3. Lipázos kinetikai mérések rázatott lombikban

A reakcióelegyet 100 cm³-es jódszám lombikokban összeállítottam n-heptán oldószer, az olajsav és az i-amil-alkohol bemérésével, figyelembe véve, hogy a használt vegyszerek is tartalmaztak kismértékben vizet. Az optimális 0,1 % (m/m)-ra egészítettem ki a reakcióelegy víztartalmát. A vegyszerek és a reakcióelegy víztartalmát a Mettler DL 35 automata Karl-Fisher titrátorral határoztam meg.

Az oldatokat rázógépbe helyezve a megfelelő hőmérséklet és homogenitás elérése után indítottam a reakciót 0,01 g rögzített enzim bemérésével.

A mérések kivitelezéséhez New Brunswick G24-es típusú rázó inkubátort használtam, amelynek rázó intenzitása: 0-500 rpm, míg termosztálási tartománya: 20-70 °C volt. A készülék a reakcióhoz szükséges hőmérsékletet, valamint a fázisok intenzív érintkezését biztosította.

3.2.4. Az észterezési reakció analitikai vizsgálata

Gázkromatográfiás elemzés

A mintavételeket követően egy HP 5890 A típusú gázkromatográf segítségével elemeztem a képződött észter és a fogyó olajsav mennyiségét. A biokonverzió meghatározásához FFAP típusú kapillárkolonnát választottam. Az elemzés paramétereit a 3.2.1. táblázatban foglaltam össze.

Elsőként az oldószer (0,5 perc) majd az észter (12 perc) és végül az olajsav eluálódott (24,5 perc). A teljes elemzési idő a szükséges kifűtéssel együtt 30 perc volt, ami nem volt tovább csökkenthető, figyelembe véve, hogy a kolonna az olajsav és az oleát izomerjeit is kismértékben, de nem alapvonalig elválasztotta.

3.2.1. táblázat: Gázkromatográfiás elemzési paraméterek

Oszlop típusa	FFAP típusú kapilláris oszlop (Macherey-Nagel)
Oszlop mérete	25 m * 0,32 mm ID
Filmvastagság	0,50 μm
Detektor	Lángionizációs (FID)
N ₂ vivőgáz	4,2 cm ³ /min
N ₂ segédgáz	45,8 cm ³ /min
H ₂	35 cm ³ /min
Levegő	120 cm ³ /min
Injektor hőmérséklete	250 °C
Detektor hőmérséklete	250 °C
A kolonnatér hőmérséklete	150 °C izoterm

Térfogatos analízis

Az olajsav koncentráció változását 0,1 normálos alkoholos káliumhidroxiddal titrálva is követtem. A minták tömegét analitikai mérlegen meghatároztam, majd 1-1 cm³ dietil-éter és absz. etanol hozzáadásával feltártam azokat. A dietil-éter és etanol elegye a feltáráson túl az enzimet is teljes mértékben dezaktiválta, így a reakciót leállította. A dietil-éter és az etanol hozzáadása után az oldat igen gyorsan párologó elegyet képezett, ezért fontos volt a titráló-lombikokat dugóval ellátni. A mérésekhez Sartorius M24 digitális analitikai mérleget és mikrobürettát használtam. A 0.1 normás alkoholos kálium-hidroxidot minden mérési napon sósav oldat segítségével faktoroztam.

3.2.5. Kezdeti reakciósebesség meghatározása

A kezdeti reakciósebesség minél pontosabb meghatározása miatt, az első fél órában 5 percnként, majd fél óránként, később a 6. és a 24. órában vettem mintákat. Megállapítottam, hogy az egyensúlyi koncentrációk minden esetben kialakultak 24 óra elteltével, ezért az elemzéseket eddig végeztem.

Már az első kísérletek folyamán látható volt, hogy a térfogatos analízis fő előnye a gyorsasága, ami lehetővé teszi, hogy több párhuzamos mérést is végre lehet hajtani, míg

gázkromatográffal történő elemzésnél az egyes mérések sokkal hosszabb időt igényeltek. Mivel mindkét mérés azonos pontosságot eredményezett, a mérésekhez a térfogatós analízis módszerét használtam. Minden mintavételi pontban három párhuzamos mintán végeztem elemzést, melyek átlagát használtam fel az adatok kiértékelésénél.

Az adatokat jegyzőkönyvbe rögzítettem, majd minden mérés után MS-EXCEL program segítségével elemeztem, az esetleges mérési hibák minél hamarabbi kiszűrése érdekében.

Elsőként a mérési tervben meghatározott koncentrációmátrix főátlóját vettem fel minden mérési pontban két pár (három-három, összesen hat) párhuzamos mérést végezve. Megállapítottam, hogy három párhuzamos mérés eredménye kielégítő pontosságú, kétszer ennyi mérést elvégezve a szórás nem csökkenthető számottevően.

4. Eredmények

Ebben a dolgozatban az volt a célom, hogy két enzimátikus rendszer kinetikai viselkedését tanulmányozzam és jellemezzem. A keményítő glükóamiláz enzimmel történő hidrolízise során egy új, az *Aspergillus awamori* törzsből kinyert enzimet vizsgáltam, egyrészt aktivitás ill. stabilitás szempontjából, másrészt a termék-inhibíció esetleges fellépését figyelembe véve.

A lipázos észterezések közül az olajsav i-amil-alkohollal történő reakcióját tanulmányoztam *Candida antarctica* eredetű készítménnyel.

A glükóamiláz keményítő hidrolízis vizes rendszerekben játszódik le, így pszeudo egy szubsztrátos reakciónak tekinthető, ahol a konszekutív, több lépéses reakciómechanizmus leírását a képződő glükóz inhibíciós hatása bonyolítja.

A lipázos észterezés az ún. bi-bi reakciók közé tartozik, kinetikájának vizsgálatát szerves oldószerben végeztem, ahol az enzim aktivitását döntően befolyásoló hidratáltsági fokot a kiindulásnál jelenlevő ill. képződött víz koncentrációja jelentősen befolyásolja. Ezen felül a várhatóan fellépő szubsztrát és termék gátlás is fokozza a reakció kinetikai jellemzésének nehézségeit.

4.1. Keményítő hidrolízis vizsgálata

Az *Aspergillus awamori* fermentációjával előállított enzimeket több kísérletben vizsgálták a MÜKKI és a UMIST kutatói [Koutinas, 2001], s megállapították, hogy a felülúszóban található enzimek jól hidrolizálják a poliszacharidokat, de aktivitásuk gyorsan csökken, ezért folyamatos üzemű membrán bioreaktorban alkalmazásuk nehézkes. Első lépésként ezért az enzimek stabilitását, dezaktiválódásának mértékét és ennek csökkentését vizsgáltam meg, majd tanulmányoztam az enzim kinetikai viselkedését (különös tekintettel a termék inhibícióra), végül a stabilizált glükoamiláz enzim segítségével membrán bioreaktorban valósítottam meg a keményítő enzimes lebontását. A keményítő hidrolízisének szubsztrátjaként a gélesített keményítőt választottam mivel így adataimat a UMIST kutatói is felhasználhatták. Továbbá nem kellett figyelembe vennem az egyes oligoszacharid frakciók egymástól eltérő tulajdonságait, melyek a hidrolízis kinetikáját is befolyásolják [Nagy, 1992].

4.1.1. Stabilitás vizsgálata

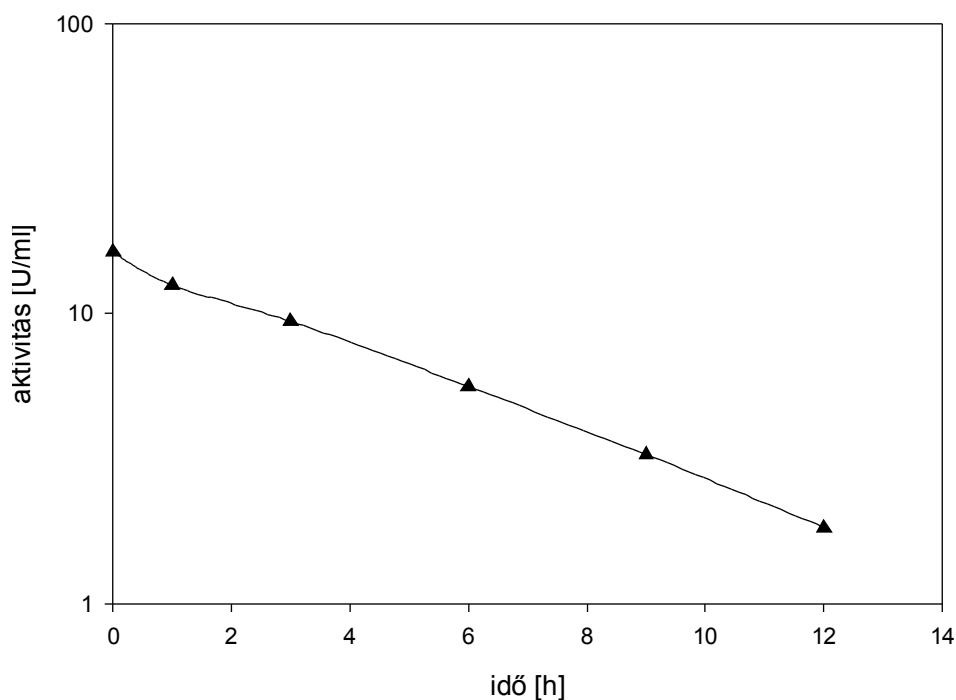
A fermentációs úton nyert felülúszó kiinduló glükoamiláz aktivitását igen jónak találtuk. A dezaktiválódás vizsgálatához az enzim oldatot 60 °C-ra termosztáltam és abból vettem mintákat, melyeknek meghatároztam az aktivitását. A 60 °C-on szubsztrát jelenléte nélkül mért dezaktiválódási görbe a 4.1.1. ábrán látható. A kapott adatok a hődezaktiválódásra jellemző lefutást mutatják.

A hő hatására lejátszódó fehérjebomlás exponenciális egyenlettel írható le, mely folyamat egy adott hőmérsékleten csak az eltelt időtől és az ún. dezaktiválódási állandótól függ [Polakovic, 2002]:

$$E = E_0 e^{-kt} \quad (4.1.1)$$

ahol E_0 és E - a kiinduló illetve az aktuális enzim aktivitás,
 t - az idő,
 k - a dezaktiválódási állandó.

A kísérleti adatainkra ezt az exponenciális görbét illesztettük, a dezaktiválódási állandó értéke 0,18 1/h-nak adódott, ami azt jelenti, hogy az az idő periódus, amely alatt az enzim kiinduló aktivitása a felére csökken (*felezési idő* – $t_{1/2}$), mindössze 230 perc. (A görbeillesztés jóságát jellemző R^2 értéke 0,9939).

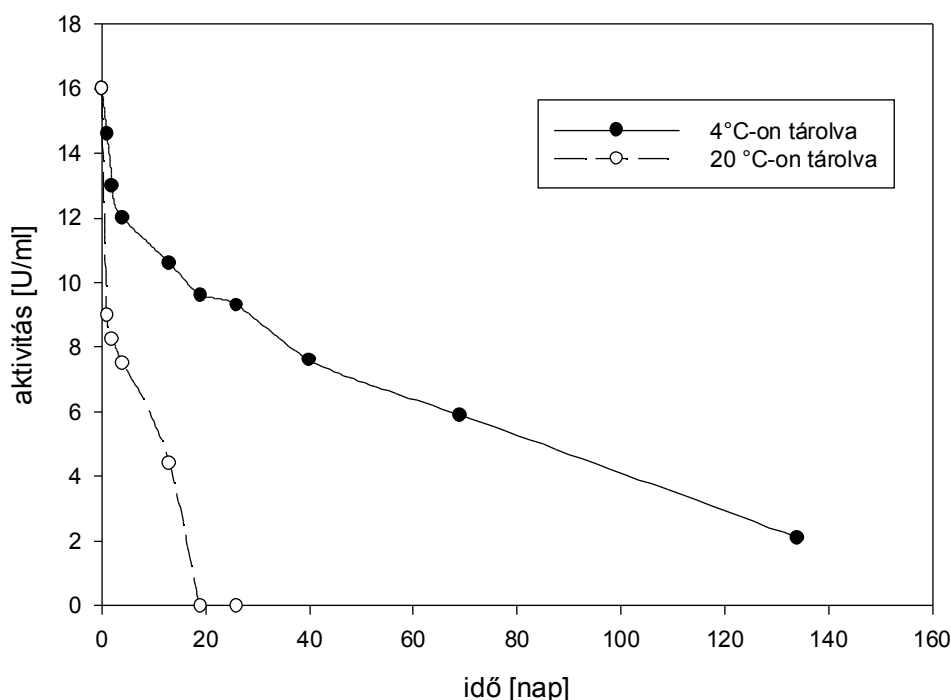


4.1.1. ábra: Glükoamiláz dezaktiválódási görbéje 60 °C-on

Az enzimmészítmény tárolása is gondot okozott, mivel aktivitását hűtőszekrényben 4 °C-on tárolva is folyamatosan elveszítette. Lefagyasztva azonban már nem tapasztaltam ilyen jelenséget. Ezért két enzim oldatot inkubáltam egy időben 4 °C illetve 22 °C-on, az oldatokból mintákat vettem és meghatároztam az aktivitásukat. Az így kapott eredményeket a 4.1.2. ábrán foglaltam össze. Látható, hogy a minták szobahőmérsékleten is rövid idő alatt elvesztik aktivitásukat, kevesebb, mint két hét alatt gyakorlatilag nullára csökkent az öt perc alatt mérhető redukáló cukor tartalom.

A 4 °C-os méréseken is egyenletes dezaktiválódás látható, ez különösen meglepő, mivel több kutató is beszámolt a glükoamilázok jó termostabilitásáról [Polakovic, 1997]. A folyamat lefutása sem olyan egyenletes, mint a 60 °C-os tárolásnál mérhető aktivitás változásnál volt.

Bár a 60 °C-os eredmények a hődezaktiválódásra jellemző lefutást mutatják, s az exponenciális egyenlet is jól illeszkedik az adatokra, az enzimek gyors dezaktiválódásának oka – feltételezésünk szerint – az is lehet, hogy a fermentációban jelen lehetnek olyan proteázok, amelyek a glükóamiláz enzim fehérjét támadják meg, s bontják le. A fonalas gombák, s köztük az *Aspergillus* törzsek jól ismertek kiváló proteáz szekréciós tulajdonságaikról, ahol a legnagyobb gondot a jelenlévő proteázok okozta degradáció jelenti [Moralejo, 2002; Gouka, 1996].

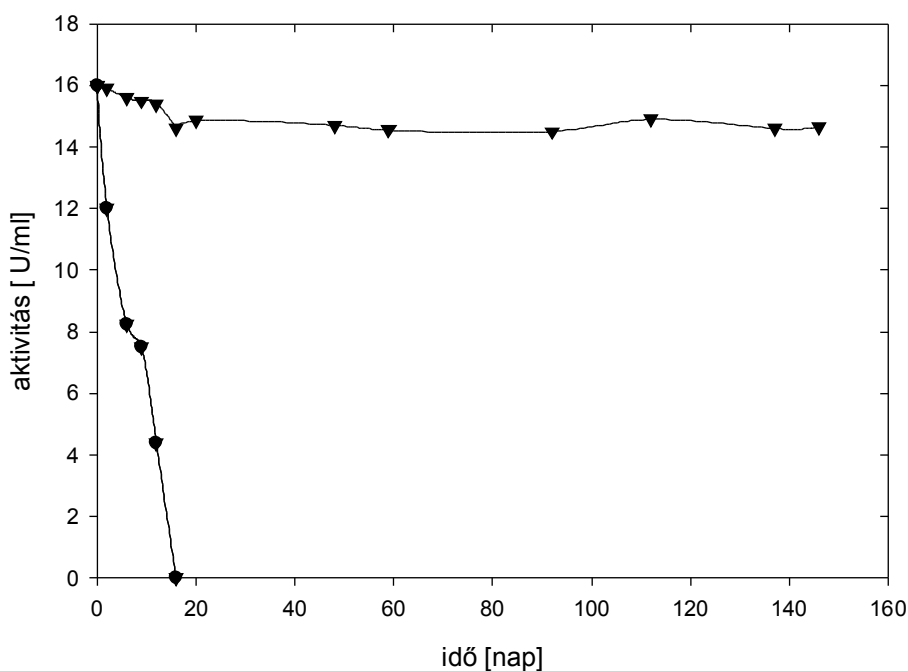


4.1.2. ábra: Az aktivitás változása 4 és 22 °C-on

A proteázok olyan enzimek, melyek a fehérjék hidrolízisét katalizálják. Sok baktérium és vírus terjedésében is jelentős szerepet töltenek be, épp ezért a gyógyszerkutatásnak egy igen gyorsan fejlődő ága foglalkozik ezen proteázok működésének gátlásával. Olyan enzim inhibitorokat keresnek, melyek specifikusan és irreverzibilisen gátolják az egyes proteáz enzimek működését. A gyógyszerek kifejlesztésénél probléma, hogy az egyes proteázok igen változatos szerkezettel rendelkeznek, így különféle inhibitorokra van szükség teljes gátlásukhoz.

Az általunk stabilizálni kívánt enzimekhez ún. *proteázgátló koktélt* szereztünk be és teszteltünk. Különböző mennyiségben adagoltunk proteázgátlót a folyékony,

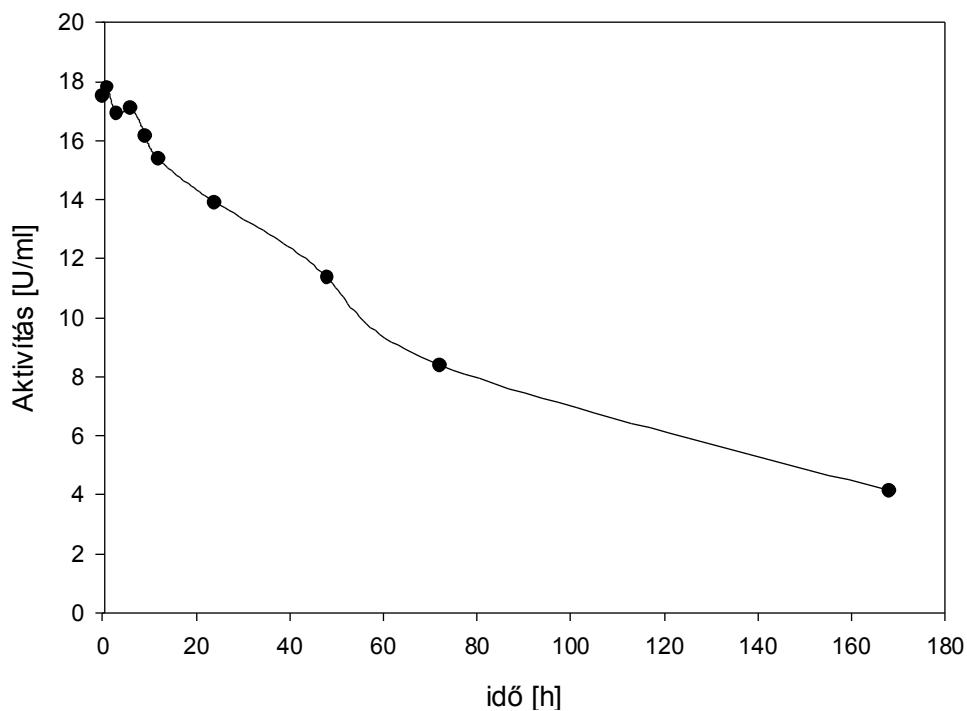
nyers enzimmészítményhez, s mértük az így kezelt minták aktivitását. Kiderült, hogy a P 8215 jelű (Sigma) koktél valóban hatékonyan működött, s képes volt megakadályozni a proteázok által okozott fehérjebontást. A készítmény 4-(2-aminoetil)-benzol-szulfonil fluorid (röviden AEBSF), pepstatin A, transz-epoxiszukcinil-L-leucilamido-(4-guanido)-bután (E-64) és 1,10-fenantroin vegyületeket tartalmaz, s kifejezetten penészgombák és élesztők által termelt szerin, cisztein, aszparaginsav és metallo-proteázok inhibíciójára alkalmas. A 4.1.3. ábra diagramja a szobahőfokon tárolt, proteázgátlóval kezelt (1 ml koktélt adtunk 50 ml enzim oldathoz) illetve a kezeletlen enzim aktivitását mutatja az idő függvényében. Jól látható, hogy a kezelt enzim még hónapok múltán is megőrizte aktivitását.



4.1.3. ábra: A kezeletlen és a proteáz gátló koktéllal kezelt *Aspergillus awamori*ből nyert glükóamiláz enzim aktivitása (szobahőmérsékleten tárolva)

A tárolási stabilitás jelentős növelése után, ismételten meghatároztam a 60 °C-on mérhető dezaktiválódási állandó értékét. A kísérleti eredményeket a 4.1.4. ábrán mutatom be. Látható, hogy míg a kezeletlen készítmény (4.1.1. ábra) 12 óra alatt aktivitásának 90 %-át elvesztette, a kezelt glükóamiláz aktivitása 170 óránál is az eredeti aktivitásának több, mint 20 %-a.

A görbe lefutása továbbra is a hődezaktiválódásra jellemző exponenciális képet mutatja, ezért a kísérleti adatainkra ezt az exponenciális görbét illesztettem, a dezaktiválódási állandó értéke $0,0052 \text{ h}^{-1}$ -nak adódott, vagyis az az idő periódus, amely alatt az enzim kiinduló aktivitása a felére csökken (felezési idő – $t_{1/2}$), 75 óra. (A görbeillesztés jóságát jellemző R^2 értéke 0,8924).



4.1.4. ábra: A proteázgátló koktéllal stabilizált glükoamiláz dezaktiválódási görbéje 60 °C-on

A különféle forrásból származó glükoamiláz enzimekre jellemző felezési időket az irodalmi adatokkal hasonlítottuk össze (4.1.1. táblázat).

4.1.1. táblázat: A glükoamiláz termostabilitásának paraméterei

Forrás	Felezési idő [óra]	Hőmérséklet [°C]
<i>Aspergillus awamori</i> (saját kezeletlen)	3,8	60
<i>Aspergillus awamori</i> (saját proteázgátlóval kezelt)	75	60
<i>Aspergillus awamori</i> [Fierobe, 1997]	0,9	67
<i>Aspergillus awamori</i> [Yamasaki, 1977]	1,0	60
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> [Kleinman, 1988]	0,45	60
<i>Thermomyces lanuginosus</i> [Basaveswara, 1981]	7,3	60
<i>Aspergillus niger</i> [Nielsen, 2002]	10	60
<i>Talaromyces emersonii</i> [Nielsen, 2002]	48	60

A táblázatból kitűnik, hogy irodalmi adatokkal összehasonlítva az általunk stabilizált glükoamiláz felezési ideje kiemelkedően magasnak mondható.

4.1.2. Kinetikai vizsgálatok

A keményítő enzimes hidrolízisét, enzimkinetikai értelemben, tekinthetjük egy szubsztrátos reakciónak, ahogy arra az irodalmi összefoglalóban rámutattam. Hiszen a víz, mint a reakció közege, gyakorlatilag végtelen feleslegben van jelen, míg a keletkező keményítő fragmentum affinitása a glükoamiláz enzimhez csak igen kis mértékben tér el az eredeti szubsztráttól.

A fermentlé felülúszójából vett enzimoldattal rázatott lombikos kísérleteket végeztem a kezdeti reakciósebesség meghatározására különböző kiindulási keményítő tartalmú mintákkal (1, 2, 4, 6, 8, 10 g/l-es koncentrációknál). A mintákat 60 °C-on rázógépből (150 rpm) termosztáltam. Felvettem a reakciók időgörbéit és meghatároztam a kezdeti reakciósebességeket. A reakciósebességi értékeket a jobb összehasonlíthatóság miatt az alkalmazott fermentlé koncentrációjával elosztottam, így dimenziója mmol/(min.ml fermentlé) lett. A perc alapú sebesség-meghatározást is az irodalmi összehasonlíthatóság érdekében választottam.

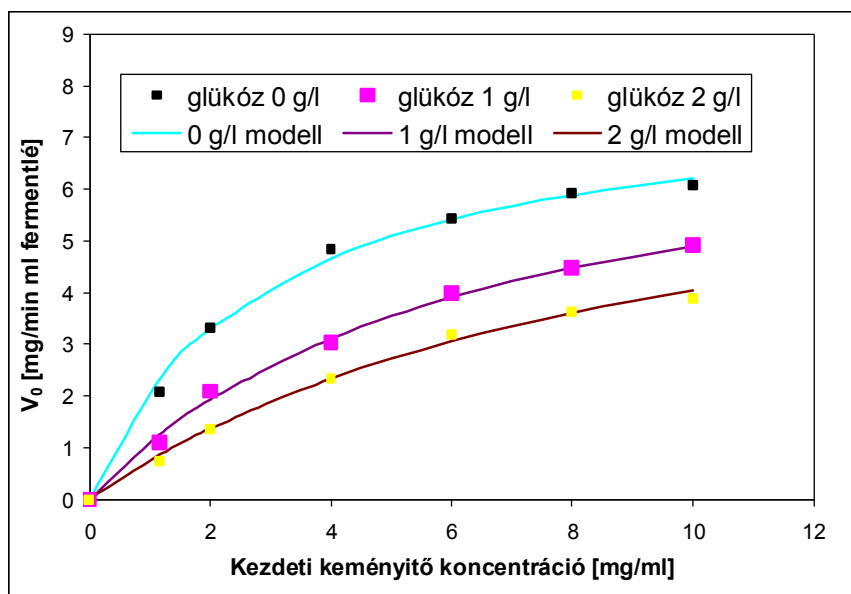
A termékinhíbiót a kezdeti reakcióelegyhez adott glükóz segítségével határoztam meg. A kiindulási oldatokhoz 1 és 2 mg/ml-es koncentrációban adtam glükózt. A méréseket az előzőek szerint ismételtel elvégeztem és meghatároztam a kezdeti reakciósebességeket.

A meghatározott sebességeket a 4.1.5. ábrán foglaltam össze. Látható, hogy a glükóz, minden esetben jelentősen csökkenti az elérhető kezdeti reakciósebességet. A keletkező glükóz tehát erős inhibitorként viselkedik, így a reakció kezdeti sebességét az alábbi alakban írhatjuk fel:

$$v_0 = \frac{V_{\max}S}{K_M(1 + \frac{G}{K_G}) + S} \quad (4.1.2)$$

Ahol:

- V_{\max} a maximális kezdeti reakciósebesség
- K_M Michaelis-Menten állandó
- K_G termékinhíbiós állandó
- S keményítő koncentráció
- G glükóz koncentráció



4.1.5 ábra: A kezdeti reakciósebességek a szubsztrátkoncentráció függvényében

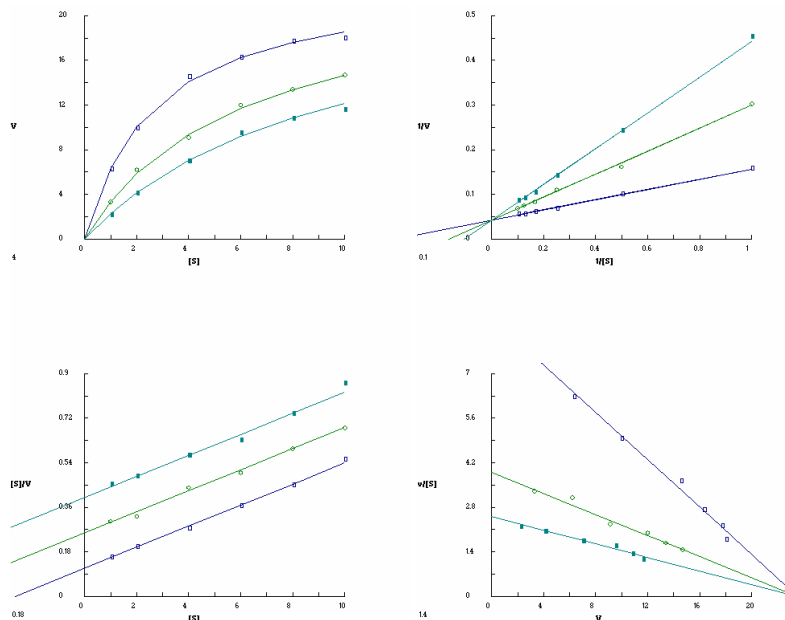
A kinetikai paramétereket a Lucenz4 program segítségével számoltam ki. A program a legkisebb négyzetek elve alapján számolja ki a szükséges paramétereket, de nemcsak az eredeti görbéken, hanem azok linearizált formáján is.

A paramétereket a 4.1.3. táblázatban mutatom be, míg a program által meghatározott görbéket a 4.1.6. ábrán szemléltetem. Összehasonlításként irodalmi adatokat is közlök a táblázat harmadik oszlopában [Li, 2002].

4.1.3. táblázat: Kinetikai paraméterek. (Az illesztés hibája $r^2=0,997$)

Paraméter	Saját adat <i>Asp. awamori</i>	[Li, 2002] <i>Asp. niger</i>	[Nagy 1992] Maltodextrin / <i>Aspergillus niger</i>
V_{max}	7,9 g/l min	18,3 g/l min	0,96 g/l min
K_m	2,8 g/l	8,80 g/l	0,2 g/l
K_G	0,8 g/l	1,12 g/l	1,2 g/l

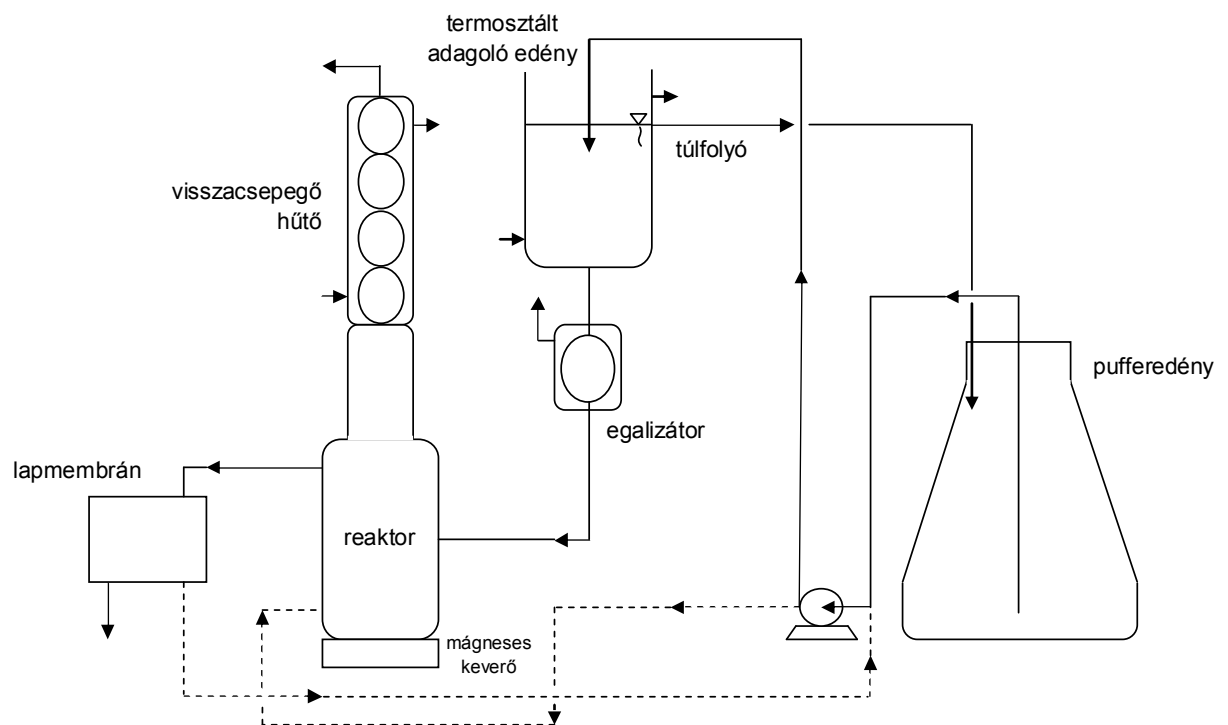
Megállapítható, hogy a nyert glükóamiláz aktivitása a kereskedelmi forgalomban kapható készítménynél egységnyi fehérjére vetítve kisebb, de a kinetikai paraméterek azonos tartományba esnek. A maltodextrin bonthatósága mindkét keményítő bontást vizsgáló eredménytől elmarad.



4.1.6. ábra: A kompetitív gátlás grafikus analízise
Kezdeti reakciósebesség, Lineweaver-Burk, Hanes, Eadie-Hofstee féle ábrázolás
A pontok a mért adatokat, a vonalak a modell eredményeit ábrázolják

4.1.3. Integrált rendszer

Miután az enzim stabilitását sikeresen megnöveltük, kísérleteket végeztünk folyamatos keményítő bontásra membrán reaktorban. A membrán segítségével megoldottuk a termék kinyerését, ezzel kiküszöbölve a termék gátlást is. A kiépített rendszer vázlatát a 4.1.7. ábrán látható.



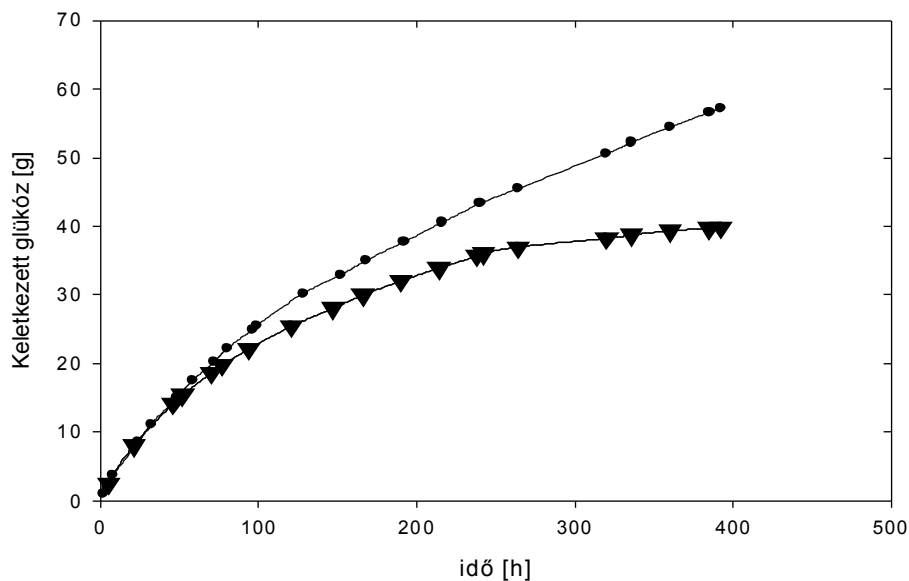
4.1.7. ábra: A kísérleti berendezés vázlatát

A fermentáció és a szubsztrát oldat mágneses keverővel ellátott 100 ml-es reaktorban helyezkedik el. A 60 °C-ra termosztált reaktor felső részén visszacsapó hűtő akadályozza meg a túlzott párolgást. A reaktorból perisztaltikus pumpa szállítja az oldatot a membrán modulba, ahol a glükóz átjut a membránon és a permeátum gyűjtő edénybe kerül. A többi oldat visszajut a reaktorba, az eltávozott reakciókeveréket egy egyszerű mechanikus egalizátor segítségével folyamatosan pótoljuk.

Folyamatos működtetésű membrán reaktoroknál gyakran okozott gondot a megfelelően pontos és megbízható szintszabályozás. Különösen nehézkes volt hosszú időn keresztül végzett kísérletek esetében megbízható megoldást találni. Az alkalmazott módszer előnye, hogy nem igényel elektromos vezérlést, nem tartalmaz motorokat és érzékelőket, csökkentve a meghibásodás lehetőségét. Hátránya, hogy érzékeny az eltömődésre és nem alkalmas nagyobb viszkozitású folyadékok, szuszpenziók adagolására.

Az egalizátor két egymásban elhelyezkedő ovális alakú üvegedényből áll, melynek alsó és felső vége le van szűkítve, és szorosan illeszkednek egymáshoz. Így szelepként működik. Az alsó csövet összekötve a rektorral, ha annak szintje lecsökken, a szelep kinyit és pótolja az eltávozott mennyiséget, miközben a szelep fokozatosan lezár.

1 %-os keményítő oldat alkalmazásával folyamatos kísérleteket végeztem az enzim stabilitását vizsgálva, mind a proteázgátlóval kezelt, mind a kezeletlen fermentlével. A permeátumot gyűjtöttem és meghatároztam a keletkezett glükóz mennyiségét. Az alkalmazott fermentlé mennyisége mindkét esetben 1 ml volt. Az eredményeket a 4.1.8. ábra tartalmazza.

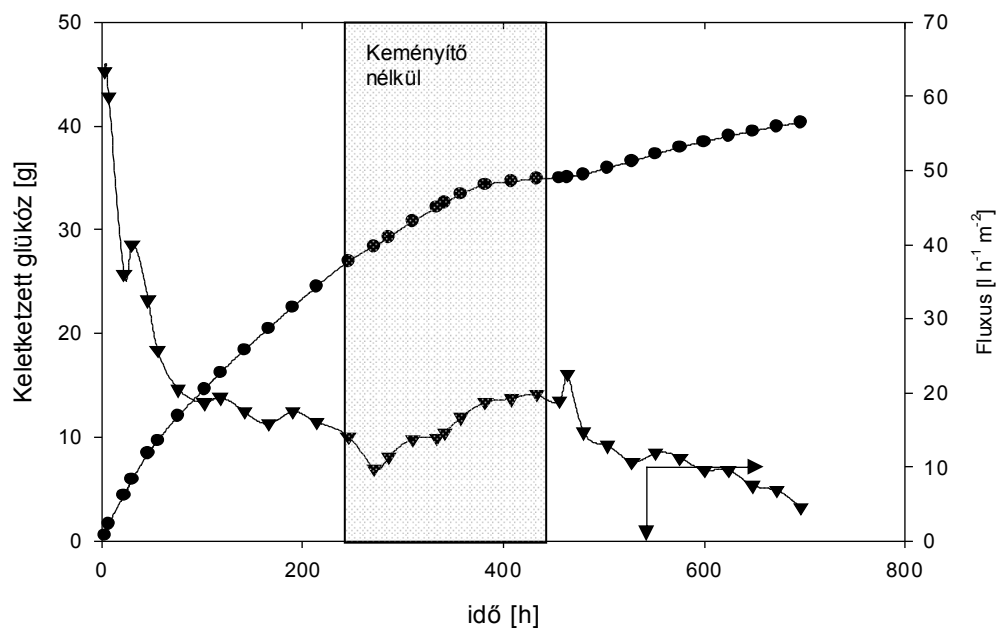


4.1.8. ábra: A reakcióban keletkezett glükóz mennyisége
(\blacktriangledown kezeletlen \bullet proteáz inhibitorral kezelt készítmény)

Látható, hogy az enzim stabilitása a kezdeti szakaszban mindkét esetben magas volt, azonban 200 óra után a kezeletlen készítmény aktivitása lecsökkent, míg a proteázgátló kottállal kezelt fermentlé 400 órán át is megőrizte aktivitását.

A mérések során az elért fluxus nagymértékben csökkent, ezért rendszeres időközönként a membrán felületére rakódott szárazanyagot rövid ideig tartó intenzív visszamosással eltávolítottam.

További méréseket végeztem a dezaktiválódás pontosabb vizsgálatához 0,2 ml proteázgátlóval kezelt fermentlével. A keletkezett glükóz mennyiségét és a mintavételi időnként elért fluxust a 4.1.9. ábrán mutatom be.



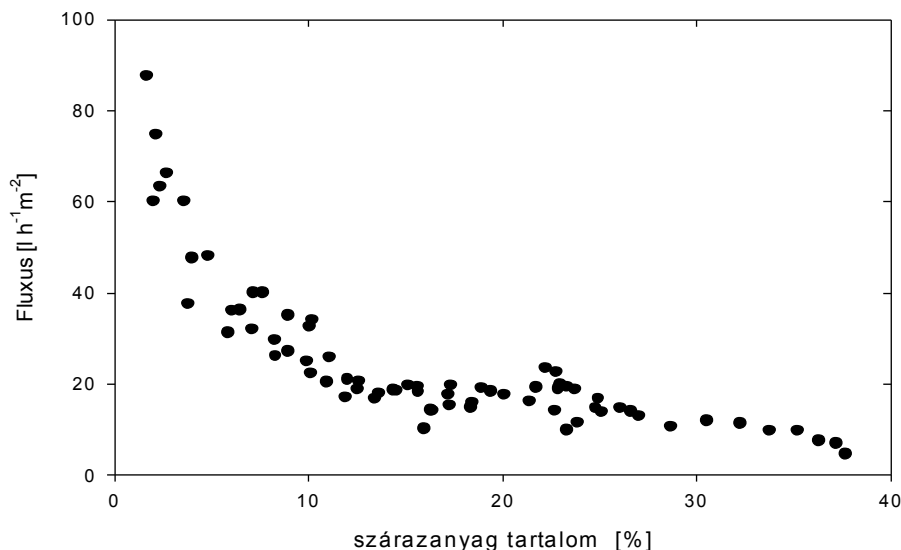
4.1.9. ábra: 0,2 ml fermentlével végzett kísérletek
 —●— keletkezett glükóz mennyisége, —▼— az elért fluxus

Az ábrán látható, hogy az enzim aktivitása a vizsgált időszakban végig magas volt, azonban a fluxus a kezdeti időszakban gyorsan, később kevésbé gyorsan, de folyamatosan csökkent, hiába iktattam be ismét rövid visszamosatási periódusokat az üzemeltetésbe.

Az eltömődés egyik oka a keményítő akkumulálódása a rendszerben, mely részben a betáplálásnál kisebb bontási sebesség, részben a nem teljesen lebontható részek (szennyeződés 1-2 % is lehet) felhalmozódásának következménye.

A felhalmozódott keményítő lebontása érdekében a 220. órától a 420. óráig betáplált puffer oldatban 0-ra csökkentettem a keményítő koncentrációját. A fluxus növekedni kezdett, majd amikor a permeátumban mérhető glükóz koncentrációja lecsökkent, újra 1 %-os keményítő oldatot tápláltunk be. A fluxus ezután ismételen csökkenni kezdett.

Megállapítható, hogy a 0,2 ml fermentlé is tartalmaz elegendő enzimet a stabil, folyamatos keményítő hidrolízis megvalósításához enzim membrán bioreaktorban.

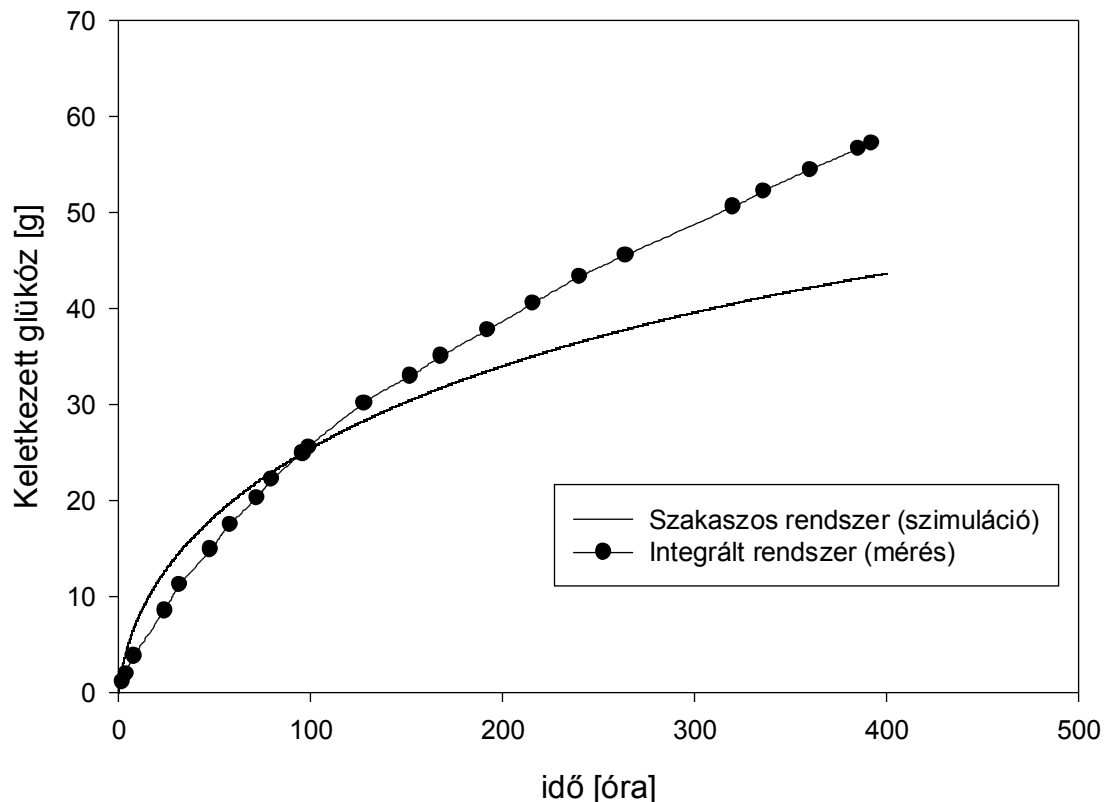


4.1.10. ábra: A fluxus és a szárazanyag tartalom összefüggése

A mért fluxus értékeket a reaktorban mérhető szárazanyag koncentráció függvényében a 4.1.10. ábra mutatja be. Jól láthatóan igen szoros összefüggés van az elérhető fluxus és a reaktorban felhalmozódott szárazanyag között van. Ezért a folyamatos működésű rendszer tervezésénél figyelembe kell venni, hogy az enzim stabilitása mellett a reaktorban halmozódó szárazanyag koncentrációja is fontos tervezési paraméter.

Ha megvizsgáljuk a folyamatos keményítő hidrolízist integrált rendszerben, látható, hogy a 400 óra alatt 61 g glükóz képződött összesen 65 g keményítőkészítményből, melyből 63 g keményítő volt bontható, 2,5 % egyéb szerves szennyeződés. Ez összesen 88 %-os konverzióknak felel meg, s a folyamathoz 6,5 l szubsztrátoldatot és 1 ml proteázgátlóval kezelt fermentlevet használtam.

Ha hasonló körülmények között szakaszos reaktorban zajlik a reakció, számolni kell a keletkezett glükóz gátló hatásával. Az előző fejezetben meghatározott kinetikai paraméterek segítségével egy hasonló térfogatú, 6,5 l-es tökéletesen kevert reaktort szimuláltam, 1 %-os kezdeti keményítő koncentrációt és 1 ml enzimekből készítményt feltételezve. A szimuláció eredményét a folyamatos integrált rendszerével összehasonlítva a 4.1.11. ábrán mutatom be.



4.1.11. ábra: Szakaszos keményítő hidrolízis szimulációja és az integrált rendszer eredményeinek összehasonlítása

Produktivitás szempontjából megvizsgálva a teljes 400 órát, látható, hogy kezdetben a szakaszos rendszeré kismértékben meghaladja az integrált rendszerét. Ahogy a konverzió megnő, az integrált rendszer lesz a hatékonyabb. Számszerűsítve: a szakaszos rendszer produktivitása az alkalmazott enzimmészítményre vonatkoztatva:

43 g glükóz 400 óra alatt

0,1075 g/h ml enzim készítmény

Az integrált rendszer esetén

60 g glükóz 400 óra alatt

0,1500 g/h ml enzim készítmény

Összehasonlítva a rázatott lombikos kísérleteket és a folyamatos integrált rendszerben végrehajtott keményítő hidrolízist, megállapítható, hogy a termék gátlás kiküszöbölésével az integrált rendszer hatékonysága 28 %-al nagyobb.

4.2. Lipázos észterezés kinetikai vizsgálata

Olajsav és i-amil-alkohol észterezését vizsgáltam lipáz enzim jelenlétében, n-heptán oldószerben. Célul tűztem ki, hogy az enzimes reakció lefutását minél többféle kiinduló paraméter mellett kimérjem. Az időbeli lefutásokat leíró görbesereg alapján kinetikai kiértékelést végeztem a bi-bi reakciókra érvényes összefüggések felhasználásával. Végül a keletkező mellékterméknek, a víznek a reakcióra gyakorolt hatását elemeztem.

4.2.1. A reakció időbeli lefutása

Kinetikai méréseknél célszerű olyan analitikai módszert választani, ami a reakció folyamatos nyomon követését lehetővé teszi. Gyors reakcióknál, kis szubsztrátkoncentrációnál különösen előnyös a mintavételen alapuló technikák mellőzése. A vizsgált reakcióban, a lipázos észterezésnél a közvetlen elemzés azonban számos akadályba ütközik (rögzített enzim, nem jelentős spektrum változás, nagy viszkozitású elegy), ezért csak mintavételen alapuló technikákat lehetett figyelembe venni. Így nagyon alacsony szubsztrátkoncentrációnál nem végeztem kísérleteket.

Az enzimes reakció időbeni lefutásának kiméréséhez első lépésként egy kvadránst vizsgáltam, a kétféle analitikai módszert kipróbálva :

1. GC elemzés FFAP kolonnán
2. Térfogatos analízis

Az első kísérlet sorozathoz felhasznált mérési pontok a 4.2.1. táblázatban láthatóak.

4.2.1. táblázat: Az első kísérletek mérési terve a bemérendő mennyiségekkel (ml bemért anyag 25 ml reakcióelegyben)

alkohol sav	1,0 mol/l	2,0 mol/l
0,5 mol/l	2,28	4,50
	1,39	2,76
1,0 mol/l	2,22	5,28
	1,37	3,25

Megállapítottam, hogy a vizsgált tartományban mind a két analitikai módszer alkalmazható, de a rövidebb elemzési idő a térfogatosságot teszteli a további mérésekhez előnyösebbé.

Kinetikai vizsgálatoknál a szubsztrátkoncentrációt a valószínűsíthető K_M érték ötöde és ötszöröse között célszerű változtatni, ezt figyelembe véve, valamint az oldhatósági viszonyokat és a maximális koncentrációkat megvizsgálva készítettem a 4.2.2. táblázatban látható mérési tervet.

4.2.2. táblázat: A kísérletek mérési terve a bemérendő mennyiségekkel (felül i-amil alkohol g-ban 25 ml-re kiszámolva, alul olajsav g-ban 25 ml-re kiszámolva)

Alkohol mol/l	0,4	1,0	2,0	4,0	6,0
0,2	0,88	2,20	4,40	8,81	13,22
	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41
0,5	0,88	2,20	4,40	8,81	13,22
	3,53	3,53	3,53	3,53	3,53
1,0	0,88	2,20	4,40	8,81	13,22
	7,06	7,06	7,06	7,06	7,06
1,5	0,88	2,20	4,40	8,81	13,22
	10,59	10,59	10,59	10,59	10,59
2,0	0,88	2,20	4,40	8,81	13,22
	14,12	14,12	14,12	14,12	14,12

Kinetikai méréseket végezni csak abban a hőmérsékleti tartományban lehet, ahol az enzim hő-denaturalizációja még nem következik be. Ez a Novozym 435 esetében a 40- 50 °C-os tartomány. Ha a reakció a választott analitikai módszerhez képest túl gyors, lehetőség van alacsonyabb hőmérsékleten is méréseket végezni, ezért a további mérésekhez a 30 °C-os hőmérsékletet választottam.

A termék koncentráció hatásáról számos tanulmány született és a MÜKKI-ben is több munka foglalkozott a lipázos észterezésnél keletkező termékek hatásával [Dörmő, 2004]. Megállapították, hogy a keletkezett észter az ellentétes irányú reakción keresztül a kiindulási anyagok felé tolja el a reakciót. A kezdeti reakciósebességre, ha a $t=0$ időpontban a $P=0$ megszorítással élünk, hatása elhanyagolható. Más a szerepe a víznek, hiszen azon túl hogy, mint melléktermék a reakció egyensúlyára gyakorol hatást, ezen felül erőteljes inhibítorként is viselkedik. Tovább árnyalja a képet, hogy az enzim szerkezetének kialakításához vízre van szükség. Így célszerűnek látszott a kezdeti víztartalmat a korábban meghatározott optimális értékre (0,5 % az egyensúlyi konverzió szerint) beállítani, és itt elvégezni a méréseket.

A kísérleti terv elkészítése és a szükséges anyagok megfelelő mennyiségben történő beszerzése után elvégezhettem a méréseket. Az előzőleg ismertetett reakcióelegyeket 100 cm³-es jódszámlombikokban összeállítottam, oldószerként n-heptánt alkalmaztam. Az oldatokat rázógépre helyezve, a megfelelő hőmérséklet és homogenitás elérése után indítottam a reakciót 0,01 g rögzített enzim bemérésével.

A kezdeti reakciósebesség minél pontosabb meghatározása miatt az első fél órában 5 percenként, majd fél óránként, később a 6. és a 24. órában vettem mintákat. Megállapítottam, hogy az egyensúlyi koncentrációk minden esetben kialakultak 24 óra elteltével, ezért az elemzéseket eddig végeztem. A párhuzamos mérések szórását ellenőriztem, ahol szükséges volt újabb méréseket végeztem el. Megállapítottam, hogy a térfogatos analízis pontossága megfelelő volt a vizsgált tartományban.

Elsőként a mérési tervben meghatározott koncentrációmátrix főátlóját vettem fel minden mérési pontban két pár (három-három, összesen hat) párhuzamos mérést végezve. Megállapítottam, hogy három párhuzamos mérés eredménye kielégítő pontosságú, kétszer ennyi mérést elvégezve a szórás nem csökkenthető számottevően.

A 4.2.1. ábrán a 0,2 mol/l olajsav koncentrációjú reakciók időbeni lefutását mutatom be. Az egyes görbék az eltérő, kiinduló i-amil-alkohol koncentrációnál mért adatokat, az olajsav fogyását mutatják az idő függvényében.

Az ábrán látható, hogy a kis mennyiségű olajsav a nagy alkohol feleslegben hamar elfogy és kialakul az egyensúlyi konverzió, mely tekintetében nincs különbség az alkoholfelesleg mértékében. Bár arra lehetne számítani, hogy a nagyobb alkoholfelesleg a termékképződés irányába tolja el a reakciót, de ez nem, illetve igen kismértékben következik be.



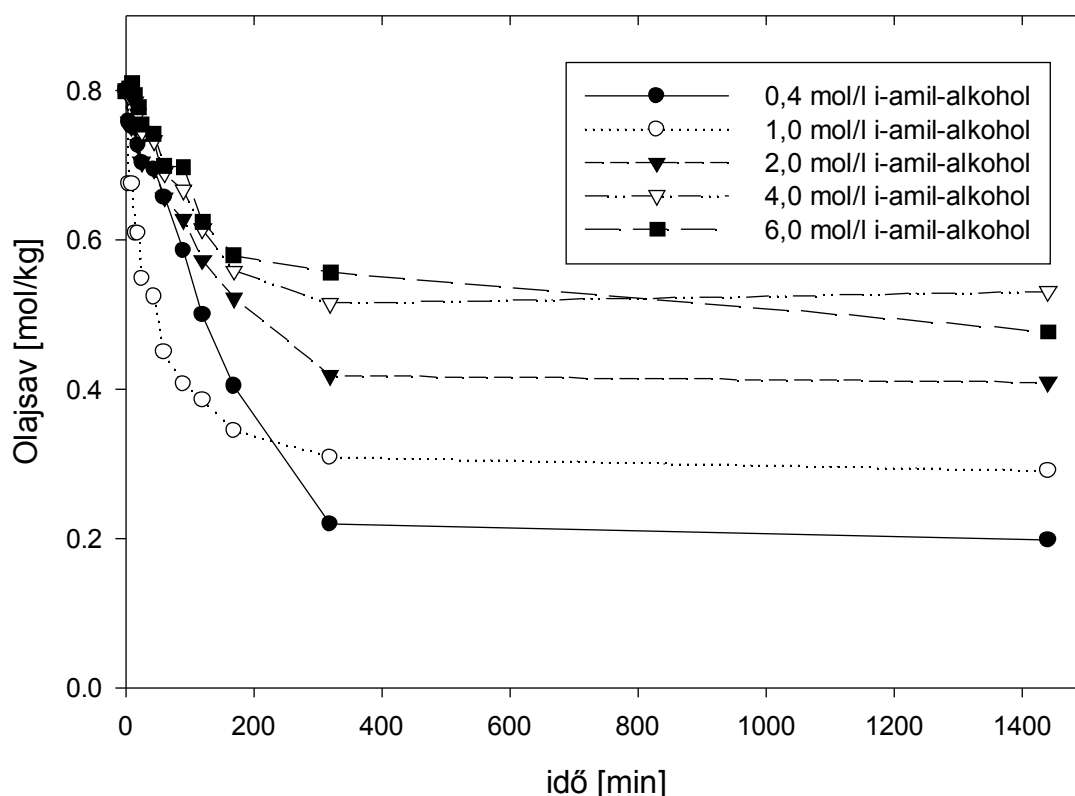
4.2.1. ábra: Az olajsav koncentráció változása a reakció az idő függvényében 0,2 mol/l (0,33 mol/kg) kiindulási koncentrációnál

A kezdeti változás a közepes alkohol koncentrációk (1-2 mol/l) esetében a leggyorsabb, bár a különbségek ezen koncentráció tartományban nem nagyok, illetve az alkoholfelesleg igen jelentős, rendre 2-, 4-, 8-, 16- és 24-szeres az olajsavhoz képest.

A 4.2.2. és a 4.2.3. ábrán a 0,5 és a 1,0 mol/l kiindulási olajsav koncentrációhoz tartozó reakciók időbeli lefutását ábrázoltam.

Látható, hogy nagyobb kezdeti olajsav-koncentrációknál a kialakuló egyensúlyi konverzió már jelentősebb mértékben függ a kezdeti alkohol koncentráció értékétől, mint ahol az alkohol igen nagy feleslegben volt (itt a feleslegek rendre: 0,8-, 2-, 4-, 8- és 12-szeresek).

Minél nagyobb az alkohol felesleg, annál nagyobb a kialakuló végleges, egyensúlyi konverzió. A reakció lefutásában már nem ennyire egyértelmű a trend, a közepső értékeknel a legnagyobb a sebesség. Az itt látható különbségek is nagyobbak, mint a legkisebb 0,2 mol/l kiindulási olajsav koncentrációnál megfigyelhető értékek.

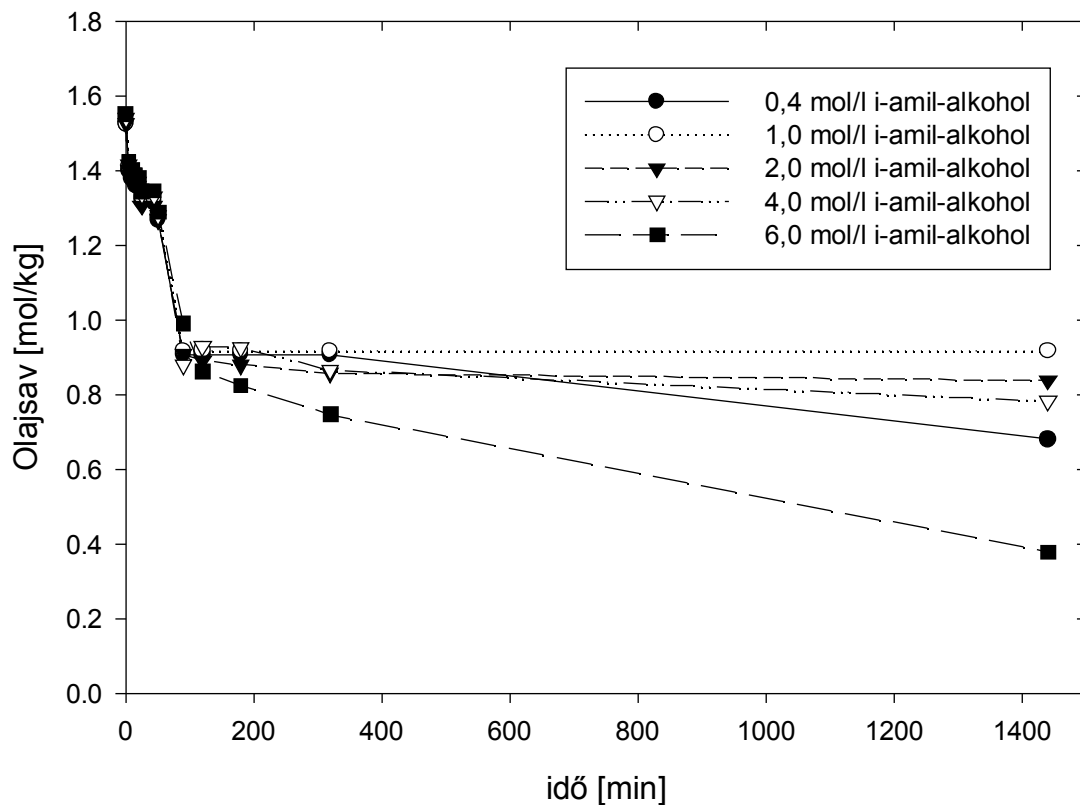


4.2.2. ábra: Az olajsav koncentráció változása az idő függvényében 0,5 mol/l (0,81 mol/kg) kiindulási koncentrációnál

A reakció ennél a mérési sorozatnál volt a leggyorsabb, már a hatodik óra után elérte az egyensúlyt, és az olajsav koncentrációja a továbbiakban nem változott.

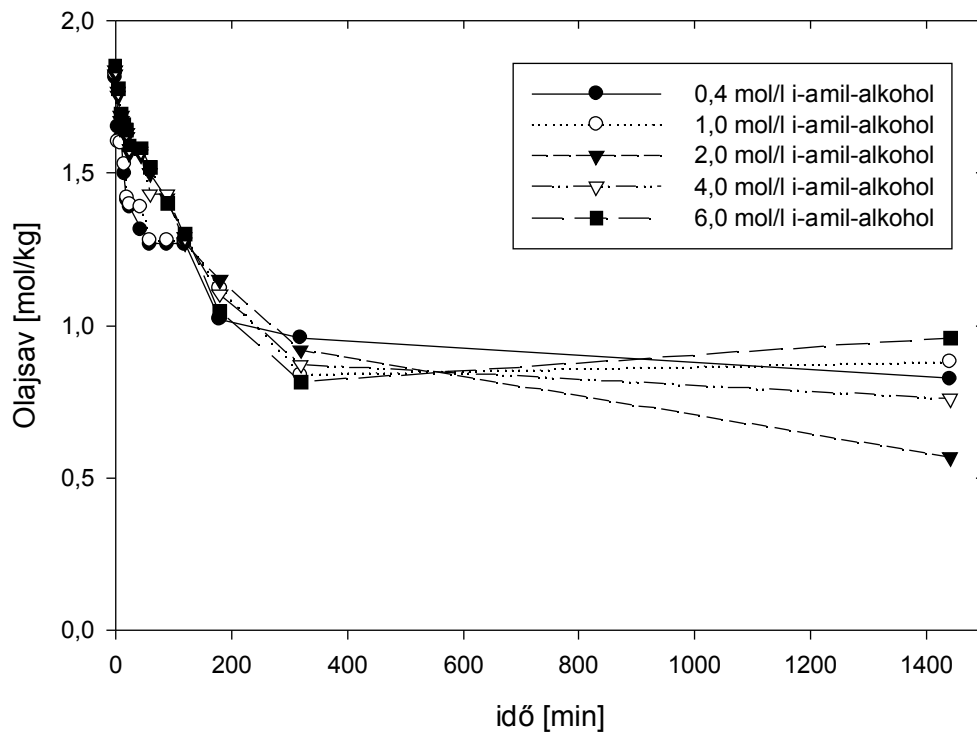
A 4.2.3. ábrán ismételt megfigyelhető a 0,5 mol/l koncentrációnál látható jelenség. A legfőbb különbség az 1,0 mol/l-es koncentrációnál lezajló reakció esetében, hogy a nagyobb mennyiségű olajsav hosszabb idő alatt reagál el az alkohollal, melynek feleslege itt 0,4-, 1-, 2-, 4- és 6-szoros.

A reakció lefutásának kezdeti szakasza itt is hasonló az előzőekhez, a közepes koncentrációknál a legnagyobb, de a különbségek kisebbek, mint ami a 0,5 mol/l-es koncentrációnál volt tapasztalható.

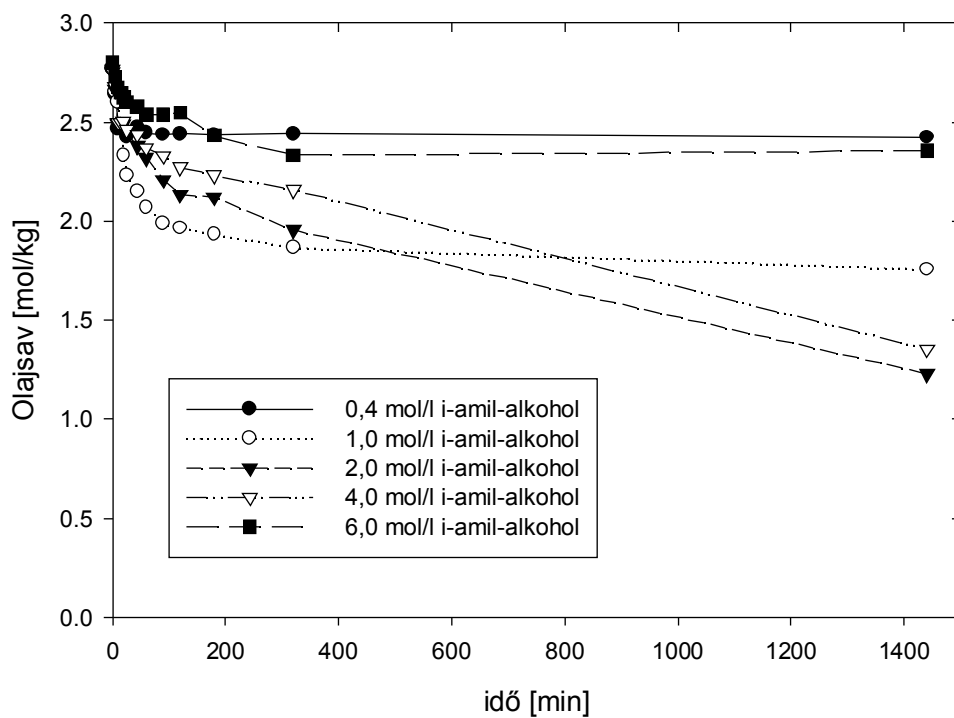


4.2.3. ábra: Az olajsav koncentráció változása az idő függvényében 1,0 mol/l (1,58 mol/kg) kiindulási koncentrációnál

A 4.2.4. és a 4.2.5. ábrán a 1,5 és a 2,0 mol/l kiindulási olajsav koncentrációhoz tartozó reakciók lefutását ábrázoltam. Látható, hogy a magasabb kezdeti olajsav koncentráció esetén más jellegű lefutást tapasztalunk. A fő különbség, hogy az itt kialakuló egyensúlyi koncentrációk esetében a közepes koncentrációknál találjuk a legkisebb értékeket. A jelenséget magyarázhatja, hogy itt már igen magas termékkoncentrációk alakulnak ki, így ezek hatása az egyensúlyra igen jelentős.



4.2.4. ábra: Az olajsav koncentráció változása az idő függvényében 1,5 mol/l (1,98 mol/kg) kiindulási koncentrációnál



4.2.5. ábra Az olajsav koncentráció változása az idő függvényében 2,0 mol/l (2,8 mol/kg) kiindulási koncentrációnál

Összefoglalva a mérési eredményeket megállapítható, hogy az egyes kiinduló olajsav koncentrációk esetén a kiinduló alkoholkoncentráció növelésével változik a reakciók lefutása, és az elérhető egyensúly is. Úgy tűnik, hogy az olajsav és az i-amil-alkohol aránya és koncentrációja egyaránt befolyásolja az enzimes reakciót. Az adatok alapján végzendő részletes kinetikai elemzés tárja fel e viselkedés részleteit, hátterét.

4.2.2. Kinetikai paraméterek meghatározása

Az olajsav és i-amil-alkohol szerves oldószerben való lipázos észterezésének kinetikai vizsgálatánál – a rendelkezésre álló irodalmat figyelembe véve – várhatóan nehézséget okozhat a szubsztrátok esetleges gátló hatása, amire külön gondot kell fordítani, mivel az általam vizsgált tartomány minden eddigi publikációban közölnél szélesebb. Ezért a gátló hatások mindenképpen megnyilvánulnak, nem fedik el azokat az esetleges lineáris szakaszok.

Figyelembe kell venni, hogy az általam használt Novozym 435 *Candida antarctica* lipáz rögzített, így meg kell vizsgálni, nem alakul-e ki diffúziós gátlás, és így tulajdonképpen nem a reakció, hanem a diffúzió kinetikáját jellemző sebességeket tapasztalunk.

Az olajsav és i-amil-alkohol lipázos észterezése során nyert adatok alapján az eredmények kiértékelésének első lépése, a kezdeti reakciósebesség (v_0) meghatározása. Ez alatt azt az időpontban mérhető reakciósebességet értjük, amikor az enzim-szubsztrát komplex koncentrációja állandó.

A kezdeti sebesség meghatározását minden pontban elvégeztem a Gregory-Newton (függelék) módszer alapján. Az így meghatározott értékeket átszámítottam 1 g enzimekészítmény / l koncentrációra vonatkoztatva. A számításhoz felhasználtam, hogy minden kísérletnél meghatároztam a reakcióelegy tömegét így az enzimek koncentrációt g/kg formában is ismertem. Tehát az irodalmi értékekkel is jól összehasonlítható adatokat mol/kg s értékek g/kg-os enzimek koncentrációval, való osztásával nyertem kiküszöbölve a reakció folyamán változó sűrűség hatását is. Az eredményeket a 4.2.3.-ös táblázatban foglaltam össze.

4.2.3. táblázat: A kezdeti reakciósebességek [$\mu\text{mol/s g készítmény}$] az illesztett egyenesek szórása (r^2 0,0997)

alkohol sav	0,4 mol/l	1,0 mol/l	2,0 mol/l	4,0 mol/l	6,0 mol/l
0,2 mol/l	4,9	5,13	5,45	5,57	3,5
0,5 mol/l	7,9	7,91	8,26	7,13	7,3
1,0 mol/l	9,68	12,56	12,8	9,69	10,8
1,5 mol/l	11,25	15,15	18,45	15,3	13,7
2,0 mol/l	9,78	14,46	17,65	14,5	14,3

A táblázatból látható, hogy a legnagyobb mért reakció sebesség a 2,0 mol/l-es i-amil-alkohol és a 1,5 mol/l –es olajsav koncentrációnál volt mérhető, értéke 18,45 $\mu\text{mol/s g}$ biokatalizátor értéknek adódott.

Mivel a reakcióban rögzített lipáz enzimet használtam, fontos megvizsgálni, hogy a kialakult reakciósebességek valóban az enzimes reakcióra jellemző értékek vagy a folyadékfázisból a szilárd rögzített fázishoz történő diffúzió sebességei.

A reakció és a diffúzió két párhuzamosan fellépő jelenség, amelyik folyamat sebessége lassabb, az lesz a sebesség-meghatározó folyamat. Rögzített lipáz használatakor általában nem jellemző, hogy a folyadék-szilárd diffúzió sebessége lenne a meghatározó [Letisse, 2003].

Azt, hogy méréseimnél melyik lépés a sebesség-meghatározó, a Wiesz-Prater kritérium szerint Yadav módszerével [Yadav, 2002] vizsgáltam meg. A módszer alapja, két relaxációs idő kiszámítása és összehasonlítása. A biokatalízis sebességére jellemző relaxációs idő t_r és a diffúziót jellemző t_d aránya megmutatja, hogy az adott reakcióban az enzimkatalizált reakció vagy a diffúzió a meghatározó tényező.

Az egyes relaxációs paramétereket a következőképp definiáljuk:

$$t_r = \frac{C_0}{r(C_0)} \quad (4.2.1.)$$

$$t_d = \frac{D}{(k_{SL})^2} \quad (4.2.2.)$$

ahol az egyes paraméterek:

- C_0 : a folyadék fázisban mérhető szubsztrákoncentráció (mol/l)
- $r(C_0)$: a reakciósebesség (mol/ l s)
- D : a szubsztrát diffúziós tényezője a szerves fázisban (cm²/s)
- k_{SL} : a szilárd-folyadék anyagátadási tényező (cm/s)

A két szubsztrát közül a várhatóan lassabban diffundáló olajsav értékét vettem figyelembe C_0 és $r(C_0)$ értékeit a 4.2.3. táblázat maximális értékeinek választottam:

$C_0=1,50$ mol/l (az a koncentráció ahol a legnagyobb reakciósebesség volt mérhető)
 $r(C_0) =7,38 \cdot 10^{-6}$ mol/l s (a legnagyobb mért reakciósebesség [a kísérletekben a biokatalizátor koncentrációja 0,4 g/l-es volt így $r(C_0)=v_{max} \cdot C_{biokatalizátor}$])

$$t_r = \frac{C_0}{r(C_0)} = 2^5 s \quad (4.2.3.)$$

A szubsztrát (olajsav) diffúziós állandóját (D) n-heptánban Shibel nyomán határoztam meg [Perry, 1984]:

$$D = k \frac{T}{\eta_B V_S^{1/3}} \quad (4.2.4.)$$

Ahol:

- k : állandó $17,5 \cdot 10^{-8}$
- η_B : az oldószer viszkozitása [n-heptán 60 °C-on 0,47 mPa (cP)]
- T : hőmérséklet [333 °K]
- V_S : moláris térfogatsűrűség.

A moláris térfogatsűrűséget a kritikus térfogat (V_c) alapján becsültem

$$V_s = 0,285V_c^{1,048} \quad (4.2.5.)$$

Az olajsav kritikus térfogata 1152 cm³/mol így, a moláris térfogat sűrűség 460 cm³/g mol-nak adódott.

Így a diffúziós tényező értéke: 1,61.10⁻⁵ cm²/s

A folyadék-szilárd anyagátadási tényező pedig a Sherwood szám alapján meghatározható, a diffúziós koefficiens és az enzimmögztetéshez felhasznált részecske mérete segítségével(külső diffúziós tényező):

$$k_{SL} = 2D/d, \quad (4.2.6.)$$

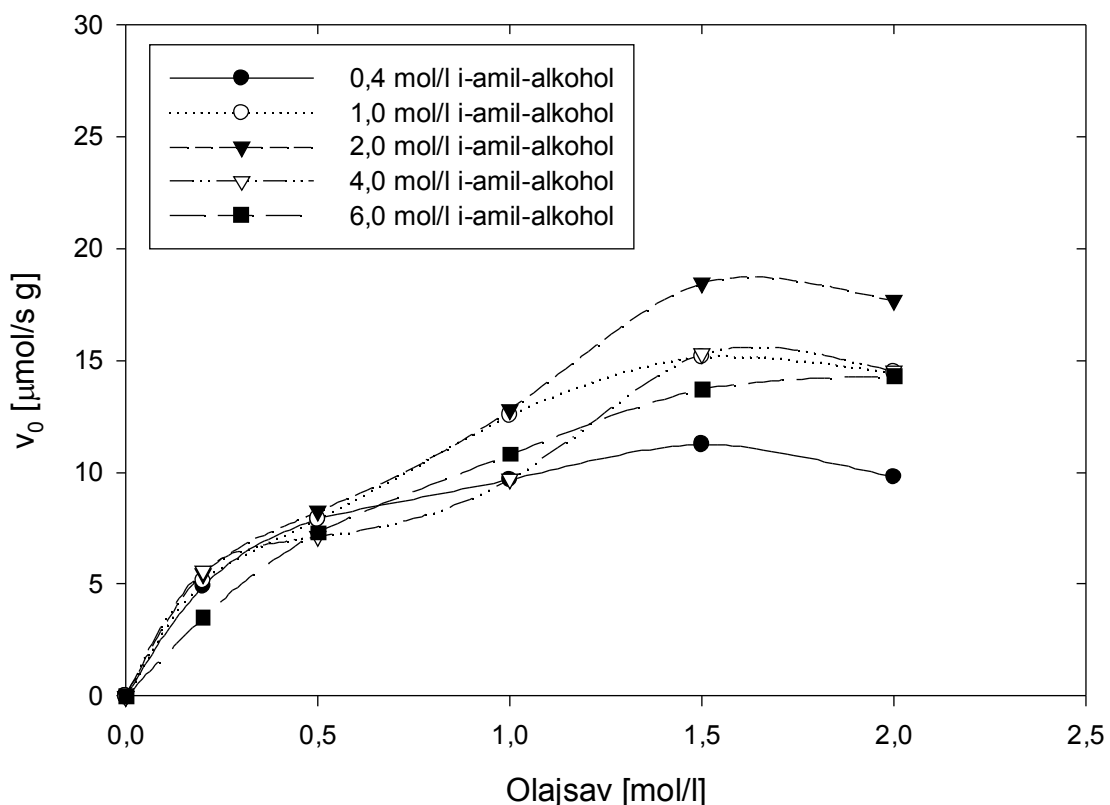
ahol d a részecske átmérője. A Novozym 435 enzimmészítmény átlagos átmérője 0,06 cm, az egyes részecskék átmérője a 0,03 és a 0,09 cm között változik. A folyadék-szilárd anyagátadási tényező így 5,3 . 10⁻⁴ cm/s értékűnek adódott.

Tehát a diffúzióra jellemző relaxációs idő állandó értéke:

$$t_d = \frac{D}{(k_{SL})^2} = \frac{1,61 \cdot 10^{-5} \text{ [cm}^2 \text{ /s]}}{(5,3 \cdot 10^{-4} \text{ [cm/s]})^2} = 55,9 \text{ s} \quad (4.2.7.)$$

Azaz a folyamatban a diffúzió sebessége három nagyságrenddel nagyobb, mint az enzimmkatalizált reakcióé. Így a későbbiekben meghatározott reakcióparaméterek nem látszólagosak, hanem valóban az enzimmreakcióra jellemzőek.

A 4.2.3. táblázat adatait szemléletesebb módon, ábrákon is bemutatom. Az első ilyen összeállítás a 4.2.6. ábrán látható. Az egyes kezdeti reakciósebességeket az olajsav-koncentráció függvényében ábrázoltam.

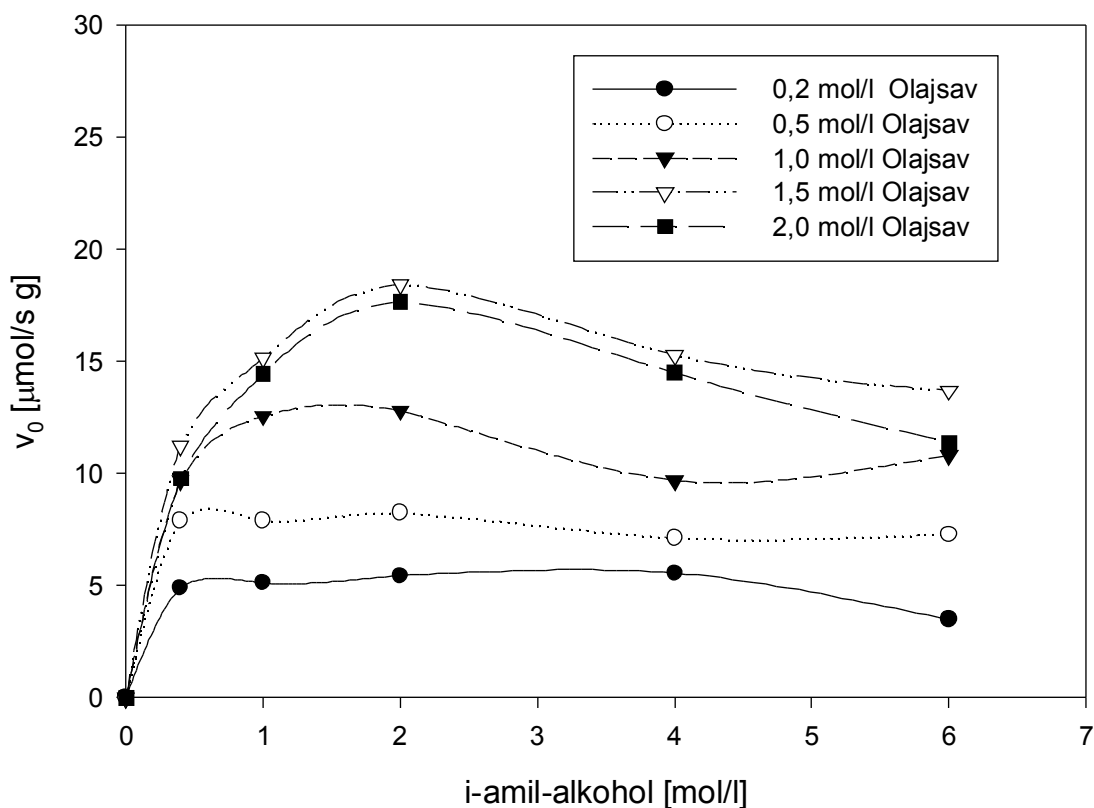


4.2.6. ábra: A kezdeti reakciósebességek a kiinduló olajsav-koncentráció függvényében

Látható, hogy az olajsav koncentráció növelésével a kezdeti reakciósebesség a 0,5 mol/l olajsav koncentráció tartományig egyenletesen növekszik, ennél nagyobb koncentrációknál gátlási jelenséget tapasztaltam.

A hatások mértéke eltérő az i-amil-alkohol koncentráció mértékétől függően, a legnagyobb reakciósebességet az 1-2 mol/l i-amil-alkohol koncentrációnál tapasztaltam. A legalacsonyabb értékek a magas, 4-6 mol/l alkohol koncentrációnál láthatóak.

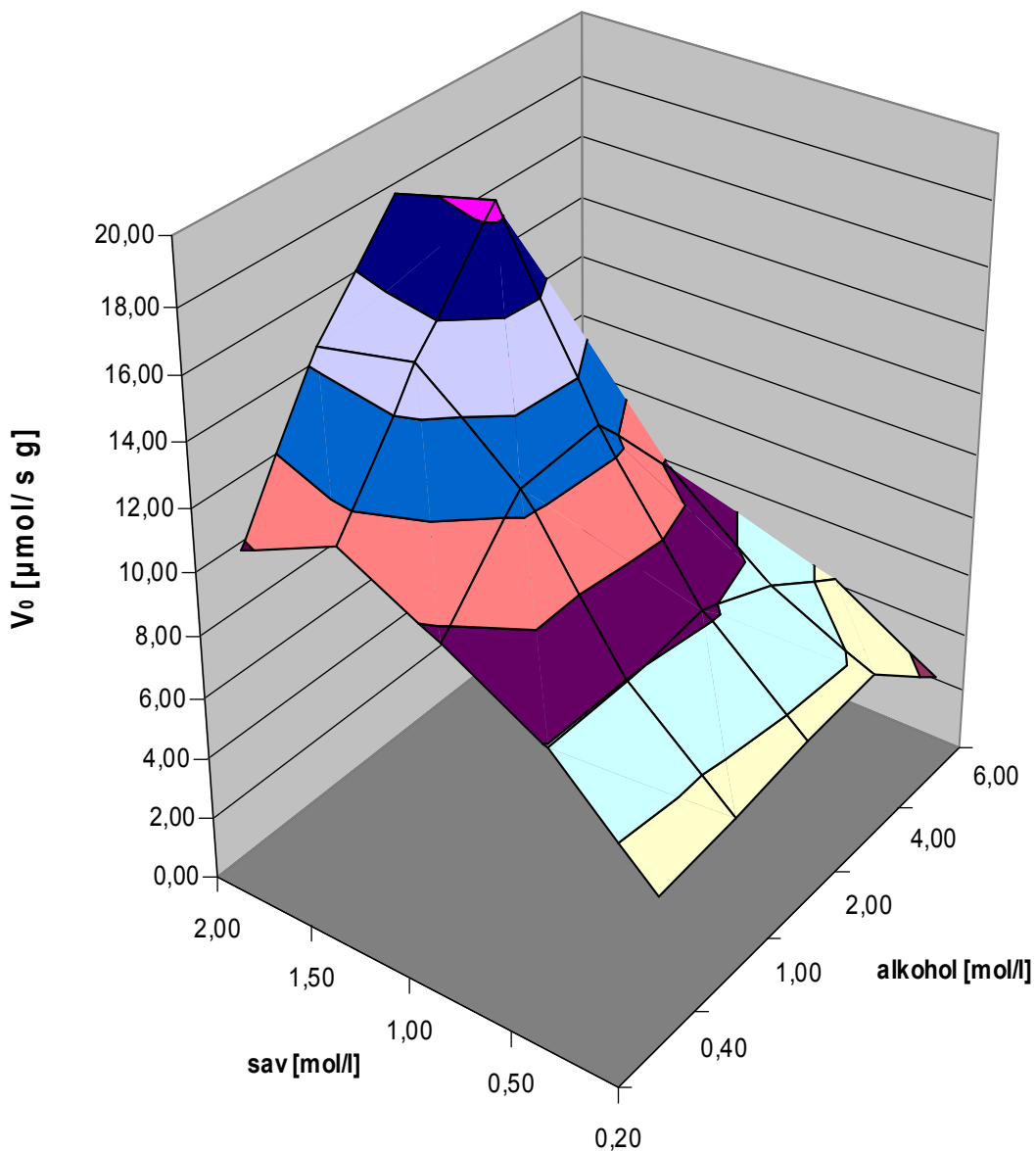
A 4.2.7. ábrán a kezdeti reakciósebességeket az i-amil-alkohol koncentráció függvényében ábrázoltam. Látható, hogy az így megfigyelhető gátlások már sokkal jelentősebbek, mint az olajsav koncentráció függvényében látható sebességváltozások.



4.2.7. ábra: A kezdeti reakciósebességek az i-amil-alkohol koncentráció függvényében

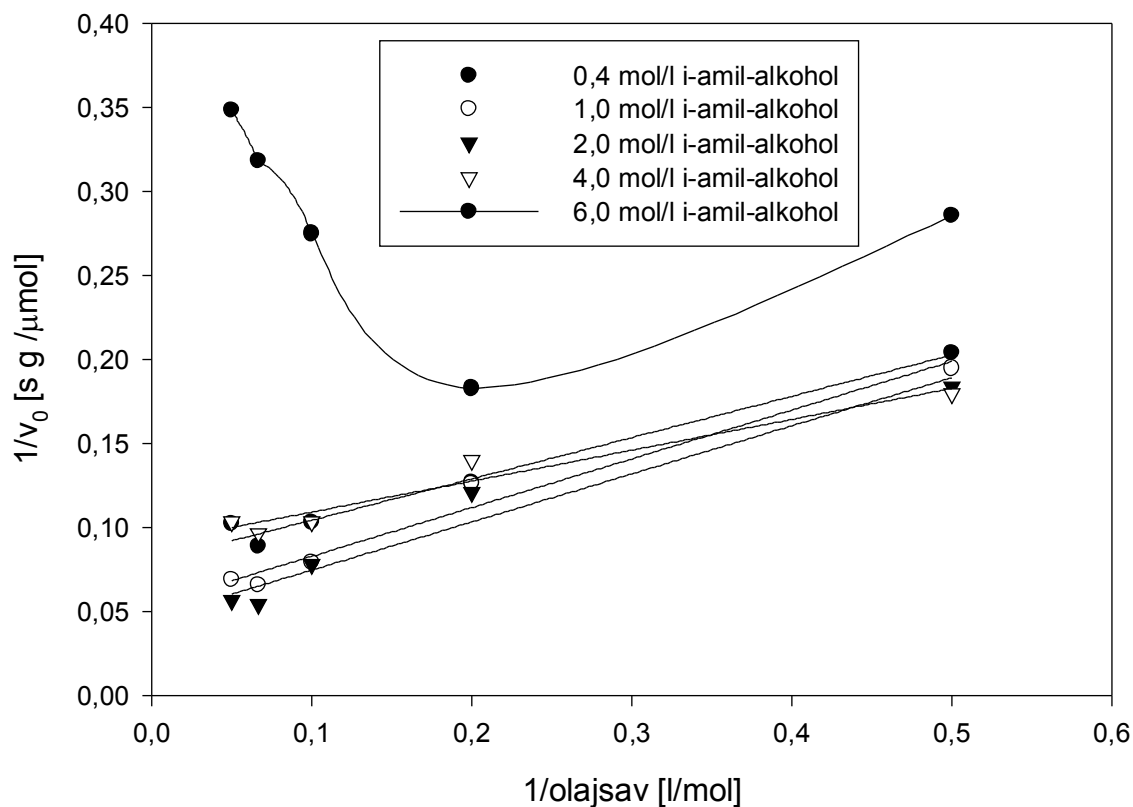
Megfigyelhető, hogy a legnagyobb reakciósebességek itt is a legmagasabb olajsav koncentrációknál alakultak ki. Az i-amil-alkohol koncentrációját növelve 1-2 mol/l-ig a reakciósebesség növekszik, majd beáll egy adott értékre. Később és főleg nagyobb olajsavkoncentrációnál csökken, ez a csökkenés igen jelentős mértékű, akár végponti gátlásig is növekedhetne, ha 6 mol/l koncentrációnál töményebb oldatot vizsgálnánk. Ilyen koncentrációban azonban már nem tehetünk hozzá olajsavat a rendszerhez, mivel az szobahőmérsékleten meghaladná a tiszta olajsav koncentrációját.

Az olajsav és az i-amil-alkohol koncentráció hatását a kezdeti reakciósebességre vizsgálhatjuk egy közös ábrán is. Így egy háromtengelyes koordináta-rendszerben vehetők fel az adatok. A két vízszintes tengelyen a szubsztrátkoncentrációkat, míg a függőleges tengelyen a kezdeti reakciósebességet ábrázoltam (4.2.8. ábra).



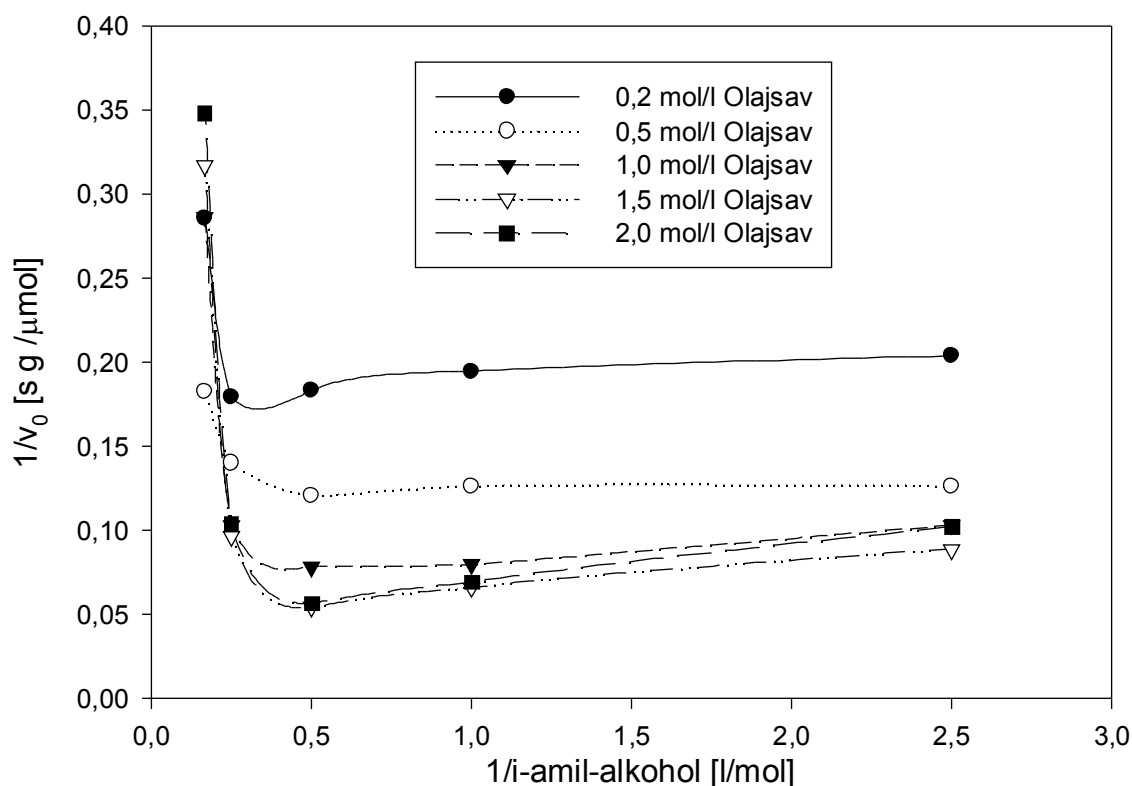
4.2.8. ábra: A kezdeti reakciósebességek az i-amil-alkohol és az olajsav koncentráció függvényében

Az egyes hatások vizsgálatához a tradicionális linearizálási módszereket kell első lépésként alkalmazni. A 4.2.9. és a 4.2.10. ábrán a kezdeti reakciósebesség reciprokát az olajsav illetve az i-amil-alkohol koncentráció reciprokának függvényében ábrázoltam.



4.2.9. ábra: A kezdeti reakciósebesség reciproka az olajsav koncentráció reciprokának függvényében

Látható, hogy kisebb i-amil-alkohol koncentrációknál közel lineáris az összefüggés, míg magasabb koncentrációknál az aszimptotához simuló logaritmus alakú a görbe. Úgy tűnik, hogy görbék párhuzamos lefutásúak, így a reakció kinetikai paraméterek így módon nem becsülhetők, ezért azok megállapításához a modellalkotás után analitikai módszert kell alkalmazni. A reakció mechanizmusára, az egyenesek párhuzamosságából a ping-pong bi-bi modellre lehet következtetni, amit az i-amil-alkohol koncentráció reciprokának függvényében ábrázolt olajsav fogyási sebességek szerint elkészített 4.2.10. ábra megerősít.



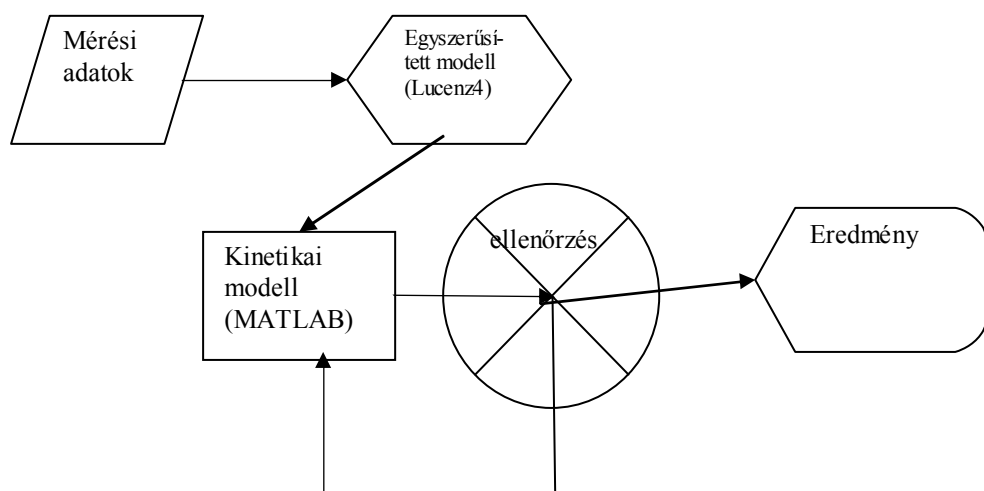
4.2.10. ábra: A kezdeti reakciósebesség reciproka az i-amil-alkohol koncentráció reciprokának függvényében

Megállapítható, hogy a nagy i-amil-alkohol koncentrációknál egyértelműen gátlás lép fel. Mivel az olajsav is gyenge gátlást fejt ki, ezért grafikus módon az egyes paraméterek nem határozhatóak meg, és a gátlás mechanizmusa sem tisztázható egyértelműen.

A 2.4. fejezetben a bi-bi ping-pong mechanizmus leírására több modellt is ismertettem, ezek közül egyszerűsége és jó alkalmazhatósága miatt a négyparaméteres modellt alkalmaztam a lipázos észterezéshez, s ezek sebességi állandóit határoztam meg.

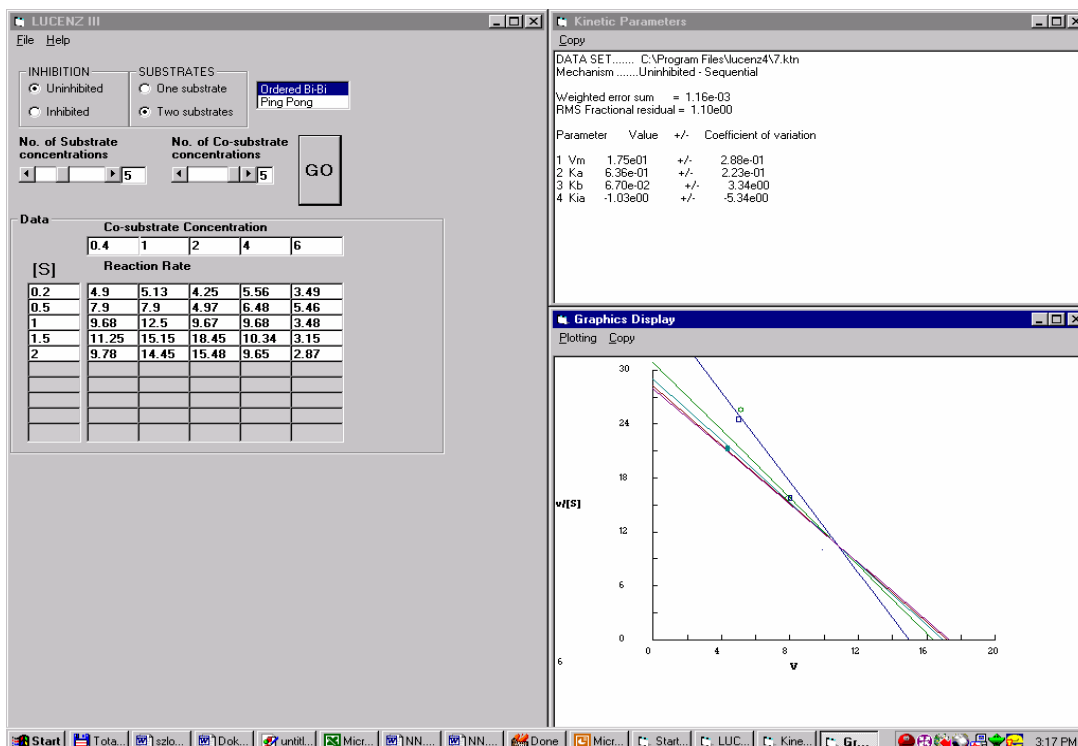
A kinetikai paraméterek meghatározására a simplex módszer egyik változatát használtam, mely a matlab programba van beépítve. A Neilder-Niemand módszer nem olyan robusztus és gyors, mint az eredeti simplex módszer és a paraméterek kezdeti értékeire is kényesebb, de sokkal pontosabb annál.

Mivel a módszer érzékeny a paraméterek kiindulási értékeire, ezért ezeket külön egy erre a célra szolgáló programmal becsültem. Így a módszer egyik hátrányát, az instabilitást kikerültem. A rendszer elvi sémáját a 4.2.11. ábrán mutatom be.

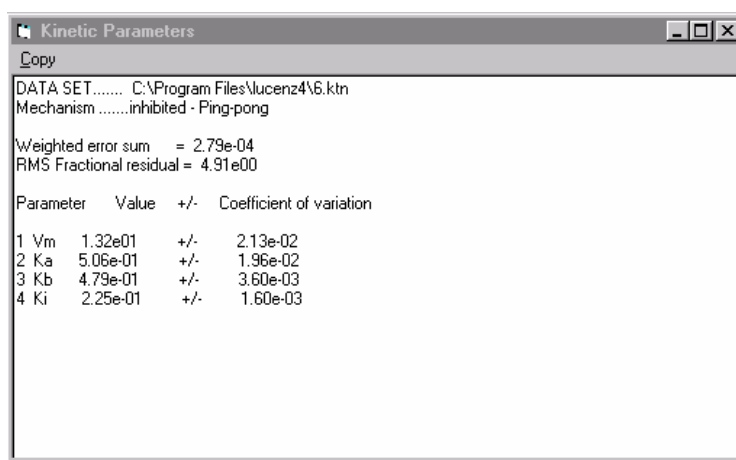


4.2.11. ábra: A kétlépcsős paraméter meghatározás sémája

A Lucenz4 egy kifejezetten bi-bi reakciók linearizáláson alapuló elemzésére kifejlesztett program. Mivel a Lucenz4 nem alkalmas olyan reakciómechanizmusok vizsgálatára, melyekben valamely szubsztrátnak gátló hatása van, ezért a becsléshez csak a gátlás nélkül is alkalmazandó paramétereket becsültem. A linearizálással nyert ábrákat a 4.2.12. ábrán mutatom be, míg a becsült paramétereket és a maradó hibákat a 4.2.13. ábrán adom meg.



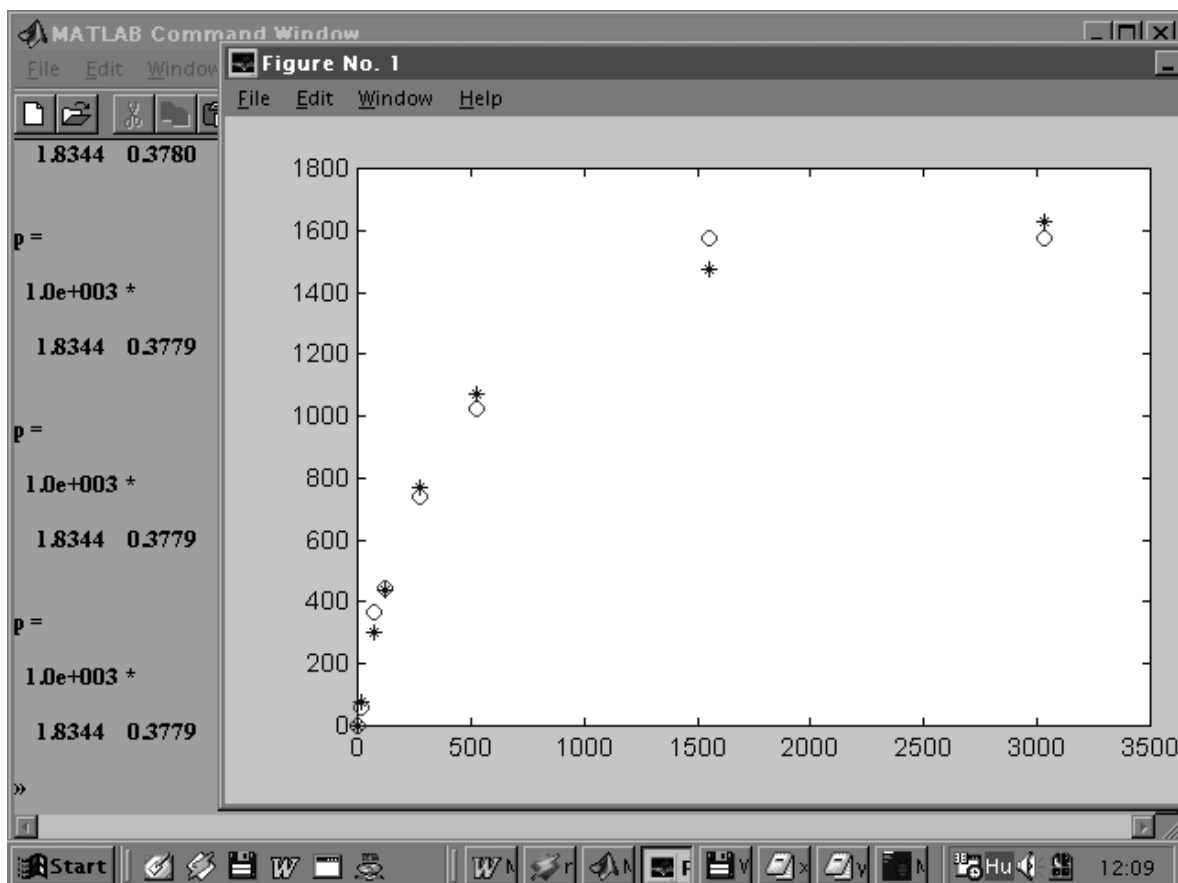
4.2.12. ábra: A Luzenz4 program által számolt lienealizált ábrák



4.2.13. ábra: A Luzenz4 program által meghatározott paraméterek

Az így nyert kiindulási adatokkal és egy, a K_{AB} felének megfelelő K_{BI} -vel becsültem meg a paramétereket a matlab programmal. A programot és annak működését a 4.2.14. ábrán mutatom be. A becslés során egyszerre csak egy, konstans savkoncentrációnál végeztem illesztést, mivel ha egyszerre kíséreltem meg elvégezni a feladatot, az divergenciához vezetett, vagy az így meghatározott értékek matematikailag jó megoldást adtak, de valós reakciókinetikai értelemben nem voltak értelmezhetők (negatív V_{max}). Ezért minden

savkoncentrációnál meghatároztam az optimális paramétereket és a hibákat, majd egy újabb hasonló programmal az összegzett hiba értékét minimalizáltam. Az így nyert eredményeket a 4.2.4. táblázatban mutatom be a három és az ötparaméteres modellel összehasonlítva.



4.2.13. ábra: A matlab program működés közben, a karikák jelölik a mért értékeket, a csillagok a program által számoltakat

4.2.5. táblázat: A kinetikai modellek paramétereit

Paraméterek	Három paraméter	Négy paraméter	Öt paraméter
V_{\max}	23,5 $\mu\text{mol/s g}$	30,8 $\mu\text{mol/s g}$	29,9 $\mu\text{mol/s g}$
K_A	0,86 mol/l	0,65 mol/l	0,55 mol/l
K_B	0,19 mol/l	3,2 mol/l	2,7 mol/l
K_{BI}	-	0,58 mol/l	0,53 mol/l
K_{AB}	-	-	0,055 mol/l
r^2	0,952	0,975	0,975

Megállapítható, hogy a négyparaméteres, gátló hatásokat is figyelembe vevő modell jobban leírja az olajsav i-amil-alkoholból történő enzimes észterezésének kinetikáját a vizsgált tartományban, mint a háromparaméteres egyenlet. Az ötparaméteres Jansen által is javasolt modell [Jansen 1996] azonban nem pontosabb, mint a négyparaméteres, ezért alkalmazása nem indokolt.

A modell eredményeket összehasonlítva a mért adatokkal, igen jó egyezést tapasztalhattunk, a maradék hiba a legkisebb négyzetek szerint becsülve mindösszesen (RMS) 3 század, ami sokkal pontosabb egyezés, mint eddig az irodalomban megállapított eredmények [Gracia, 1996]. A pontosabb eredményeket részben az eltérő analitikai megoldás, részben a kétlépcsős paraméter-meghatározás eredményezheti.

4.2.5. táblázat: A négyparaméteres kinetikai modell paramétereinek összehasonlítása (másodpercre átszámolva)

Paraméter	Saját mérések i-amil-oleát	Szabad enzim etil-oleát [Oliveira, 2001]	Rögzített enzim etil-oleát [Oliveira, 2001]
V_{\max}	30,8 $\mu\text{mol/s g}$	0,015 $\mu\text{mol/s g}$	22,27 mmol/s g
K_A	0,65 mol/l	1,80 mol/l	1,16. 10^{-8} mol/l
K_{IB}	0,58 mol/l	0,396 mol/l	9,46. 10^7 mol/l
K_B	3,2 mol/l	1,79 mol/l	1,2 mol/l

A 4.2.5. táblázat alapján megállapítható, hogy az olajsav i-amil-alkohollal történő enzimes észterezésekor meghatározott paraméterek a szabad enzimmel végzett etil-oleát előállításánál mérhető paraméterekkel hasonlíthatóak össze. Megvizsgálva Oliveira rögzített enzimmel meghatározott paramétereit, látható, hogy az tulajdonképpen egy pseudo egyszubsztrátos reakcióra jellemző, hiszen K_A és K_{IB} a meghatározott értékekkel gyakorlatilag nullad-rendűnek tekinthető. Az általam meghatározott paraméterek szerint,

mind az olajsav, mind az i-amil-alkohol hatással van a reakció kezdeti sebességére. Az alkohol gátló hatása nem olyan erőteljes, mint azt Oliveira-ék szabad enzimmel végzett kísérleteiknél meghatározták, de nagyságrendekkel magasabb, mint a rögzített enzim esetében tapasztaltak.

Az eltérés oka lehet, hogy Oliveira kísérleteiben igen szűk tartományt vizsgált, ha az általam végzett kísérleteket leszűkítem az ő tartományukra, az olajsav hatása itt is kisebb, bár még mindig kimutatható.

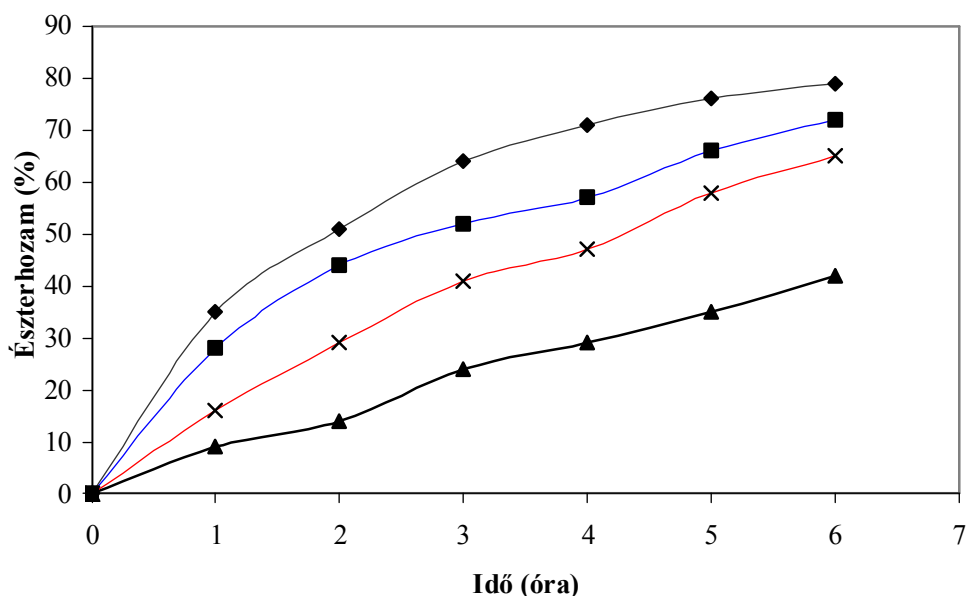
Ha a teljes reakció lefutását vizsgáljuk, eltérést tapasztalunk a modellel meghatározott és a mért görbék alakja között. Ez a termékek hatásának tulajdonítható. A termékek hatása a kezdeti reakciósebességre nem jelentős, mivel a koncentrációjuk a reakció kezdetén nulla illetve a vize állandó. A reakció előrehaladásával szerepük azonban egyre meghatározóbb.

4.2.3. A víz hatása

A kinetikai mérések által nyert adatok felhasználása szempontjából az egyes termékek hatása is fontos. Ha a termékeket is figyelembe vevő 5 vagy 6 paraméteres modellt használjuk, a már meghatározott paramétereket is újra meg kell határozni. Viszont az így meghatározott értékek már jóval nagyobb matematikai bizonytalanságot hordoznak a modell sajátosságai miatt. A víztartalom hatását azonban, ettől eltérően, egyfajta aktivitás csökkenésként is vizsgálhatjuk az adott rendszerben. A négyparaméteres modell így tovább használható, a sebességi állandók értékei is felhasználhatóak.

A víztartalom igen fontos faktor a lipáz katalizálta reakcióknál, és az enzimműködésre sokféleképpen hat. A túl alacsony víztartalom általában csökkenti az enzimaktivitást. A magas víztartalom csökkentheti a reakciósebességet. Az optimális vízmennyiség gyakran egy szűk tartományban van. Szerves közegben az enzimek vízigénye nagyon változó; ennek következtében minden egyes enzimet vizsgálni kell különböző hidratációs fokon.

A víztartalom szerepét a reakcióelegyben a 0,1-1,5 %-os tartományban tanulmányoztam (4.2.14. ábra).



4.2.14. ábra: A víztartalom hatása az észter képződésére
Olajsav 1,84 mol/l; i-amil-akohol 3,78 mol/l; hőmérséklet 40 °C;
Novozym 435 0,5 %; rázatási sebesség 150 rpm;
(▲) 0,1 % (m/m); (×) 0,3 % (m/m); (◆) 0,5 % (m/m); (■) 1,5 % (m/m)

Ahogy az 4.2.14. ábrán látható, az észter hozamnak a kiinduló vízmennyiség függvényében maximuma van. Nagyon alacsony víztartalom (0,1 %) esetén a keletkezett észter mennyisége kicsi: ebben az esetben a reakcióelegyben lévő víztartalom nem elég az optimális enzimműködéshez. Növelve a víztartalmat a hozam is nő, és maximális értéket ér el körülbelül 0,5 % kezdeti víztartalom mellett. Ezután az egyre magasabb víztartalom az észterhozam fokozatosan csökkenésével jár, ami azzal a ténnyel magyarázható, hogy magas víztartalomnál az ellenkező irányú reakció, a hidrolízis van előnyben.

Ha ezt a jelenséget a reakciósebesség látszólagos csökkenésének feleltetjük meg, a négyparaméteres modellben szereplő V_{\max} kifejezhető a víztartalom függvényében:

$$V_{\max W} = \frac{V_{\max}}{\exp(C * P + V_{\max W} / 0)} \quad 4.2.8.)$$

Az összefüggésben:

- $V_{\max W}$ az adott víz koncentrációnál elérhető effektív maximális reakció sebesség,
- C a vízkoncentráció változásához tartozó konstans,

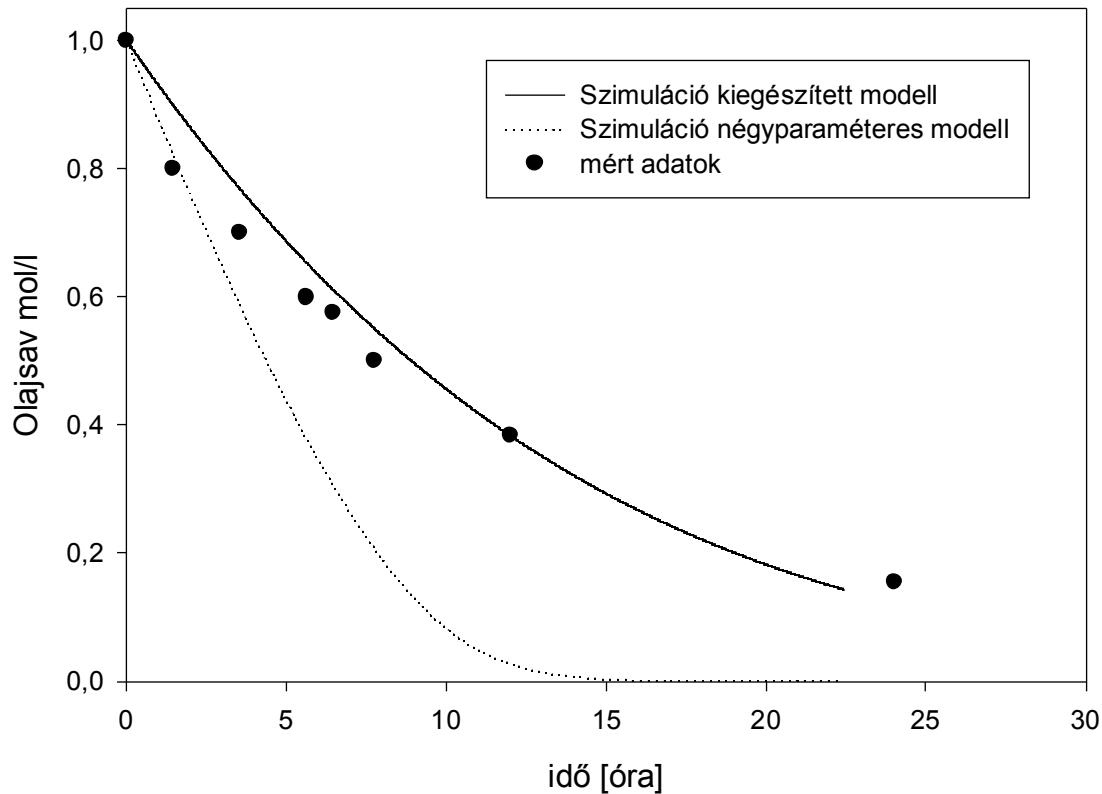
- P a víz koncentrációja a reakció elegyben,
- $V_{\max W_0}$ nulla vízkoncentrációnál mérhető maximális reakció sebesség

A paraméterek illesztését az előző fejezetben ismertetett módon elvégeztem. A meghatározott értékeket a 4.2.6. táblázatban foglalom össze:

4.2.6. táblázat: A görbeillesztés során meghatározott paraméterértékek

V_{\max}	35,6 $\mu\text{mol/s g}$
C	0,25 -
$V_{\max W_0}$	0.001 $\mu\text{mol/s g}$

A fenti paraméterek segítségével egy adott kezdeti i-amil-alkohol és olajsav értékpárhoz tartozó időbeli koncentrációváltozások számolhatóak. Egy ilyen szimuláció eredményeit a 4.3.15. ábrán tüntettem fel.



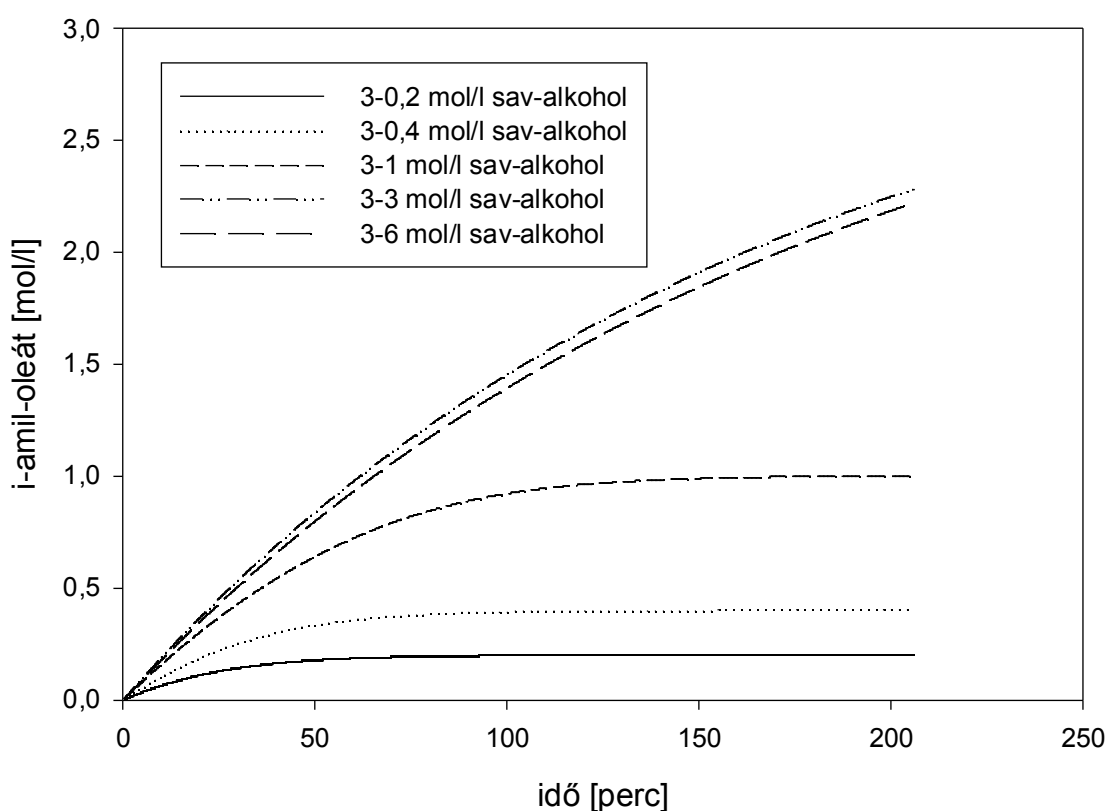
4.2.15. ábra: Az olajsav koncentráció változása a reakcióidő függvényében (1 mol/l olajsav, 1 mol/l i-amil-alkohol)

Megállapítható, hogy egy további paraméter (C) segítségével a víztartalom hatása jól leírható a négyparaméteres modell változatlan alkalmazása mellett. A meghatározott paraméterek az adott koncentráció tartományban pontosan leírják a szubsztrátok és termékek koncentrációjának változását.

4.2.4. A modell gyakorlati felhasználása

A meghatározott kinetikai paraméterek segítségével modellezhetjük a reakciót különböző körülmények között. Meghatározhatjuk az optimális feltételeket az olajsav és az i-amil-alkohol lipázos észterezéséhez.

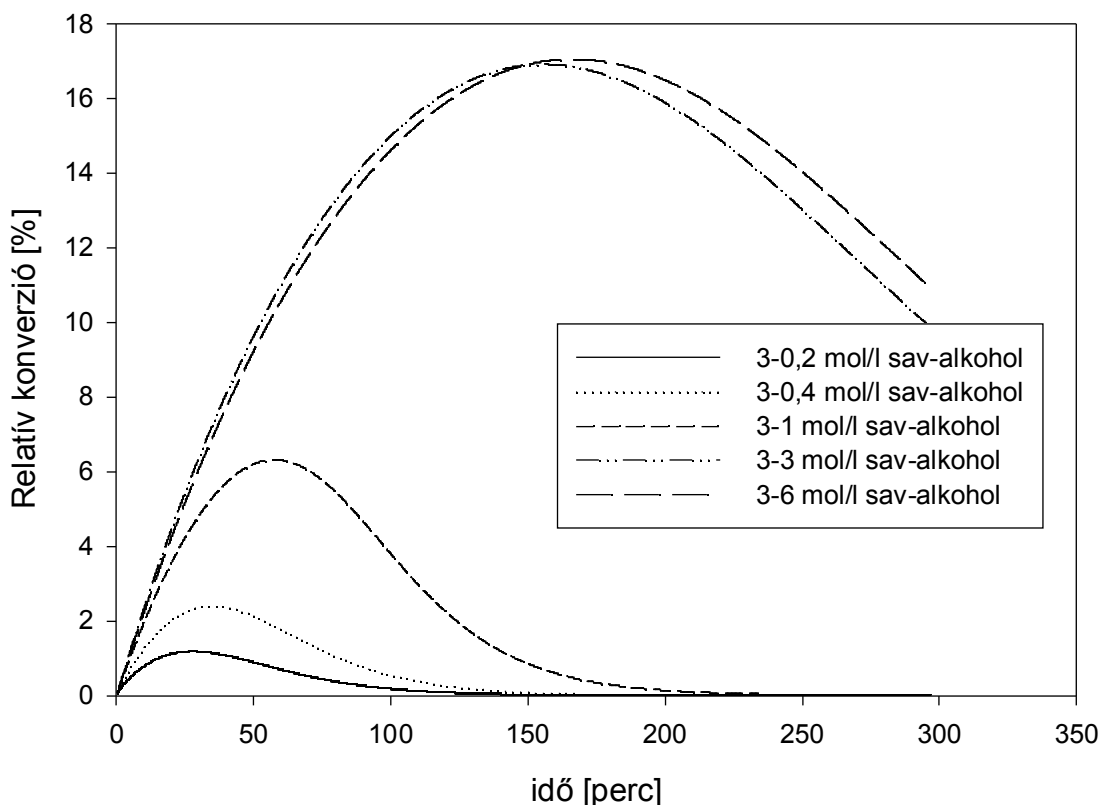
A korábbi tapasztalataim alapján, optimális kezdeti reakciókörülményeket feltételezve egy tökéletesen kevert szakaszos reaktorban, a termékképződést határoztam meg a víz hatását is figyelembe vevő kibővített modell segítségével. A 4.2.16. ábrán láthatóak a lefutások. Az enzimm koncentrációt 1,0 mg/l-esnek választottam, míg az i-amil-alkohol koncentrációját 0,2 és 6,0 mol/l-es érték között változtattam állandó 3,0 mol/l-es olajsav koncentráció mellett. Látható, hogy a leggyorsabb konverzióváltozás sav feleslegében következik be, minél nagyobb a kezdeti alkohol koncentráció, annál jelentősebb az alkohol gátló hatása. A víz gátló hatása az egyaránt nagy alkohol és olajsav koncentrációknál jelentős.



4.2.16. ábra: Konverziók modellezése különböző kiindulási olajsav és i-amil-alkohol koncentrációknál szakaszos reaktorban

Ha a víztartalmat kontrollálni tudjuk a reakció ideje alatt és azt állandó értéken tartjuk, pl. pervaporációs vízeltávolítással, akkor a víz, mint melléktermék gátló hatását kiküszöböljük, így a biokonverzió hatásfoka a vízeltávolítás nélküli rendszerhez képest jelentősen megnövelhető [Gubicza, 2003]. Ha a 4.2.16. ábrán bemutatott szimulációs

paraméterek szerinti rendszert kiegészítem egy „tökéletes” víztávolító rendszerrel és a keletkezett vizet teljesen eltávolítom a rendszerből, a vízkoncentráció értékét így folyamatosan a kezdeti optimális értéken tartva konverzió növekedés tapasztalható. A konverzió növekedését a 4.2.17. ábrán foglaltam össze. Az ábrán a víztávolítással elért hozamok százalékos növekményét tüntettem fel a víztávolítás nélküli modellhez képest.



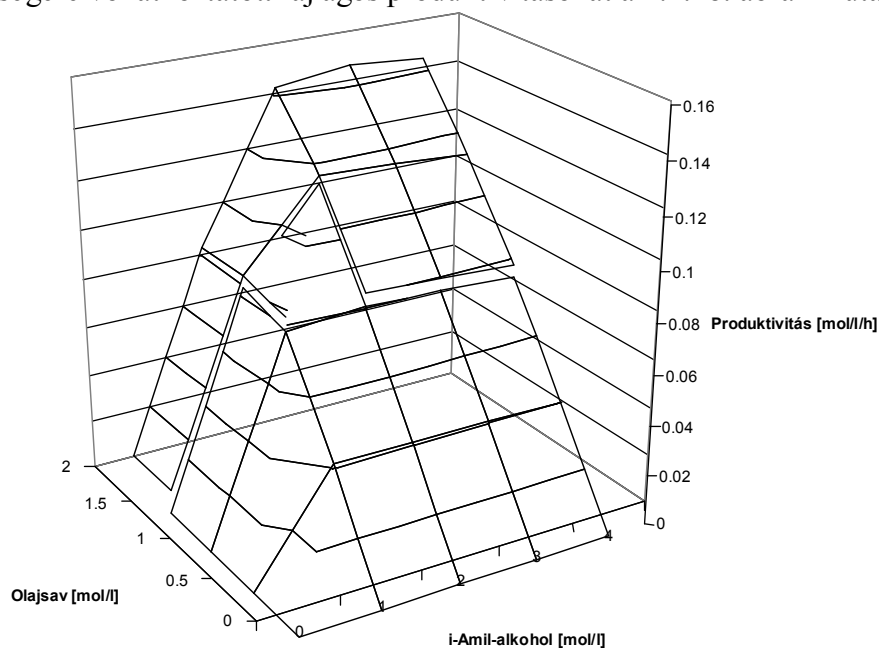
4.2.17. ábra: Relatív konverziónövekedés víztávolítás esetén

Megállapítható, hogy a legnagyobb konverzió növekedés az egyaránt nagy kezdeti olajsav és i-amil-alkohol koncentrációjú reakcióelegyeknél tapasztalható. Ez a víztávolítás jelentőségét a gyakorlati felhasználás szempontjából mutatja, hiszen az ipari gyakorlatban nem célszerű igen híg oldatokkal dolgozni, míg töményebb oldatoknál víztávolítás nélkül a hatékonyság nem volt elegendő. A szimulációs eredmények szerint azonban a reakcióban keletkező víz folyamatos eltávolításával nagyobb szubsztrát-koncentrációjú oldatokban is jó hatékonysággal valósítható meg az enzimes észterezés.

A szerves oldószerben zajló Novozym 435 lipázzal katalizált i-amil-oleát előállításának körülményeit néhány gyakorlati szempont is befolyásolhatja:

- a keletkező biokenőanyag tulajdonságait károsan befolyásolja a reakcióelegyben maradó sav [Dörmő, 2004]
- a Novozym 435 60 °C-on 12 óra alatt aktivitása nagy részét elveszíti [Yadav, 2003]
- a reakcióban használt anyagok közül az enzim készítmény a legdrágább, még ha fajlagos értékeivel is számolunk.

Fenti szempontok figyelembevételével, a víz hatásával kiegészített kinetikai modellt felhasználva meghatároztam a 12 óra alatt elérhető hozamokat különböző kiindulási i-amil-alkohol és olajsav koncentrációk mellett, folyamatos vízeltávolítást feltételezve (pl. pervaporációs módszerrel). A reakcióban használt enzim mennyiségét úgy választottam meg, hogy a maradó sav koncentrációja kevesebb mint 5 % legyen a szimuláció végén. Az elért enzim mennyiségére vonatkoztatott fajlagos produktivitásokat a 4.2.18. ábrán mutatom be



4.2.18. ábra: A 12 óra reakció idő alatt elérhető produktivitások

Látható, hogy a szubsztrát koncentrációk növelése kezdetben növeli az elérhető produktivitást, egy bizonyos alkohol koncentráció felett azonban már csökkenti. Ha a felület maximumát megkeressük, a reakció optimális kezdeti értékeit kapjuk:

Olajsav 1,80 mol/l

i-Amil-alkohol 3,25 mol/l

Az így elérhető maximális produktivitás 0,15 mol/l.óra.mg enzimkészítményre számítva.

5. Összefoglalás

Doktori munkám során két fontos, hagyományos és nem-konvencionális közegű enzimes folyamatot: a glükóamiláz keményítő hidrolízis és a lipázos olajsav-i-amil-észter szintézis lefutását, viselkedését vizsgáltam. Előbbinél a megújuló növényi forrásból származó alapanyagból glükóz nyerhető, mégpedig hulladékmentes eljárással, kíméletes körülmények között, vizes közegű enzimes reakcióval. Utóbbi folyamán pedig olyan biokenőanyag állítható elő szerves oldószeres reakció során, amely biológiai eredetű, környezetbarát és az élővizekre nézve nem toxikus.

Mindkét enzimes reakció több szubsztrátos, összetett folyamatnak tekinthető, mindkét enzim a hidrolázok közé tartozik. A glükóamiláz enzim a keményítő nem redukáló lánc végéről szakít le glükóz molekulákat, miközben – hidrolitikus reakcióként – a víz vesz még részt a reakcióban. Így a poliszacharid molekula fokozatosan rövidül, végül a maltohexaóz, -pentaóz, -tetraóz, -trióz sor végén a maltózból két glükóz képződik. Az észter szintézisnél az olajsav és az i-amil-alkohol szubsztrátokból indulunk ki, s termékként észter és víz keletkezik, tehát a két szubsztrát és a két termék alapján bi-bi reakcióról beszélhetünk. Látható, hogy mindkét enzimes folyamatnál igen fontos tényező a víz. A vizes közegű keményítő hidrolízisnél a víz mellett, hogy reakciópartner, egyben oldószer is, így jelentős feleslegben van jelen, s a folyamat látszólag egy szubsztrátos reakciónak tekinthető. A szerves oldószerben lejátszódó lipázos észterezési reakciónál a víz termékként keletkezik, és hatással van az enzim viselkedésére.

A keményítő hidrolízisét vizsgáló kísérleteimet egy *Aspergillus awamori* mikroorganizmusból kinyert glükóamiláz enzimmel folytattam, amelyet géntechnikai úton tettek alkalmassá az emelt szintű glükóamiláz termelésére. A GB-58/99 nyilvántartási számú Brit-Magyar Tét együttműködés keretében partnereink a *Satake Centre for Grain Process Engineering* intézetből (UMIST, Manchester) biztosították számunkra azt az *Aspergillus awamori* (2B. 360 U2/1) törzset, amelynek fermentációjával nyertem az enzimet. A fermentáció során a glükóamiláz extracelluláris enzimeként képződik, s a fermentléből így könnyen (szűréssel, centrifugálással) kinyerhető. A szűrlet szárazanyag-tartalma 2,9 %, fehérjetartalma 47 % volt (Kjelhdalh-módszer) a szárazanyagra vonatkoztatva.

A UMIST kutatói korábban arra következtettek, hogy a fermentlében található csekély mértékű α -amiláz is. A hidrolízis során keletkező termékeket egy speciális, cukrok

elemzésére, oligoszacharidok elválasztására szolgáló HPLC módszerrel vizsgálva, megállapítottam, hogy reakcióelegyben kizárólag glükóz és keményítő található, oligoszacharidokat nem tudtam kimutatni még igen koncentrált oldatokból, a kezdeti időpontokban sem. Ezek alapján valószínűsítettem, hogy a kísérletek alatt túlnyomó részben a glükóamiláz enzim volt a meghatározó biokatalizátor, s ennek aktivitását mértem.

A fermentációs úton nyert felülúszó kiinduló glükóamiláz aktivitását igen jónak találtam. A dezaktiválódás vizsgálatához az enzim oldatot 60 °C-ra termosztáltam és abból vettem mintákat, melyeknek meghatároztam az aktivitását. A hő hatására lejátszódó fehérjebomlás exponenciális egyenlettel írható le, mely folyamat egy adott hőmérsékleten csak az eltelt időtől és az ún. dezaktiválódási állandótól függ. A kísérleti adatainkra ezt az exponenciális görbét illesztettem, a dezaktiválódási állandó értéke 0,18 1/h-nak adódott, ami azt jelenti, hogy az az idő periódus, amely alatt az enzim kiinduló aktivitása a felére csökken (*felezési idő* – $t_{1/2}$), mindössze 230 perc. (A görbeillesztés jóságát jellemző R^2 értéke 0,9939.) Az enzimmészítmény tárolása is gondot okozott, mivel aktivitását hűtőszekrényben 4 °C-on is folyamatosan elveszítette.

Bár a 60 °C-os eredmények a hődezaktiválódásra jellemző lefutást mutatják, s az exponenciális egyenlet is jól illeszkedik az adatokra, az enzimmészítmény gyors dezaktiválódásának oka – feltételezésem szerint – az is lehet, hogy a fermentációban jelen lehetnek olyan proteázok, amelyek a glükóamiláz enzim fehérjéit támadják meg, s bontják le. Ezért a stabilizálni kívánt enzimmészítményhez ún. *proteázgátló koktélt* szereztem be és teszteltem. Kiderült, hogy a P 8215 jelű (Sigma) koktél valóban hatékonyan működött, s képes volt megakadályozni a proteázok által okozott fehérjebontást. Szobahőmérsékleten tárolva a kezelt enzim még hónapok múltán is megőrizte aktivitását.

A tárolási stabilitás jelentős növelése után, ismételten meghatároztam a 60 °C-on mérhető dezaktiválódási állandó értékét, a dezaktiválódási állandó értéke 0,0052 h⁻¹-nak adódott, (*felezési idő* – $t_{1/2}$), 75 óra. (A görbeillesztés jóságát jellemző R^2 értéke 0,8924.)

A fermentáció felülúszójából vett enzimmészítménnyel rázatott lombikos kísérleteket végeztem a kezdeti reakciósebesség meghatározására különböző kiindulási keményítő tartalmú mintákkal (1, 2, 4, 6, 8, 10 g/l-es koncentrációknál). A mintákat 60 °C-on rázógéppel (150 rpm) termosztáltam. Felvettem a reakciók időgörbéit és meghatároztam a kezdeti reakciósebességeket. A termékkinhibíciót a kezdeti reakcióelegyhez adott glükóz segítségével határoztam meg. A kiindulási oldatokhoz 1 és 2 mg/ml-es koncentrációban adtam glükózt. A

méréseket az előzőek szerint ismételt elvégeztem és meghatároztam a kezdeti reakciósebességeket.

A keletkező glükóz tehát erős inhibitorként viselkedik, így a reakció kezdeti sebességét a kompetitív termékátlással kiegészített Michaelis-Menten összefüggéssel lehet leírni.

A kinetikai paramétereket a Lucenz4 program segítségével számoltam ki. Megállapítottam, hogy a nyert glükóamiláz aktivitása a egy kereskedelmi forgalomban kapható készítménynél egységnyi fehérjére vetítve kisebb, de a kinetikai paraméterek azonos tartományba esnek.

Miután az enzim stabilitását sikeresen megnöveltük, kísérleteket végeztünk folyamatos keményítő bontásra membrán reaktorban. A membrán segítségével megoldottuk a termék kinyerését, ezzel kiküszöbölve a termék gátlást is.

1 %-os keményítő oldat alkalmazásával folyamatos kísérleteket végeztem az enzim stabilitását vizsgálva, mind a proteázgátlóval kezelt fermentlével. A permeátumot gyűjtöttem és meghatároztam a keletkezett glükóz mennyiségét 400 óra alatt 61 g glükóz képződött összesen 65 g keményítőkészítményből, melyből 63 g keményítő volt bontható, 2,5 % egyéb szerves szennyeződés. Ez összesen 88 %-os konverzióknak felel meg, s a folyamathoz 6,5 l szubsztrátoldatot és 1 ml proteázgátlóval kezelt fermentlevet használtam.

Ha hasonló körülmények között szakaszos reaktorban zajlik a reakció, számolni kell a keletkezett glükóz gátló hatásával. Az előzőekben meghatározott kinetikai paraméterek segítségével egy hasonló térfogatú, 6,5 l-es tökéletesen kevert reaktort szimuláltam, 1 %-os kezdeti keményítő koncentrációt és 1 ml enzimekészítményt feltételezve. Összehasonlítva a rázatott lombikos kísérleteket és a folyamatos integrált rendszerben végrehajtott keményítő hidrolízist, megállapítható, hogy a szubsztrát gátlás kiküszöbölésével az integrált rendszer hatékonysága 28 %-al nagyobb.

Olajsav és i-amil-alkohol észterezését vizsgáltam lipáz enzim jelenlétében, n-heptán oldószerben. Ráztatott lombikos kísérleteket végeztem 30 °C-os hőmérsékleten 0,01 g Novozym 435 lipázt alkalmazva, az olajsav és az i-amil-alkohol koncentrációját egy széles tartományban változtatva. A kezdeti reakciósebesség minél pontosabb meghatározása miatt az első fél órában 5 percenként, majd fél óránként, később a 6. és a 24. órában határoztam meg a reakcióelegy olajsavtartalmát. Megállapítottam, hogy az egyensúlyi koncentrációk minden esetben kialakultak 24 óra elteltével.

A kezdeti sebesség meghatározását minden pontban elvégeztem a Gregory-Newton (függelék) módszer alapján. Mivel a reakcióban rögzített lipáz enzimet használtam, fontos megvizsgálni, hogy a kialakult reakciósebességek valóban az enzimre jellemző értékek vagy a folyadékfázisból a szilárd rögzített fázishoz történő diffúzió sebességei. Megállapítottam, hogy a folyamatban a diffúzió sebessége három nagyságrenddel nagyobb, mint az enzimkatalizált reakcióé. Így a későbbiekben meghatározott reakcióparaméterek nem látszólagosak, hanem valóban az enzimreakcióra jellemzőek.

Megállapítottam, hogy a linearizált sebességi görbék lefutása a Ping-Pong bi-bi mechanizmusra jellemző. Meghatároztam a Ping-Pong bi-bi kinetikai modell paramétereit, azt tapasztaltam, hogy a négyparaméteres, gátló hatásokat is figyelembe vevő modell jobban leírja az olajsav i-amil-alkohollal történő enzimre észterezésének kinetikáját a vizsgált tartományban, mint a háromparaméteres egyenlet. Az ötparaméteres, a víz hatását is figyelembe vevő modell azonban nem pontosabb, mint a négyparaméteres, ezért alkalmazása nem indokolt. A modell eredményeket összehasonlítva a mért adatokkal, igen jó egyezést tapasztalhattunk, a maradék hiba a legkisebb négyzetek szerint becsülve mindösszesen 3 százalék, ami sokkal pontosabb egyezés, mint eddig az irodalomban megállapított eredmények. A pontosabb eredményeket részben az eltérő analitikai megoldás, részben a kétlépcsős paraméter-meghatározás eredményezheti.

A víztartalom igen fontos faktor a lipáz katalizálta reakcióknál, és az enzimműködésre sokféleképpen hat. A túl alacsony víztartalom általában csökkenti az enzimaktivitást. A magas víztartalom csökkentheti a reakciósebességet. Az optimális vízmennyiség gyakran egy szűk tartományban van. Szerves közegben az enzimek vízigénye nagyon változó; ennek következtében minden egyes enzimet vizsgálni kell különböző hidratációs fokon. A víztartalom szerepét a reakcióelegyben a 0,1-1,5 %-os tartományban tanulmányoztam. Megállapítottam, hogy egy további paraméter (C) segítségével a víztartalom hatása jól leírható a négyparaméteres modell változatlan alkalmazása mellett. A meghatározott paraméterek az adott koncentráció tartományban pontosan leírják a szubsztrátok és termékek koncentrációjának változását.

A meghatározott kinetikai paraméterek segítségével modelleztem a reakciót különböző körülmények között. Meghatároztam az optimális feltételeket az olajsav és az i-amil-alkohol lipázos észterezéséhez, néhány gyakorlati szempont figyelembevételével (a reakcióelegyben maradó sav, a Novozym 435 60 °C-on 12 óra alatt aktivitása nagy részét elveszíti, az enzim készítmény ára).

A fenti szempontok figyelembevételével, a víz hatásával kiegészített kinetikai modellt felhasználva meghatároztam a 12 óra alatt elérhető hozamokat különböző kiindulási i-amil-alkohol és olajsav koncentrációk mellett, folyamatos vízeltávolítást feltételezve (pl. pervaporációs módszerrel).

Megállapítottam, hogy a szubsztrát koncentrációk növelése kezdetben növeli az elérhető produktivitást, egy bizonyos alkohol koncentráció felett azonban már csökkenti. Ha a felület maximumát megkeressük, a reakció optimális kezdeti értékeit kapjuk (olajsav 1,80 mol/l i-amil-alkohol 3,25 mol/l). Az így elérhető maximális produktivitás 0,15 mol/l.óra.mg enzimkészítményre számítva.

Az egymásra épülő feladatok elvégzése során nyert eredményekből az is látszik, hogy nemcsak az enzimkinetikai vizsgálat, elemzés – önmagában – volt e doktori munka célja, hanem – mintegy tovább gondolva a kinetika által sugallt összefüggéseket – ezen eredmények alapján konkrét megoldási javaslatok is szerepelnek mindkét folyamat optimális gyakorlati megvalósítására. Kísérleti és elméleti megállapításainkkal, adatainkkal remélhetőleg hozzájárultunk az e területen folyó alap kutatásokhoz, s ezzel a folyamatok ipari felhasználásának megalapozásához.

6. Irodalomjegyzék

Aleshin, A.E., Hoffman, C., Firsov, L.M., Honzatko, R.B. (1994): Refined crystal structures of glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100, J. Mol. Biol. 238, 575-580

Allen, C.A.W. Watts, K.C. és Ackman, R.G. (1996): Properties of methyl esters of interesterified triacylglycerols, Proc. 3rd Liquid Fuel Conf. Nashville, USA, , pp. 73-82

Basaveswara, R.V., Sastri, N.V.S., Subba R.P.V. (1981): Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*, Biochem. J. 193, 379-387

Bélafi-Bakó, K., Badr, A.K., Nemestóthy, N., Ehrenstein, U., Gubicza, L. (2003): Kinetics of ethyl acetate formation by lipase in organic solvent and solvent-free system, Chem. Pap. 57, 278-281

Bélafi-Bakó, K., Dombi, Á., Szabó, L., Nagy, E. (1994): Triacylglycerol Hydrolysis by Lipase in a Flat Membrane Bioreactor, Biotechnol. Techn. 8, 671-4

Bousquet-Dubouch, M.P., Graber, M., Sousa, N., Lamare, S., Legoy, M-D. (2001): Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water, BBA.-Protein Struct. M. 1550, 90-99

Brown, A.J. (1902): Enzyme action, J. Chem. Soc. 81, 373-388

Chulalaksananukul, W., Condoret, J.S., Delorme, P., Willemot, R.M. (1990): Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane. FEBS-Lett. 276, 181-184

Cleland, W. W. (1979): Optimizing Coupled Enzyme Assays, Anal. Biochem. 99, 142-145

Davison, B.H., Barton, J.W., Petersen, G.R. (1997): Nomenclature and Methodology for Classification of Nontraditional Biocatalysis, Biotechnol. Prog., 512-518

- Dixon, M., Webb, E.C. (1964): Enzymes, Academic Press, New York,
- Drioli, E., Giorno, L. (1999): Biocatalytic membrane reactors, Taylor and Francis Group, London,
- Dörmő, N., Bélafi-Bakó, K., Bartha, L., Ehrenstein, U., Gubicza, L. (2004): Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system, Biochem. Eng. J. 21, 229-234
- Elődi P. (1983): Biokémia, Akadémiai Kiadó, Budapest,
- Erdey L. (1958): Bevezetés a kémiai analízisbe, I-II, Tankönyvkiadó, Budapest,
- Fierobe, H.P., Mirgorodskaya, E., Frandsen, T.P., Roepstorff, P. Svensson, B. (1997): Overexpression and Characterization of *Aspergillus awamori* Wild-Type and Mutant Glucoamylase Secreted by the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*: Comparison with Wild-Type Recombinant Glucoamylase Produced Using *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* as Hosts, Protein Expres. Purif. 9, 159-170
- Fogarty, W.M. (1983): Microbial enzymes and biotechnology, Applied Science Publishers, London, New York,
- Fromm, H.J. (1975): Initial Rate Enzyme Kinetics Spriger-Verlag Berlin. Heidelberg, New York,
- Gan, Q., Allen, S.J., Taylor, G. (2002): Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis, Biochem. Eng. J. 12, 223-229
- Garcia T., Coteron, A., Martinez M., Aracil, J. (1996): Kinetic Modelling of Esterification Reactions Catalysed by Immobilized Lipases, Chem. Eng. Sci. 51, 2841-2846
- Garcia, T., Sanchez, N., Martinez, M., Aracil, J. (1999): Enzymatic synthesis of fatty esters Part I. Kinetic approach, Enzyme Microb. Tech. 25, 584-590

Giorno, L. (2000): Membrane bioreactors, in Integration of Membrane Processes into Bioconversions, Ed. By Bélafi-Bakó, K., Gubicza, L., Mulder, M.H.V., Kluwer Academic, London, pp. 187-199

Goddard, R., Bosley, J., Al-Duri, B. (2000): Esterification of oleic acid and ethanol in plug flow (packed bed) reactor under supercritical conditions: Investigation of kinetics, J. Supercrit. Fluids. 18, 121-130

Gouka, R.J., Punt, P.J., Hessing, J.G.M., van den Hondel, C.A.M.J.J. (1996): Analysis of heterologous protein production in defined recombinant *Aspergillus awamori* strains, Appl. Environ. Microb. 62, 1951-1957

Gubicza, L., Nemestóthy, N., Fráter T., Bélafi-Bakó, K. (2003): Enzymatic esterification in ionic liquids integrated with pervaporation for water removal, Green Chem. 5, 236-239

Gulati, R., Arya, P., Malhotra, B., Prasad, A.K., Saxena, R.K., Kumar, J., Watterson, A.C., Parmar, V.S. (2003): Novel biocatalytic esterification reactions on fatty acids: synthesis of sorbitol 1(6) – monostearate, ARKIVOC. iii., 159-170

Hazarika, S., Goswami, P., Dutta, N.N., Hazarika, A.K. (2002): Ethyl oleate synthesis by Porcine pancreatic lipase in organic solvents, Chem. Eng. J. 85, 61-68

Ida, J.I., Matsuyama, T., Yamamoto, H. (2000): Immobilization of glucoamylase on ceramic membrane surfaces modified with a new method of treatment utilizing SPCP-CVD, Biochem. Eng. J. 5, 179-185

Janssen, A.E.M., Vaidya, A.M., Halling, P.J. (1996): Substrate specificity and kinetics of *Candida rugosa* lipase in organic media, Enzyme. Microb. Tech. 18, 340-346

Keleti, T. (1978): Az enzimkinetika alapjai, Tankönyvkiadó, Budapest,

Kiran, K.R., Divakar, S. (2001): Lipase catalyzed synthesis of organic acid esters of lactic acid in non-aqueous media, J. Biotechnol. 87, 109-121

- Kleinman, M.J., Wilkinson, A.E., Wright, I.P., Evans, I.H., Bevan, E.A. (1988): Purification and properties of an extracellular glucoamylase from a diastatic strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. J.* 249, 163-170
- Koutinas, A., Bélafi-Bakó, K., Kabiri-Badr, A., Tóth, A., Gubicza, L., Webb, C. (2001): Enzymatic hydrolysis of polysaccharides, *Food. Bioprod. Process.* 79, 41-45
- Koutinas, A., Wang, R., Kookos, IK. Webb, C. (2003): Kinetic parameters of *Aspergillus awamori* in submerged cultivations on whole wheat flour under oxygen limiting conditions, *Biochem. Eng. J.* 16, 23-34
- Letisse, F., Lamare, S., Legoy, M.D., Graber, M. (2003): Solid/gas biocatalysis: an appropriate tool to study the influence of organic components on kinetics of lipase-catalyzed alcoholysis, *BBA-Gen. Sub.* 1652, 27-34
- Li, M., Kim, J-W., Peeples, T. L. (2002) Kinetic enhancement of starch bioconversion in thermoseparating aqueous two-phase reactor systems, *Biochem. Eng. J.* 11, 25-32
- Lopez-Ulibarri, R., Hall, G.M. (1997): Saccharification of cassava flour starch in a hollow fiber membrane reactor, *Enzyme Microbial Tech.* 21, 398-404
- Mansfield, S.D., Mooney, C. Saddler, J.N. (1999): Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis, *Biotechnol. Prog.* 15, 804-16
- Moralejo, F.J., Cardoza, R.E., and Gutierrez, S. (2002): Silencing of the aspergillopepsin B (pepB) gene of *Aspergillus awamori* by antisense RNA expression or protease removal by gene disruption results in a large increase in thaumatin production. *Appl. Env. Microbiol.* 68, 3550-3559.
- Mulder, M. (1996): Basic principles of membrane technology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht,
- Nagodawithana, T., Reed, G. (eds.) (1993): Enzymes in food processing, Academic Press, San Diego,
- Nagy, E., Bélafi-Bakó, K., Szabó, P. (1992): A Kinetic Study of the Hydrolysis of Maltodextrin by Soluble Glucoamylase *Enzyme, Starch/Stärke*, 44, 145-148

- Nielsen, B. R., Lehmbeck, J., Frandsen, T. P. (2002): Cloning, heterologous expression, and enzymatic characterization of a thermostable glucoamylase from *Talaromyces emersonii*, *Protein Expres. Purif.* 26, 1-8
- Oliveira, A.C., Rosa, M.F. Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S. (2001): Enzymatic esterification of ethanol and oleic acid –a kinetic study, *J. Mol. Cat. B Enzym.* 11, 999-1005
- Özgülsün, A., Karaosmanoglu, F., Tüter, M. (2000): Esterification reaction of oleic acid with fusel oil fraction for production of lubricating oil, *JAOCS* 77, 105-110
- Paiva, A.L., Balcao, V.M., Malcata, F.X. (2000): Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipase, *Enzyme Microbiol. Techn.* 27, 187-204
- Paolucci-Jeanjean. D., Belleville, M.P., Rios, G.M., Zakhia, N. (2000): Kinetics of continuous starch hydrolysis in a membrane reactor, *Biochem. Eng. J.* 6, 233-238
- Polakovic, M., Bryjak, J. (2002): Modelling of the kinetics of thermal inactivation of glucoamylase from *Aspergillus niger*, *J. Mol. Catl. B Enzym.* 19-20, 443-450
- Römpp *Vegyészeti Lexikon*, (1977) Franchische Verlagshandlung, Kosmos-Verlag, Stuttgart,
- Suelter, H.C. (1985): *A Practical Guide to Enzymology*, John Wiley & Sons, New York,
- Tachauer, E., Cobb, J.T., Shah, Y.T. (1974): Hydrolysis of starch by a mixture of enzyme in a membrane reactor, *Biotechnol. Bioeng.* 16, 545-550
- Tucker, G.A., Woods, L.F.J. (eds.) (1995): *Enzymes in food processing*, Blackie Academic and Professional, London,
- Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S., Jones T.A. (1994): The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*, *Structure* 2, 293-308

Wilkinson, G.N. (1961): Statistical estimations in enzyme kinetics, *Biochem. J.* 80, 324-332

Yadav, G.D. Devi, K.M. (2002): Enzymatic synthesis of perlauric acid using Novozym 435, *Biochem. Eng. J.* 10, 93-101

Yadav, G.D., Lathi, P.S. (2003): Kinetics and mechanism of synthesis of butyl isobutyrate over immobilised lipases, *Biochem. Eng. J.* 16, 245-252

Yamasaki, Y., Suzuki, Y., Ozawa, J. (1977): Three forms of alpha-glucosidase and a glucoamylase from *Aspergillus awamori*, *Agric. Biol. Chem.* 41, 2149-2161

Zaidi, A., Gainer, J.L., Carta, G., Mrani, A., Kadiri, T., Belarbi, Y., Mir, A. (2002): Esterification of fatty acids using nylon-immobilized lipase in n-hexane: kinetic parameters and chain-length effects, *J. Biotechnol.* 93, 209-216

Tézisek

1.1

Az *Aspergillus awamori* fermentációjával előállított glükóamiláz enzim stabilitását Sigma (P 8215) proteáz gátló koktél segítségével jelentős mértékben megnöveltem. A 60 °C-on felezési időt 230 percről 75 órára sikerült javítanom. Megállapítottam, hogy a stabilizált glükóamiláz segítségével megvalósított szakaszos enzimes keményítő hidrolízis a kvázi egyszubsztrátos, termékkihíbiós Michaelis-Menten kinetikai modellel írható le, s meghatároztam a kinetikai állandók értékeit ($r^2=0,997$):

- $V_{\max} = 7,9 \pm 0,1$ mmol/s ml
- $K_M = 2.8 \pm 0,03$ mol/l
- $K_G = 0.8 \pm 0,072$ mol/l

1.2

Az *Aspergillus awamori* forrásból nyert glükóamiláz enzimmal végzett keményítő hidrolízis során a termékkihíbiót kiküszöböltem 0,01 m² felületű síklap típusú ultraszűrő membránból összeállított termosztált membrán bioreaktor alkalmazásával. Megállapítottam, hogy a folyamatos keményítő hidrolízis hatékonysága 60 °C-on 28 %-kal haladta meg a szakaszos rázatott lombikos reakció hatékonyságát.

2.1

Megállapítottam, hogy az olajsav i-amil-alkohollal történő észterezése Novozym® 435 lipáz által katalizálva a ping-pong bi-bi mechanizmus szerint zajlik le. Az i-amil-alkohol jelentős, míg az olajsav enyhe szubsztrátgátlást okoz. A kinetikai paramétereket négyparaméteres modellt alkalmazva simplex módszerrel határoztam meg ($r^2=0,975$):

- $V_{\max} = 30,8 \pm 2,3$ μmol/s g
- $K_A = 0,65 \pm 0,05$ mol/l
- $K_{IB} = 0,58 \pm 0,04$ mol/l
- $K_B = 3,2 \pm 0,25$ mol/l

2.2

Az olajsav-i-amil-észter lipázos szintézisénel megállapítottam, hogy a víztartalom hatása leírható a négyparaméteres modell változatlan alkalmazása mellett a látszólagos

aktivitást változtató modell segítségével. A meghatározott paraméterek az adott koncentráció tartományban pontosan leírják a szubsztrátok és termékek koncentrációjának változását ($r^2=0,995$):

- $V_{\max} = 35,6 \pm 0,5 \mu\text{mol/s g}$
- $C = 0,25 \pm 0,03$
- $V_{\max W_0} = 0.001 \pm 0,0001 \mu \text{ mol/s g}$

2.3.

Az előzőekben leírt enzimkinetikai modell segítségével szimuláltam azt az optimális kiinduló paraméter tartományt, amely a lehető legnagyobb hatékonyságú észter előállítás eredményezi. A szimuláció szerint az n-heptános rendszerben, Novozym 435 lipáz készítménnyel 40 °C hőmérsékleten 1,8 mol/l olajsav és 3,25 mol/l i-amil alkohol kiinduló koncentrációknál, 1,5 mol/l.óra.mg enzim maximális produktivitással állítható elő a biokenőanyagként használható olajsav-i-amil-észter a víztartalom állandó értéken tartása mellett (pl. pervaporáció alkalmazásával).

Theses

1.1

The stability of glucoamylase enzyme produced extracellularly by fermentation of *Aspergillus awamori* was highly improved by a protease inhibiting cocktail (Sigma P 8215). The half life time ($t_{1/2}$) measured at 60 °C was extended from 0.18 h⁻¹ upto 75 h. I have found that the batch hydrolysis by the stabilized glucoamylase enzyme could be described by the quasi one substrate Michaelis-Menten kinetic model completed with product inhibition. The parameters of the model were determined as follows ($r^2=0.997$):

- $V_{\max} = 7.9 \pm 0.1$ mmol/s ml
- $K_M = 2.8 \pm 0.03$ mol/l
- $K_G = 0.8 \pm 0.072$ mol/l

1.2

Glucoamylase obtained from the fermentation effluent filtrate was used to carry out continuous starch hydrolysis in an enzyme membrane bioreactor (thermostated, 0.01 m² surface area, flat-sheet ultrafiltration membrane) to eliminate product inhibition. The efficiency of the continuous starch hydrolysis was found 28% higher than that of the batch reaction.

2.1

The esterification of oleic-acid and i-amyl alcohol by lipase enzyme (Novozym ® 435) was found to obey ping-pong bi-bi mechanism, where i-amyl alcohol had a strong, while oleic acid had a weak inhibiting effect. The kinetic parameters were determined in a four-parameter model by simplex method ($r^2=0.975$), as follows:

- $V_{\max} = 30.8 \pm 2.3$ μmol/s g
- $K_A = 0.65 \pm 0.05$ mol/l
- $K_{IB} = 0.58 \pm 0.04$ mol/l
- $K_B = 3.2 \pm 0.25$ mol/l

2.2

At the esterification of oleic-acid and i-amyl alcohol by lipase enzyme it has been found that the effect of the water content could be modeled by the unaltered four-parameter model extended with a transparent activity constant. The determined parameters at this concentration range fit properly to the progress curves of the reactions ($r^2=0.995$):

- $V_{\max} = 35.6 \pm 0.5 \mu\text{mol/s g}$
- $C = 0.25 \pm 0.03$
- $V_{\max W_0} = 0.001 \pm 0.0001 \mu \text{ mol/s g}$

2.3.

The previously identified enzyme kinetic model was used to determine the optimal initial operating conditions for the highest efficiency of ester production. According to the simulation the best result was achieved by using Novozym 435 lipase, n-heptane solvent, 40 °C temperature, 1.8 mol/l oleic acid and 3.25 mol/l i-amyl alcohol initial concentration, which resulted in 1.5 mol/l.h.mg enzyme productivity, with constant water concentration controlled by pervaporation.

7. Publikációk

A keményítő hidrolízisével kapcsolatos munkák:

1. Nemestóthy, N., L. Ribeiro, A. Tóth, K. Bélafi-Bakó, L. Gubicza, C. Webb: Kinetics of enzymatic hydrolysis of polysaccharides, *Med. Fac. Landbouww. Univ Gent*, 66/3a, (2001) 191-194
2. Fráter, T., Nemestóthy, N., Gubicza, L., Bélafi-Bakó, K.: Enhancement of operation and storage stability of glucoamylase from *Aspergillus awamori* by a protease inhibitor preparation, *Biocat. Biotrans.* (nyomtatás alatt)
3. Nemestóthy N., Bélafiné Bakó K.: Keményítő hidrolízise membrán bioreaktorban, *XII. Membrántechnikai Konferencia Budapest 2004* pp 50-55

Az i-amil-alkohol észterezésével kapcsolatos munkák:

4. Koszorz, Z., Nemestóthy, N., Ziobrowski, Z., Bélafi-Bakó, K., Krupiczka, R.: Influence of pervaporation process parameters on enzymatic catalyst deactivation *Desalination*, 162, (2004) 307-313
5. Nemestóthy N., Bélafi-Bakó K., Gubicza L.: A kinetics study on i-amyl-alcohol esterification by *Candida antarctica* lipase (beküldve) a *J. Mol. Cat B. Enzymatic folyóirathoz*
6. Koszorz, Z., Nemestóthy, N., Dörmő, N., Ziobrowski, Z., Bélafi-Bakó, K., Gubicza, L.: Enzymatic esterification enhanced by pervaporation, *Proc. 4th. Sci. Conf. Membranes and Membrane Processes in Environmental Protection, Zakopane*, (Lengyelország), 2002, pp. 189-195
7. Tonova, K. Nemestóthy, N., Koszorsz, Z., Bélafi-Bakó, K., Ziobrowsky, Z. : Enzymatic Esterification in Integrated System, *proc. 10th International Summer School of Chemical Engineering. Heat and Mass Transfer Processes Chemical and Biochemical Reactors*, Várna, 2004 pp. 263-246

8. Nemestóthy N., Bélafiné Bakó K., Gubicza L.: Összetett enzimes reakciók vizsgálata, *Műszaki Kémiai Napok, Veszprém, 2003*, Proceedingek, pp. 342-347
9. Nemestóthy, N., Dörmő, N., Bélafi-Bakó, K., Gubicza, L.: Study on the kinetic mechanism of esterification catalysed by lipase enzyme, *Proc. 29th Int. Conf. SSCHE, Tatranska Matliare, (Szlovákia), 2002*, CD-rom

További Publikációk:

10. Bélafi-Bakó, K., Nemestóthy, N., Gubicza, L.: A study on applications of membrane techniques in bioconversion of fumaric acid to L-malic acid *Desalination*, 162, (2004) 301-306
11. Bélafi-Bakó, K., Badr, A.K., Nemestóthy, N., Ehrenstein, U., Gubicza, L.: Kinetics of ethyl acetate formation by lipase in organic solvent and solvent-free system *Chem. Pap.* 57, (2003) 278-281
12. Csányi, E., Bélafi-Bakó, K., Nemestóthy, N., Gubicza, L.: Study on ethanol fermentation integrated with simultaneous solvent extraction and enzymatic reaction, *Acta Aliment.* 33 (2004) 63-70
13. Gubicza, L., Nemestóthy, N., Fráter T., Bélafi-Bakó, K.: Enzymatic esterification in ionic liquids integrated with pervaporation for water removal, *Green Chem.* 5, (2003) 236-239
14. Bélafi-Bakó, K., Nemestóthy, N., Milisic, V., Gubicza, L.: Membrane bioreactor for utilisation of carbohydrates in waste streams, *Desalination*, 149, (2002) 329-330
15. Kelemen-Horváth, I., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., Gubicza, L.: Stereoselective Reduction of 2-Phenylpropionaldehyde by Alcohol Dehydrogenase with Cofactor Regeneration, *Chem. Pap.* 56, (2002) 52-56
16. Nemestóthy, N., Kelemen-Horváth, i., Bélafi-Bakó, K., Gubicza, L.: Enzymatic reduction of phenolpropionaldehydes, *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 66/3a, (2001) 313-316

17. Bélafi-Bakó, K., Horváth, R., Ribeiro, L., Nemestóthy, N.: Poliszacharid tartalmú agro-hulladékok hasznosítása membrán bioreaktorban, *Membrántechnika* VI/2, (2002) 22-28
18. Nemestóthy N., Kelemenné Horváth I., Bélafiné Bakó K., Gubicza L.: (S)-2-fenil-1-propanol előállítása oxidoreduktáz enzimmel in-situ kofaktor regenerálással, *Műszaki Kémiai Napok, Veszprém*, 2001, Proceedingek, pp. 137-142
19. Nemestóthy, N., Kelemenné Horváth I., Bélafiné Bakó, K., Gubicza, L.: Alkohol dehidrogenáz enzim kinetikai vizsgálata in-situ kofaktor-regenerálás közben, *VII. Vegyészkonferencia, Félixfürdő*, 2001, Proceedingek, pp. 116-119
20. Bélafi-Bakó, K., Nemestóthy, N., Tonova, K., Lazarova, Z.: Possibilities to improve reverse micellar systems for enzymatic reactions, *Proc. 7th Bulgarian-Hungarian Workshop, Veszprém*, 2002, pp. 7-13
21. Kelemenné Horváth I., Nemestóthy, N., Bélafiné Bakó K., Kovács S.: Analitikai módszerek az enantioszelektivitás meghatározására (S)-2-fenil-1-propanol enzimkatalitikus előállítása során, *Műszaki Kémiai Napok, Veszprém*, 2002, Proceedingek, pp. 54-60
22. Kelemen-Horváth, I., Nemestóthy, N., Bélafi-Bako, K., Gubicza, L.: Stereoselective reduction of 2-phenyl-propionaldehyde by alcohol dehydrogenase with cofactor regeneration in enzyme-membrane bioreactor, *Proc. Membrane Summer School „Using membranes to Assist in Cleaner Processes”*. Ladek Zdrój, (Lengyelország) 2001 pp. 95-100
23. Nemestóthy, N., Lakatos, G., Bélafi-Bakó, K., Gubicza, L.: Monitoring of frying fats/oils quality by measuring relative permittivity, *Proc. 29th Int. Conf. SSCHE*, Tatranska Matliare, (Szlovákia), 2002, CD-rom
24. Nemestóthy, N., Ribeiro, L., Bélafi-Bakó, K.: Cellulose hydrolysis in a membrane bioreactor, *Proc. Ann. Memb. Techn. Conf., Tata*, 2001, pp. 61-64
25. Kelemen-Horváth, I., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., Gubicza L.: Enzymatic redox reaction with co-factor regeneration in a membrane bioreactor, *Proc. Ann. Memb. Techn. Conf., Tata*, 2001, pp. 65-68

8. Függelék

8.1. A kezdeti reakciósebesség meghatározása

A kezdeti reakciósebesség közvetlen meghatározása sokszor igen nehézkes, különösen, ha mintavételen alapuló technikával történik az elemzés. Szintén anomáliákat okozhat, ha a szubsztrát koncentrációja alacsony, így nagyon hamar csökken a szabad szubsztrát koncentráció, tehát az $[ES]$ nem lesz állandó. A kezdeti reakciósebesség megállapításakor kis hiba is nagy eltérésekhez vezet, akár más mechanizmusra utalhat, gátlásokat elfedhet, vagy látszólagos gátlásokat okozhat.

Ilyen mintavételen alapuló módszereknél nyújt hasznos segítséget a Gregory-Newton interpolációs módszer. Mivel itt a mintavételek egyforma időközönként történtek, ezért a módszer oly módon alkalmazható, hogy a mérési eredményekből párokat képzünk a 8.1. táblázatban látható eljárással.

8.1. táblázat: Gregory-Newton módszer paraméterei

t	Y	Δy	$\Delta^2 y$	$\Delta^3 y$	$\Delta^4 y$
t_0	y_0	$\Delta y_0 = y_1 - y_0$			
t_1	y_1	$\Delta y_1 = y_2 - y_1$	$\Delta^2 y_0 = \Delta y_1 - \Delta y_0$	$\Delta^3 y_0 = \Delta^2 y_1 - \Delta^2 y_0$	
t_2	y_2	$\Delta y_2 = y_3 - y_2$	$\Delta^2 y_1 = \Delta y_2 - \Delta y_1$	$\Delta^3 y_1 = \Delta^2 y_2 - \Delta^2 y_1$	$\Delta^4 y_0 = \Delta^3 y_1 - \Delta^3 y_0$
t_3	y_3	$\Delta y_3 = y_4 - y_3$	$\Delta^2 y_2 = \Delta y_3 - \Delta y_2$		
t_4	y_4				

Tehát definiálva Δt és y paramétereiket:

(8.1.1.)

$$t_1 - t_0 = t_2 - t_1 = \dots = t_n - t_{n-1} = \Delta t$$

$$y = \left(\frac{\Delta y_0}{\Delta t} \right) t + \left[\frac{\Delta^2 y_0}{2!(\Delta t)^2} \right] t(t - t_1) + \left[\frac{\Delta^3 y_0}{3!(\Delta t)^3} \right] t(t - t_1)(t - t_2) + \dots + \left[\frac{\Delta^n y_0}{n!(\Delta t)^n} \right] t(t - t_1)(t - t_2) \dots (t - t_{n-1})$$

(8.1.2)

Az előző egyenlet tulajdonképpen a termék koncentráció a mintavételi koncentrációk alapján meghatározva, azaz az első deriváltja a termékképződés sebessége, amit ha a $t=0$ időpontban meghatározunk, a reakció kezdeti sebességét kapjuk:

$$v_0 = \frac{\Delta y_0}{\Delta t} - \left[\frac{\Delta^2 y_0}{2!(\Delta t)^2} \right] t_1 + \left[\frac{\Delta^3 y_0}{3!(\Delta t)^3} \right] t_1 t_2 - \left[\frac{\Delta^4 y_0}{4!(\Delta t)^4} \right] t_1 t_2 t_3 \quad (8.1.3.)$$

8.2. A kinetikai állandók meghatározása

Többféle módszer ismeretes enzimreakciók kinetikai paramétereinek meghatározására. Alapvetően két csoportba lehet sorolni az eljárásokat:

1. Az egyenlet linearizálásán alapuló módszerek
2. Nem lineáris regressziót alkalmazó eljárások

8.2.1. Az egyenlet linearizálásán alapuló módszerek

Az eredeti Michalis-Menten egyenlet, amelyben az egyik konstans a hiperbola aszimptotája V_{\max} , a másik pedig (K_M) , a V_{\max} elérésének feléhez tartozó szubsztrátkoncentráció. A paraméterek meghatározásának nehézségét az okozza, hogy a hiperbola aszimptotája nem határozható meg kellően pontosan grafikus módszerekkel, további gondot jelenthet, az ún. overshooting és ha gátlási jelenségek lépnek fel. Ilyenkor még az aszimptota becslése sem lehetséges a szubsztrát telítési görbe alapján.

Ha az eredeti egyenletet linearizáljuk, lehetőség van az állandók grafikus meghatározására. Az első ilyen linearizálási módszer Lineweaver és Burk nevéhez fűződik, bár a módszert Woolf javasolta és ennek alapján Haladné és Stern írta le először.

Két szubsztrátos reakciók esetére Florini és Vestling dolgozott ki linearizálási módszert. A 8.2.1. általános egyenletből indultak ki, mely meghatározott kapcsolódási sorrendet feltételez.

$$v_0 = \frac{V_f[A][B]}{K_{iA}K_B + K_A[B] + K_B[A] + [A][B]} \quad (8.2.1.)$$

Ha az egyenletet felírjuk reciproknak formában kiemelve a szubsztrátok reciprokát [A] esetében 8.2. míg [B] esetében a 8.3. egyenlethez jutunk.

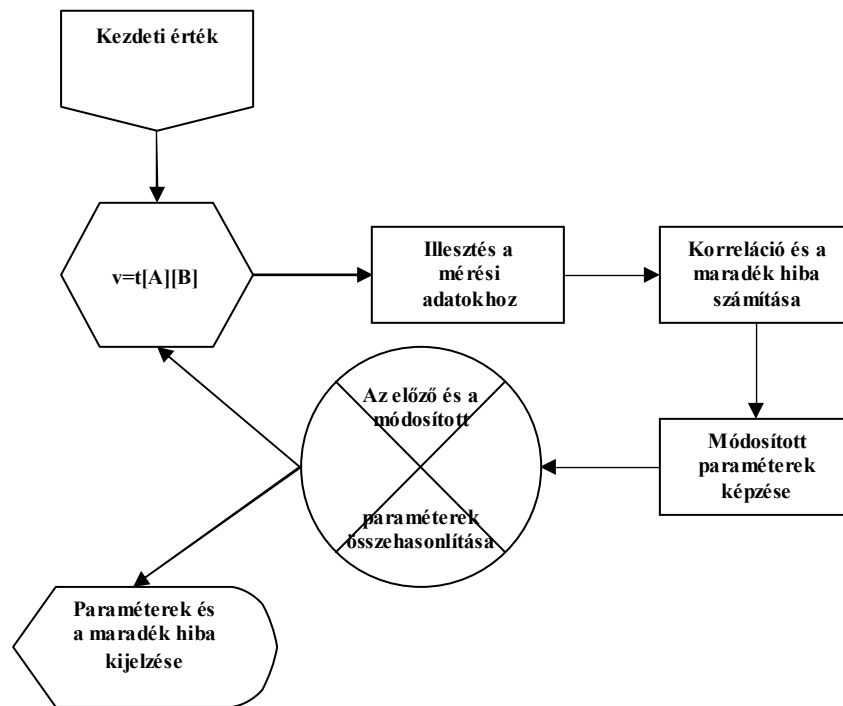
$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{[A]} \left(\frac{K_A}{V_f} + \frac{K_{iA}K_B}{V_f[B]} \right) + \left(1 + \frac{K_B}{[B]} \right) \left(\frac{1}{V_f} \right) \quad (8.2.2.)$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{[B]} \left(\frac{K_B}{V_f} + \frac{K_{iA}K_B}{V_f[A]} \right) + \left(1 + \frac{K_A}{[A]} \right) \left(\frac{1}{V_f} \right) \quad (8.2.3.)$$

Ha a 8.2 egyenlet szerint $1/v_0$ -t feltüntetjük $1/[A]$ függvényében különböző, de kísérletsorozatonként állandó [B] koncentráció mellett, akkor az azonos [B] koncentrációval végzett kísérletek közös metszéspontjának vetülete az abszcisszára megadja $-1/K_{iA}$ értékét.

8.2.2. A nem lineáris regresszió alapuló módszerek

A kezdeti reakciósebességet leíró egyenletek linearizálásán alapuló módszer alapvető súlyos hibákat hord magában, az eljárások alapelvéből adódóan. Valójában jó közelítést csak a nem lineáris regresszió módszere ad, amikor iterációval állapítjuk meg a kísérleti eredményeket legjobban leíró függvény paramétereit. A módszer vázlatos blokkdiagramját a 8.1. ábrán mutatom be.



8.1. ábra: Nem lineáris regresszió blokkdiagramja

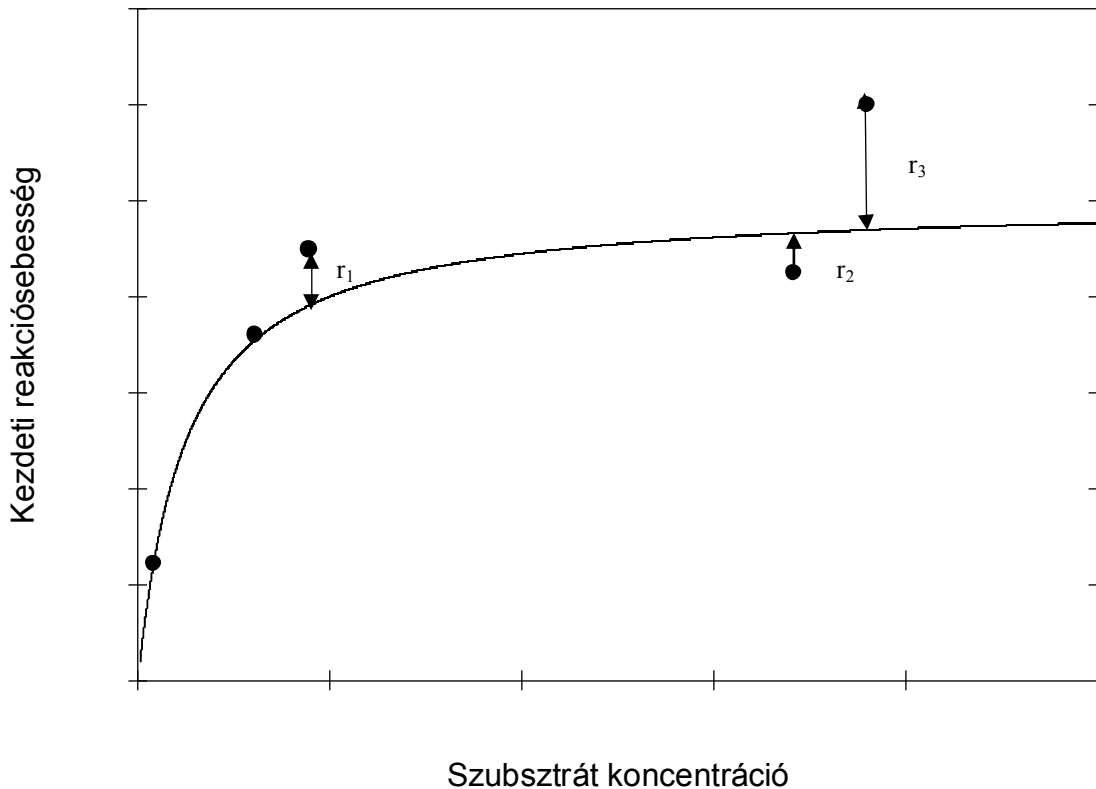
Az eljárás alapelve, hogy a kezdeti sebességet leíró modell paramétereit megbecsüljük, ezeket felhasználva, behelyettesítve a modellbe kiszámoljuk a modell kimenetét, és az összehasonlítjuk a kísérlet során nyert eredményekkel. Ezután valamilyen módszer szerint az eltérés függvényében a modell paramétereit módosítjuk, ezt a folyamatot iteráljuk mindaddig, amíg a modell által számított eredmény és a kísérleti adatok között az eltérés megfelel céljainknak.

A modell és a kísérleti eredmények közötti eltérést legáltalánosabb, leginkább elfogadott elve a legkisebb négyzetek módszere. Az eljárás leírása a 8.2.4. képletben és 8.2. ábrán látható.

$$\begin{aligned}
 s^2 &= \sum (r^2) \\
 s^2 &= \sum (v_{\text{kísérleti}} - v_{\text{modell}})^2 \\
 s^2 &= \sum \left(v_{\text{kísérleti}} - \frac{V_m}{1 + \frac{K_A}{[A]} \left(1 + \frac{[B]}{K_{IB}} \right) + \frac{K_B}{[B]}} \right)^2
 \end{aligned}
 \tag{8.2.4.}$$

Meg kell említeni, hogy a legkisebb négyzetek elve számos megszorítást hordoz magában, melyeket szem előtt kell tartani a módszer alkalmazásánál.

1. Minden szignifikáns hiba hat a függő változóra, azaz a kezdeti reakciósebességre.
2. Minden adatpont egyformán pontos/hibás. Ha különbség van a pontok megbízhatóságában, lehetőség van az adatok súlyozására még a legkisebb négyzetek módszerének alkalmazása előtt.
3. Minden szignifikáns hiba véletlen hiba, az adatok között nincs módszeres hiba. A módszeres hibákat be kell azonosítani a mérés folyamán és a mért adatokat, ha szükséges, korrigálni.
4. Elegendő mennyiségű kísérleti adat áll rendelkezésre, legalább annyi, mint a meghatározni kívánt paraméterek száma, de ha lehetőség van rá, akkor ötször ennyi mérési pont szükséges a legjobb pontossághoz.
5. Az egyes független változók valóban függetlennek egymástól, vagy ha van is valamilyen összefüggés közöttük, az nem szerepel a modellben.



8.2. ábra: Modell és kísérlet összehasonlítása a legkisebb négyzetek elve szerint

A kísérleti eredmények és a modell által meghatározott kimenet különbségének meghatározása után fontos kérdés a modell paraméterek megfelelő módosítása. Az enzimkinetikai gyakorlatban alapvetően négy különböző módszert használnak. A legnagyobb gradiens módszere, a Gauss-Newton módszer, a Levenberg-Marquardt, és a szimplex eljárás.

A *legnagyobb gradiens* elve alapján, ha az egyik paraméter változtatása után a legkisebb négyzetek elvével meghatározott különbség csökken, akkor a következő lépésben kétszer akkora módosítást hajt végre az adott paraméteren. Ez a módszer gyorsan közelíti az optimális illesztést, de, ha kicsi a további pontosítás igen sok lépésen keresztül történik. Ezt a módszert ezért gyakran csak más módszerek kiindulási paramétereinek meghatározására használják.

A *Gauss-Newton módszer* általános egyenletmegoldó eszköz egy olyan Taylor sor mely csak az első deriváltig tart (8.2.5.). Enzimkinetikában Wilkinson [Wilkinson, 1961] szerint általános formában felírva a 8.2.5. egyenlet adja meg míg a Cleland féle változatát [Cleland, 1979] a 8.6. képlet írja le.

$$y = f(x_1) + (x_2 - x_1) * f'(x_1) \quad (8.2.5)$$

$$v_i = \frac{V_{\max 0} * [A]}{[A] - K_{M0}} + (K_{M1} - K_{M0}) \frac{d}{dK_M} \left[\frac{V_{\max 0} * [A]}{[A] + K_{M0}} \right] + (V_{\max 1} - V_{\max 0}) + \frac{d}{dV_{\max}} \left[\frac{V_{\max 0} * [A]}{[A] + K_{M0}} \right] \quad (8.2.6)$$

Itt az eljárásban két ciklus váltja egymást. Az egyiknél a meghatározandó paraméterek jelenlegi és előző állapota közti változás alapján történik a paraméterek módosítása mindaddig, amíg a módosított és az azt megelőző paraméter közötti különbség elegendően kicsi. A másik ciklusban a modell és a kísérleti eredmények összehasonlítása történik. A Gauss – Newton módszer igen jól használható paraméterek pontosítására, ha azonban a kezdeti becslések nem pontosak, gyakran vezet divergenciához a módszer alkalmazása. A *Marquadt-Levenberg módszer* az előző két eljárás kombinációja. Ez a módszer nem érzékeny annyira a paraméterek becslésének a hibáira, és megfelelően gyors is.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a Műszaki Kémiai Kutatóintézet vezetőinek, Dr. Nagy Endrének és Dr. Gyenis Jánosnak, hogy lehetővé tették PhD tanulmányaim elvégzését.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Bélafiné dr. Bakó Katalinnak, időt és türelmet, megértést nem nélkülöző segítségét, iránymutatását. Szintén köszönettel tartozom Dr. Gubicza Lászlónak értékes tanácsaiért, észrevételeiért. Külön köszönöm az Intézetben tanuló doktoranduszoknak: Dörmő Nórának, Lakatos Ágnesnek, Tóth Andreának, Hadik Péternek, Fráter Tamásnak, Koroknai Balázsnak, hogy mindig készek voltak segíteni munkámat.

Köszönettel tartozom a Richter Gedeon Rt. Centenárium Alapítvány továbbképzési támogatásáért, mely nélkül munkám nem készülhetett volna el.