



# Az *Ureibacillus thermosphaericus*-ből származó D-aminosav dehidrogenáz (*Utd-AADH*) enzim immobilizálásának optimalizálása



ISZLAI András-Ernő

BOROS Krisztina, Dr. BENCZE László-Csaba

Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutató-Központ, Kémia és Vegyész-mérnöki Kar, Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Románia, 400028, Kolozsvár, Arany János utca, 11. szám  
E-mail: andras.iszlai@stud.ubbcluj.ro



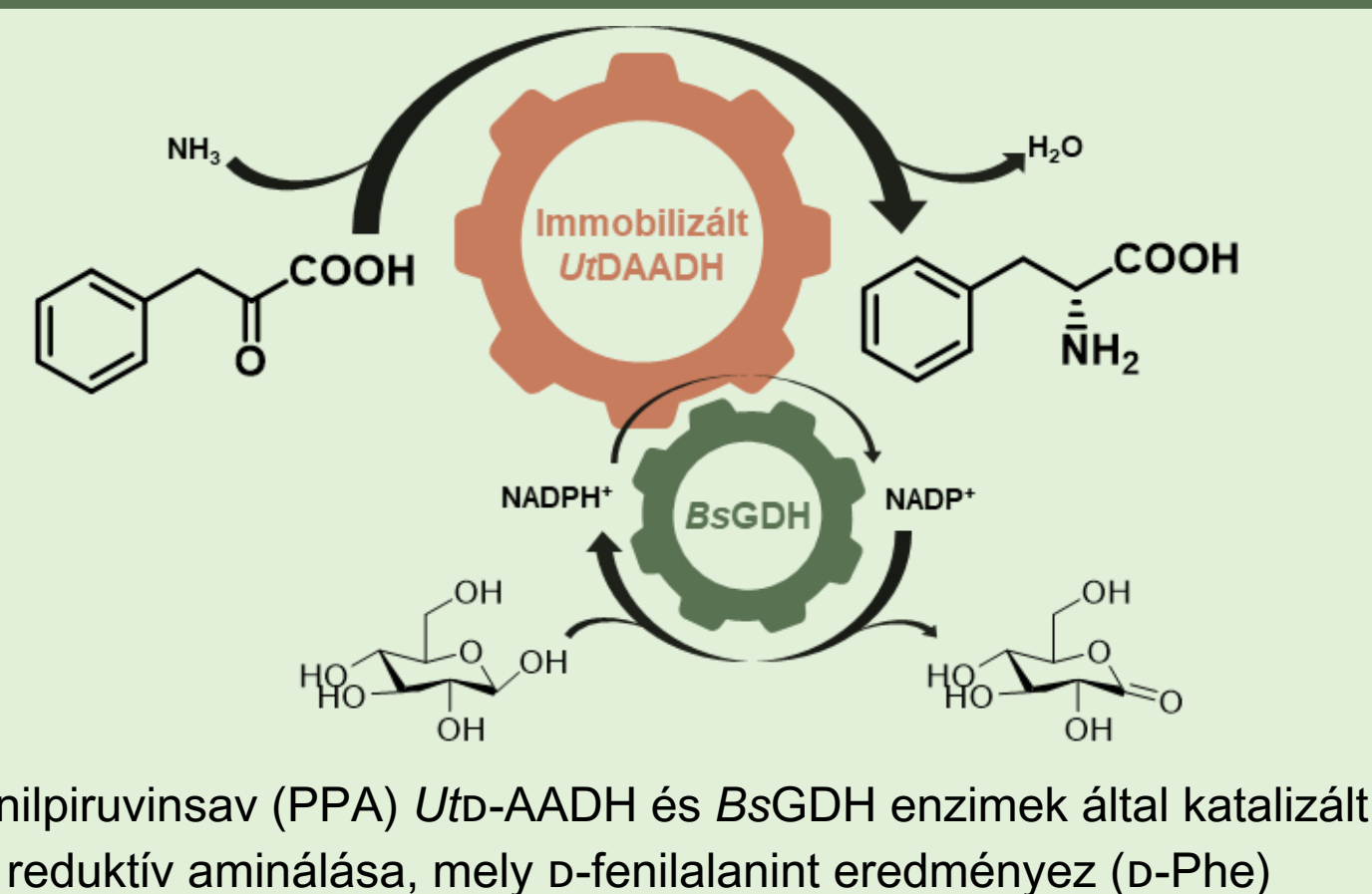
## Bevezetés

A D-aminosavak (D-AS) növekvő fontosságú szerepet töltenek be napjaink vegyipari gyártási folyamataiban, emellett több különböző gyógyszerkészítmény prekursorai is, viszont magas előállítási költségeik miatt ipari gyártásuk egyelőre korlátozott. Eddigiekben a D-aminosavak ipari felhasználása háttérbe szorult, mivel a természetben csak az L-konformer volt fellelhető. A meso-diaminopimelinsav dehidrogenázból (meso-DAPDH) irányított evolúcióval kifejlesztett D-aminosav dehidrogenáz (D-AADH) katalizátorként való felhasználása egy költséghatékony módszer keretein belül megoldást jelenthet az említett problémára [1]. A D-AADH enzimek az α-ketosavak D-aminosavakká történő redukzív aminálását katalizálják, működésükhöz azonban elengedhetetlen a redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) kofaktor, melyet szükséges regenerálni egy másik enzim segítségével [1,2].

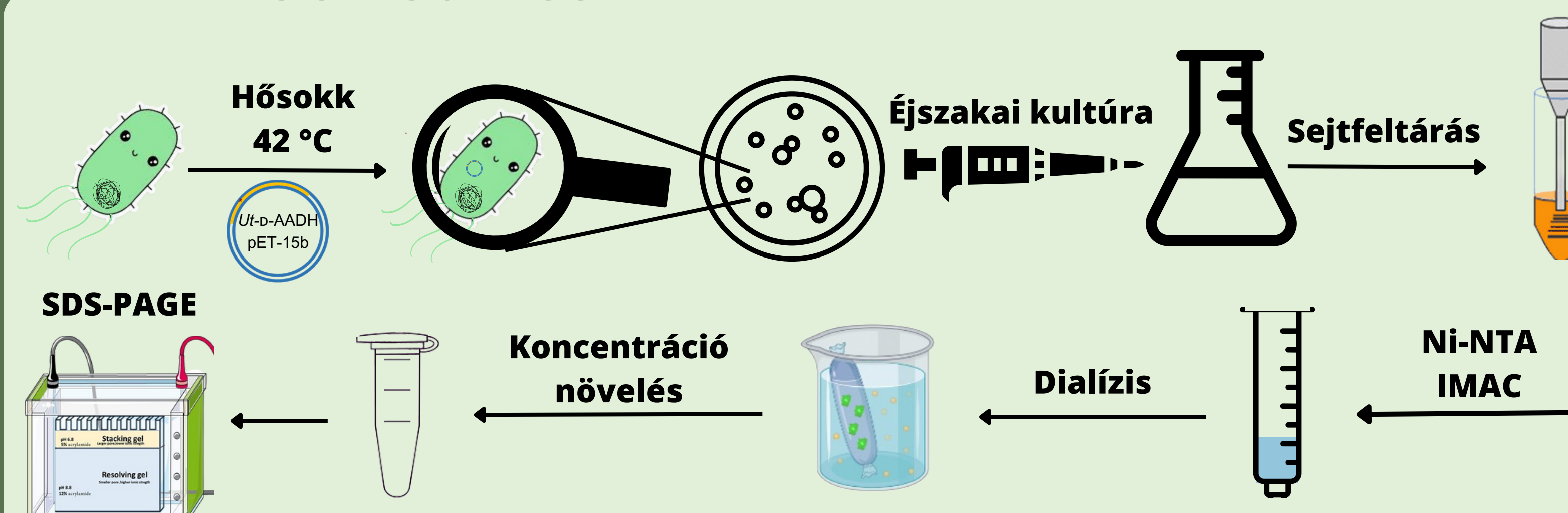
Az immobilizálás lehetővé teszi az enzimek visszanyerését a reakció befejeződése után, majd újrafelhasználhatóságukat egy újabb katalitikus ciklusban, másrésztől sok esetben az immobilizálás növeli a biokatalizátor hő- és pH-stabilitását, valamint használhatóvá teszi azt szerves oldószerekben [3].

## Célkitűzés

A kutatás célja egy optimális immobilizálási folyamat kidolgozása a D-AADH enzim esetében, tesztelve különböző hordozókat és több immobilizálási módszert is, mint az ionos kölcsönhatáson alapuló rögzítést, a nem-specifikus és hely-specifikus kovalens immobilizálást.



## Kísérleti rész

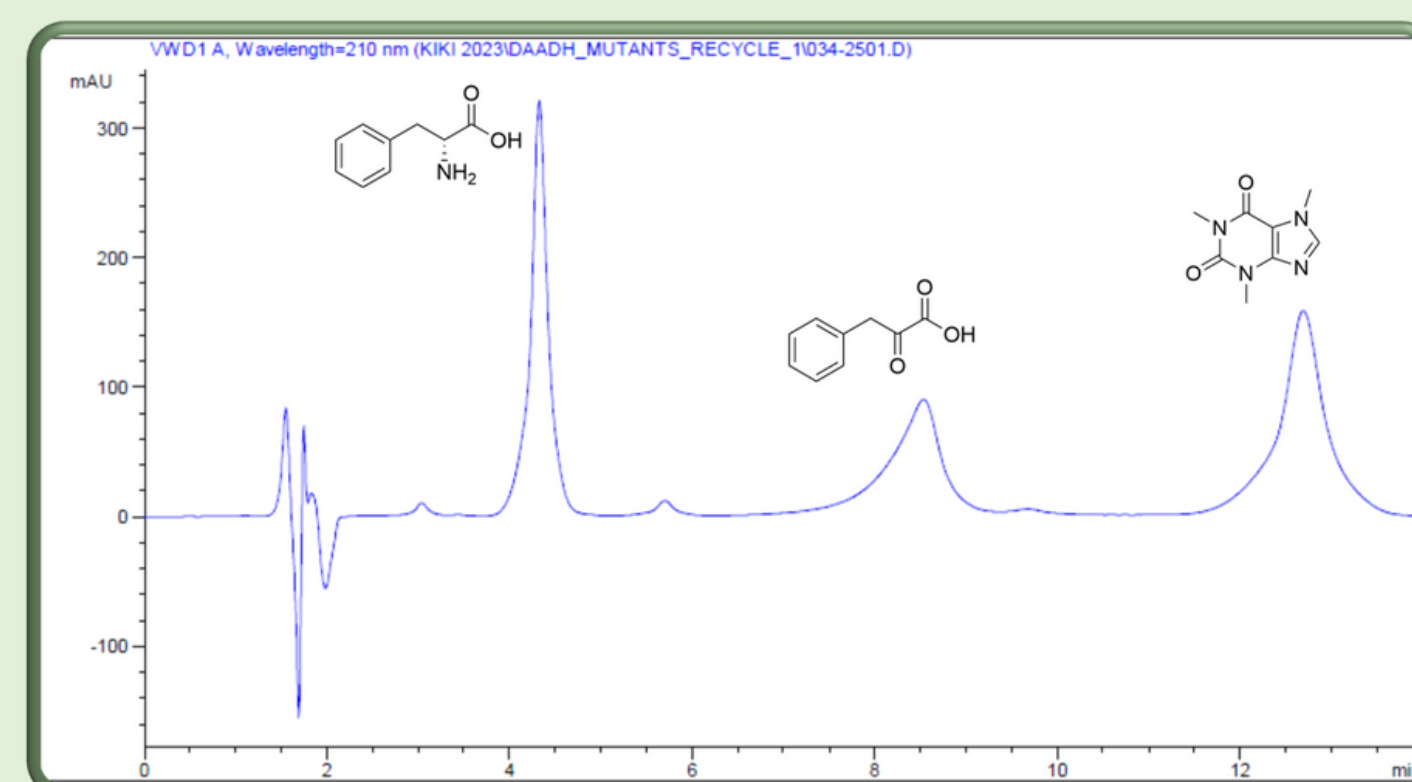


## Rekombináns fehérjetermelés

## Analízis

### Aktivitás mérés

### Katalitikus hatékonyság mérése

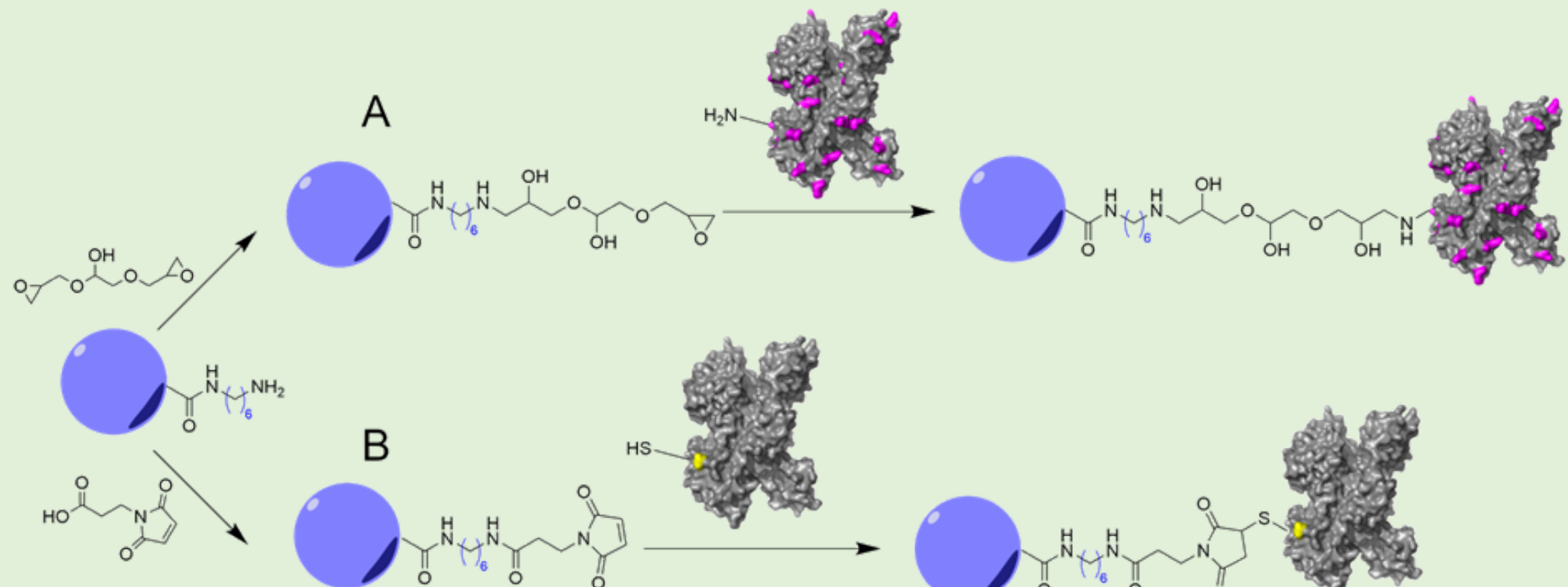
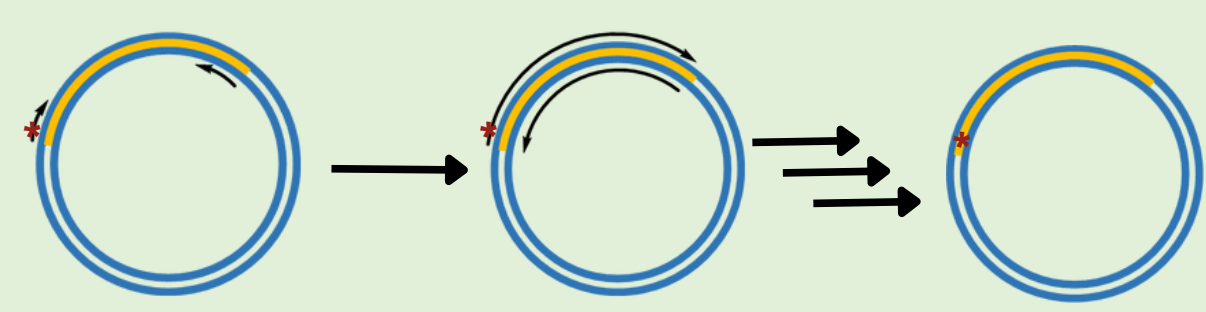


A HPLC módszer során koffeint alkalmaztunk belső standardként. Egy fordított fázisú Phenomenex Luna C8(2) (150x4,6 mm; 5 µm) oszlopot használtunk, az izokratikus mozgófázis összetétele a következő volt: 85% A) 0,1 M NH<sub>3</sub> (pH 8,5) és 15% B) MeOH. A mozgófázis hozama 1 mL/perc volt.

## Hely-specifikus mutagenézis

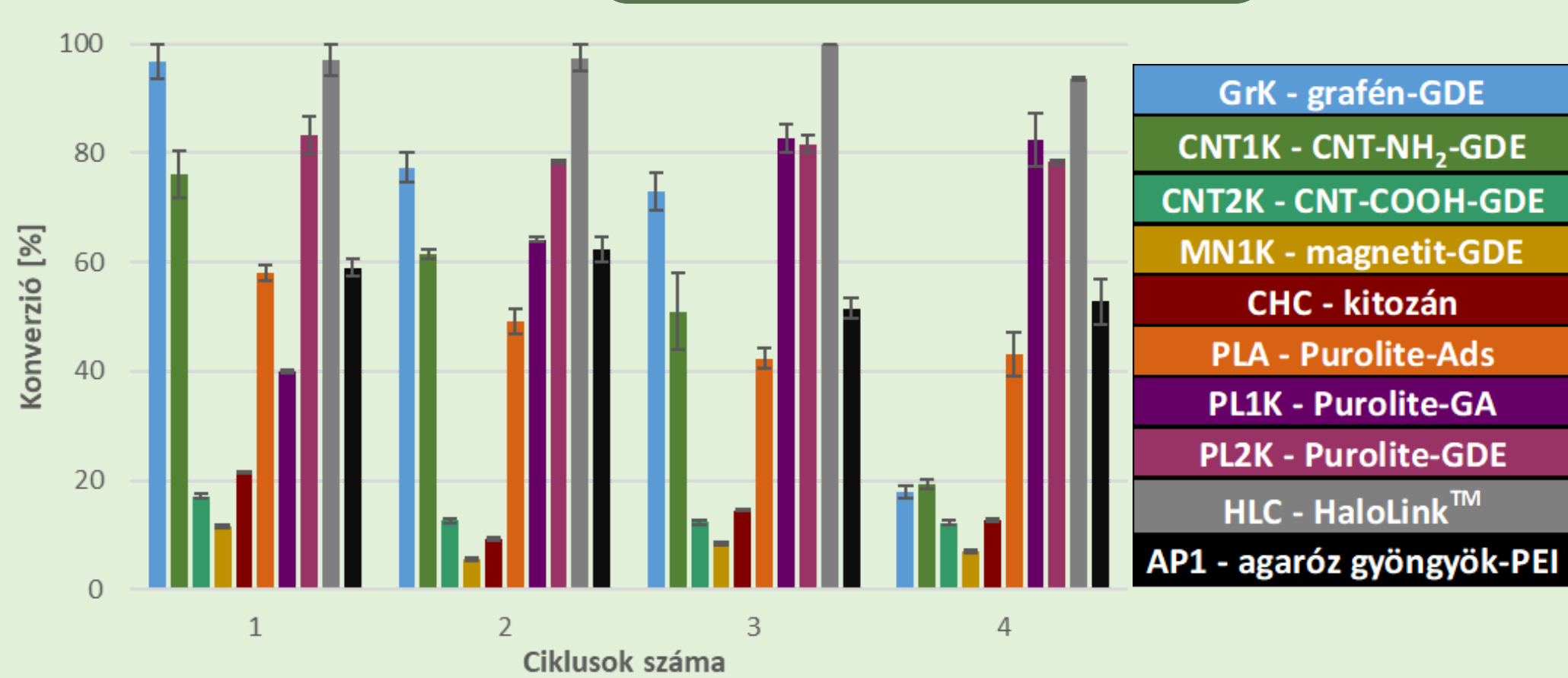
Mutáns	Primer (5'-3')	T <sub>m</sub> [°C]
DAADH_S2C	ATGATGTCGAAATTCGCATTGGCATTGTTG	63
DAADH_S58C	GATGATGCCAGTCTATAAAGATGAAATG	60
DAADH_S92C	GTATTTAATACCATGATGCTTTGATACCCATGC	59
DAADH_S185C	GAATCGCGTGCCTGTGGTGAATAATC	64
DAADH_S192C	CCGGAAGTGTACCCGCGAAAAAC	66
DAADH_S317C	CAGATCTCCGACATTCGGGCTC	65

A hely-specifikus mutagenézis, mely segítségével felületi ciszteinekett vittünk be a maleimid-tiol klikk-reakció végbemeneteléhez, megaprimer módszer segítségével volt elvégezve.



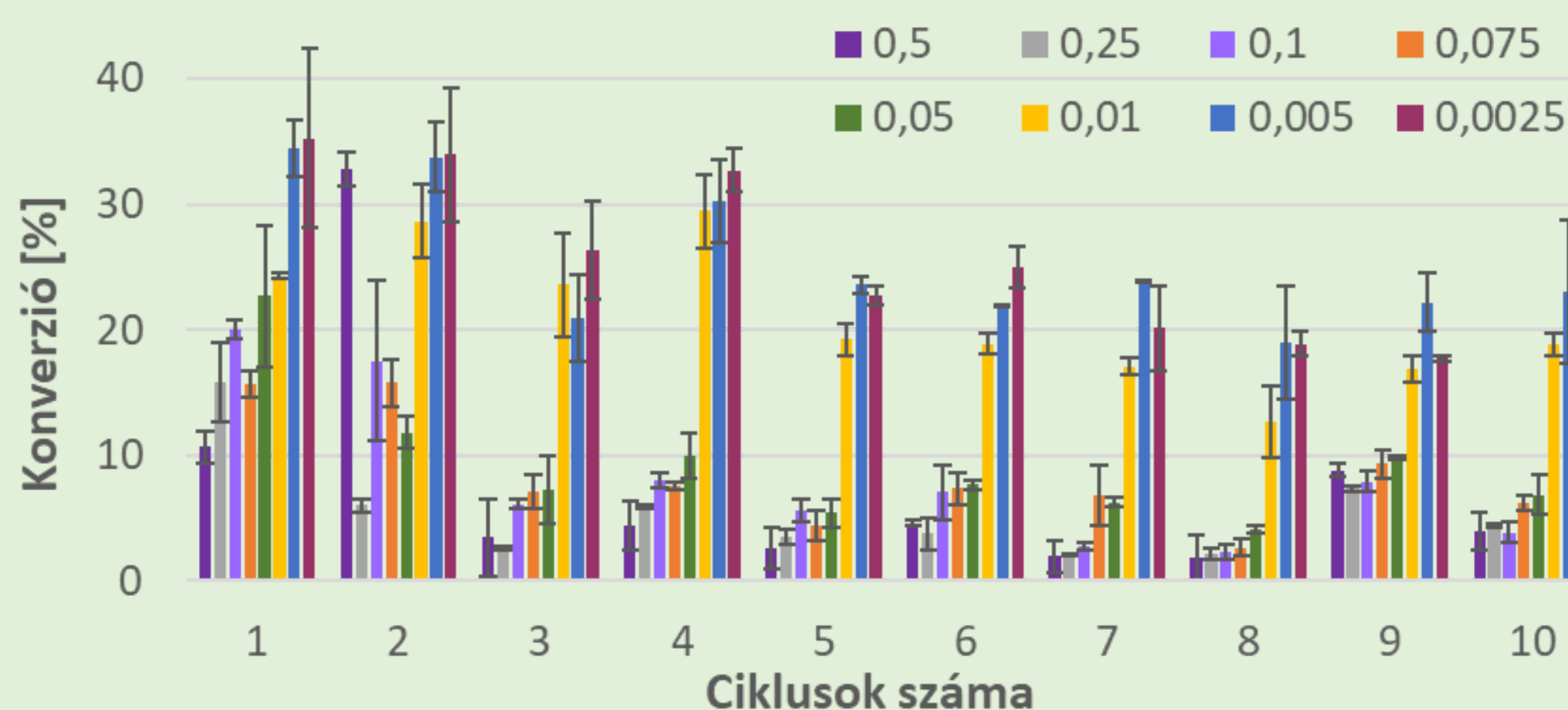
## Eredmények

**Hordozók tesztelése - Újrahasznosíthatóság** A különböző hordozótípusokra immobilizált D-AADH enzim katalitikus hatékonyságának tesztelése 20 órás reakcióban  
**GYŐZTES: PUROLITE ECR8415F**



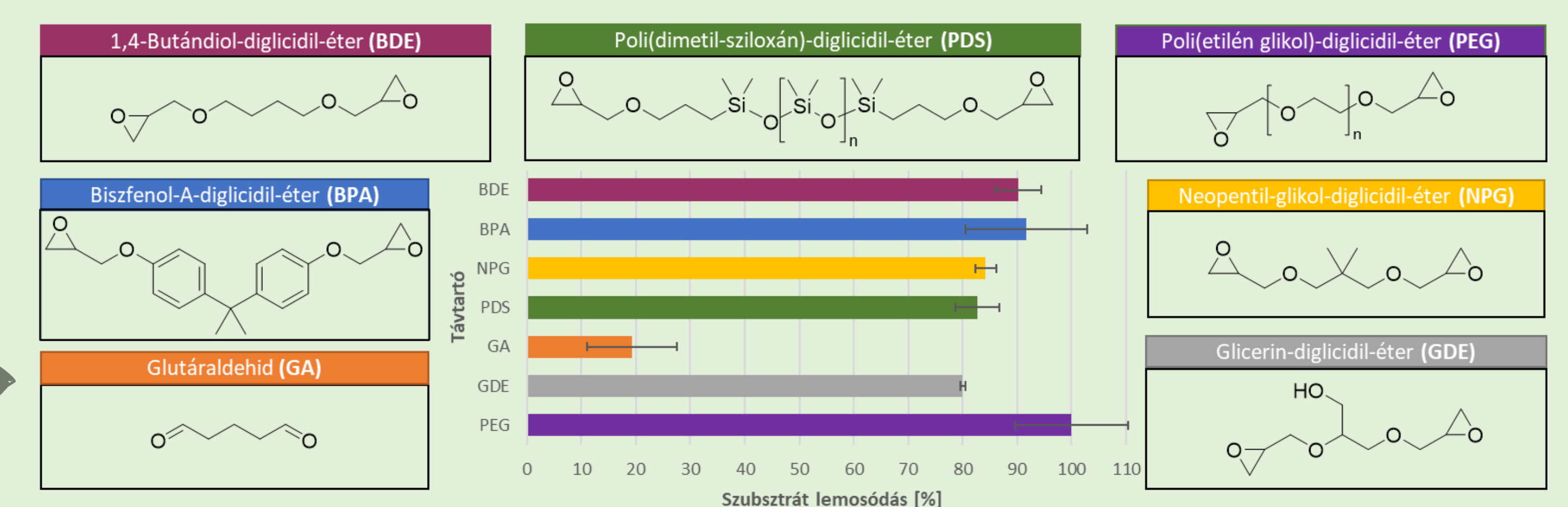
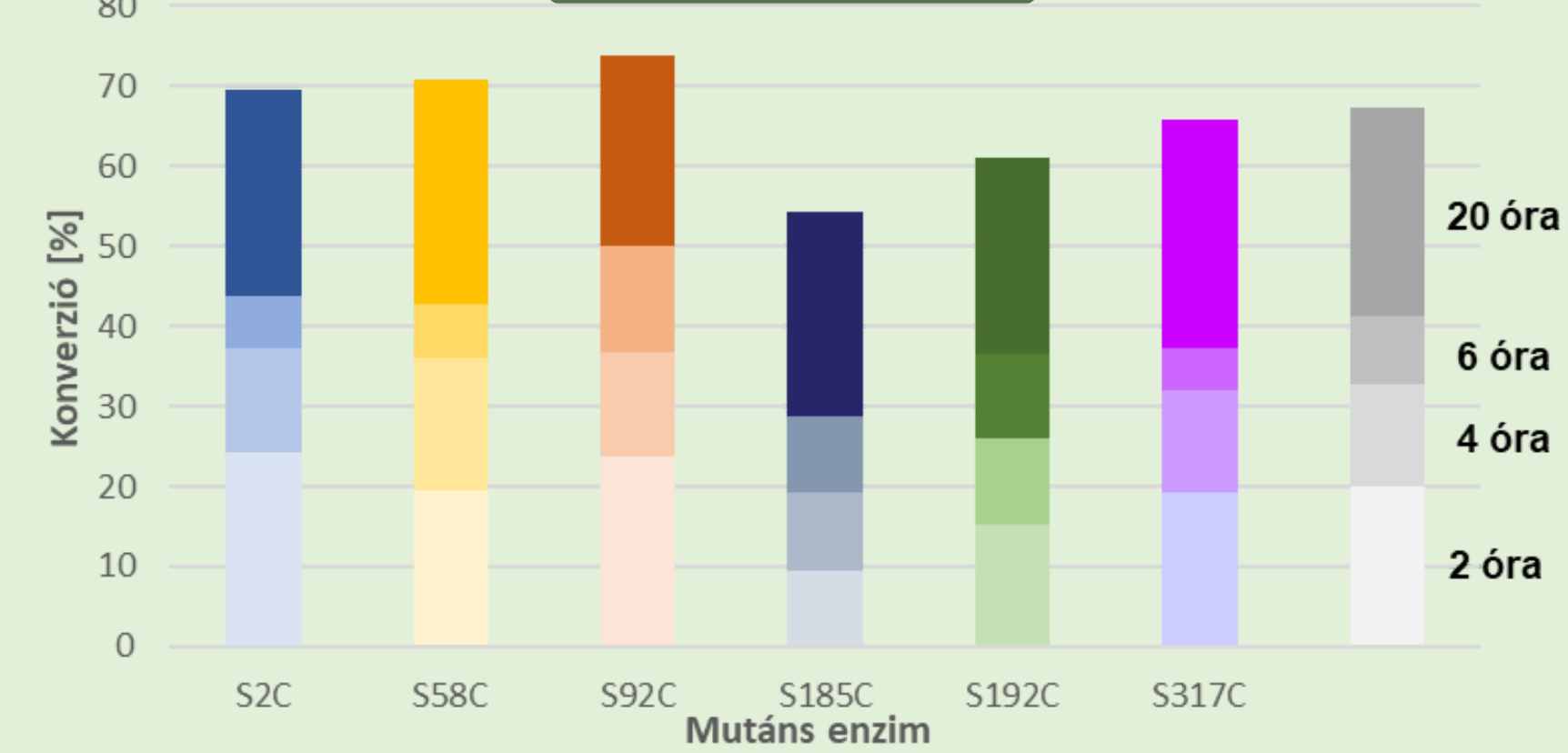
### Optimális enzim:hordozó arány

Egy költséghatékony módszer kidolgozásának érdekében szükséges volt tesztelni a enzim:hordozó arány hatását a katalitikus hatékonyságra.  
**Győztes: 0,005:1 (5 mg DAADH/g Puro-lite ECR8415F)**

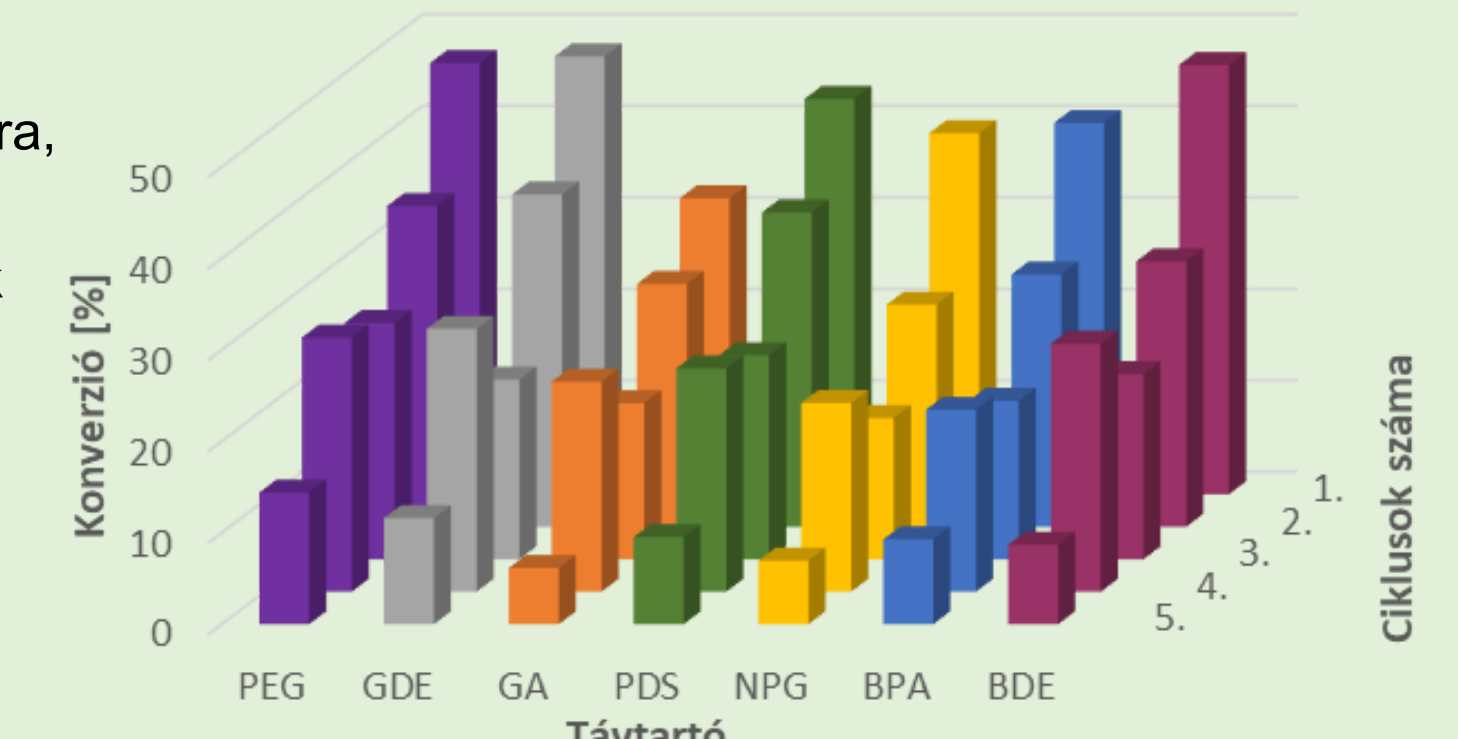


### Hely-specifikus immobilizálás - Hatékonyság az idő függvényében

A különböző hely-specifikus immobilizátumok esetén mértük a konverziók által jellemezhető katalitikus hatékonyságot az idő függvényében (2-4-6-20 óra)  
**S92C >> S58C > S2C**

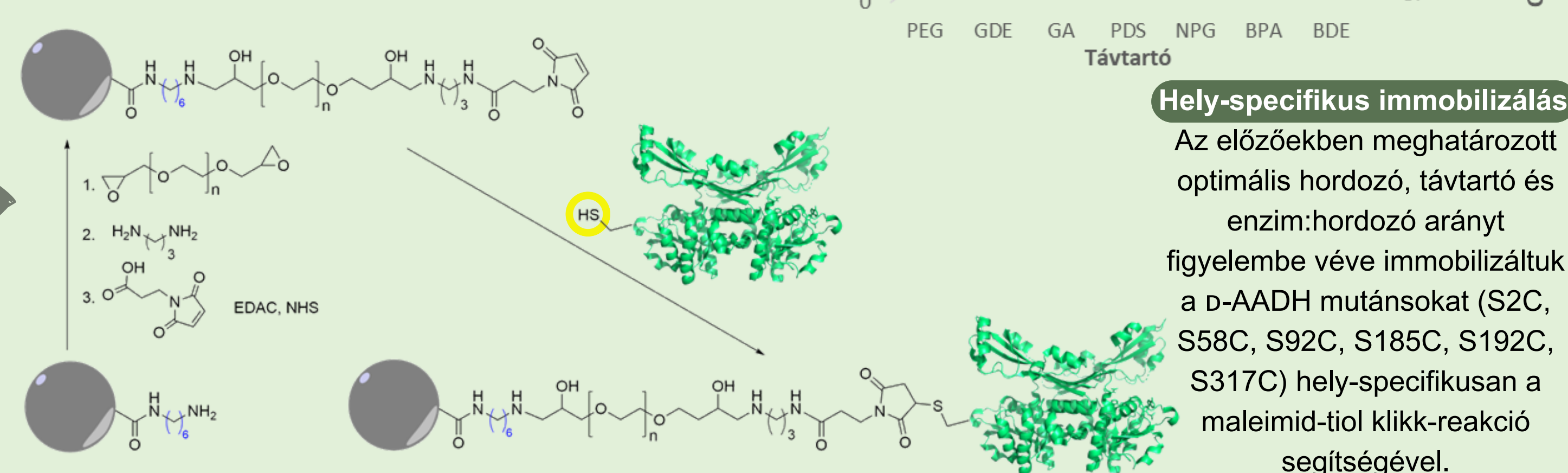


**Távtartó kiválasztás** A GA- és GDE-távtartók esetében megfigyelhető volt a szubsztrát és termék adszorpciója a hordozóra, ezért számos epoxi funkció csoportot tartalmazó távtartót teszteltünk. A különböző távtartókkal előállított immobilizátumok újrafelhasználhatóságát is vizsgáltuk.  
**Győztes: PEG**



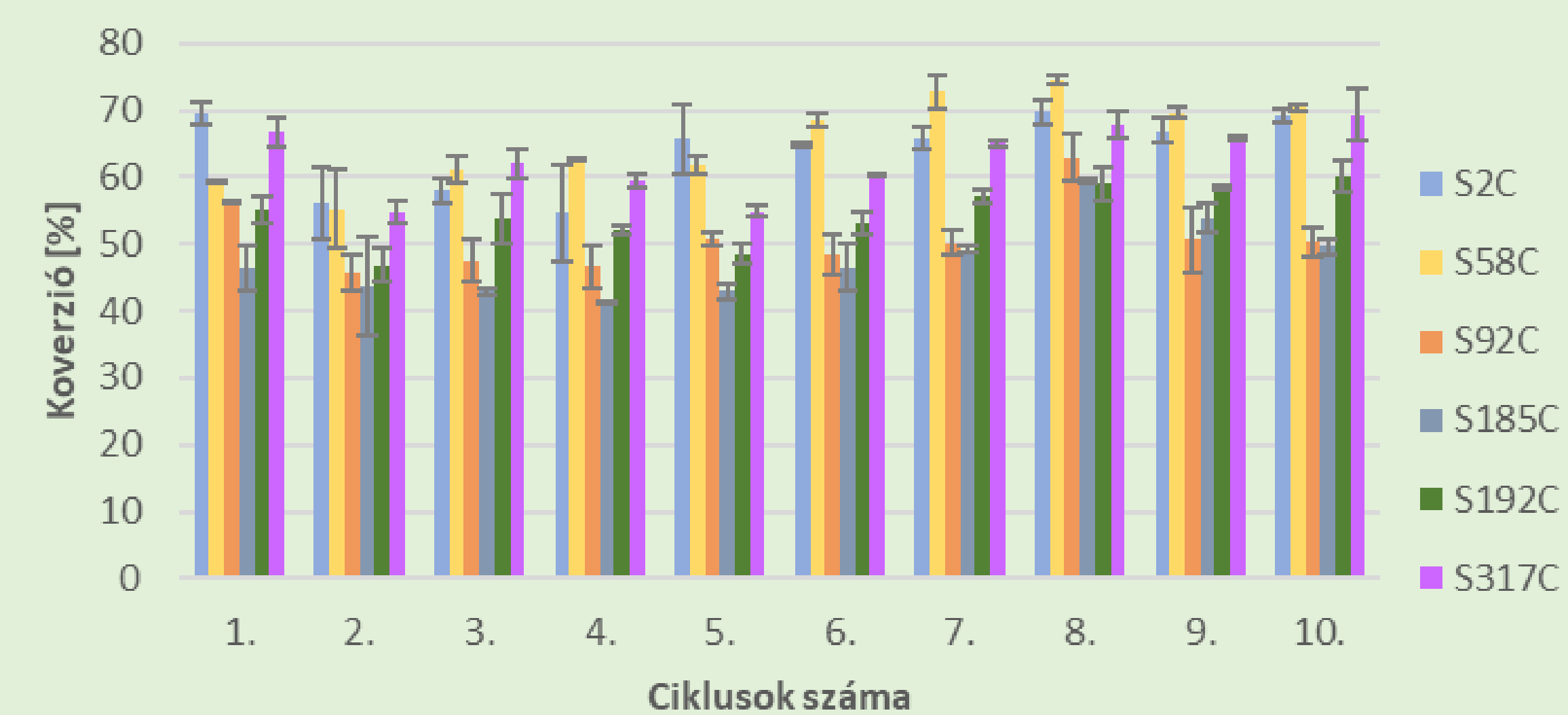
### Hely-specifikus immobilizálás

Az előzőekben meghatározott optimális hordozó, távtartó és enzim:hordozó arányt figyelembe véve immobilizáltuk a D-AADH mutánsokat (S2C, S58C, S92C, S185C, S192C, S317C) hely-specifikusan a maleimid-tiol klikk-reakció segítségével.



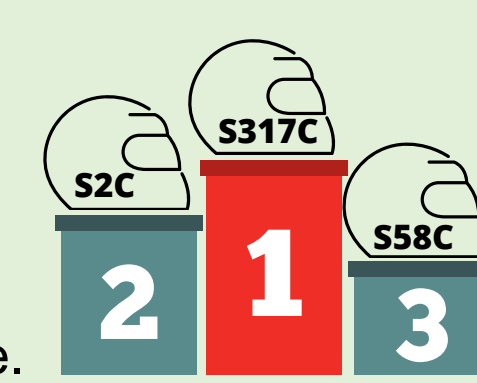
### Hely-specifikus immobilizálás Újrafelhasználhatósági vizsgálat

A katalitikus hatékonyság 10 reakciócikluson keresztül volt vizsgálva  
**S317C >> S2C > S58C**



## Következtetés

- A Puro-lite ECR8415F metakrilát gyanta bizonyult a legjobb hordozónak a *Utd-AADH* enzim immobilizálásához, a kipróbált hordozók közül.
- Az *Utd-AADH* enzim Puro-lite ECR8415F metakrilát gyantára PEG távtartóval immobilizálva magas és stabil katalitikus hatékonyságot mutatott tíz cikluson keresztül, illetve nem volt megfigyelhető a szubsztrát/termék adszorpciója a hordozóra (az ideális enzim:hordozó arány 0,005).
- Az enzim hely-specifikus mutagenézise, majd a mutánsok rögzítése sikeresen lett végezve a megfelelő maleimid-tiol klikk-reakció segítségével.
- Az immobilizátumok hatékonyságának és újrafelhasználhatóságának vizsgálatát követően, kijelenthető, hogy három hatékony biokatalizátort fejlesztettünk ki enantiomertiszta D-aminosavak szintézisére.



## Bibliográfia

- [1] H. Akita, J. Hayashi, H. Sakuraba, T. Ohshima, *Front. Microbiol.* **2018**, 9,1760.
- [2] J. C. Moore, C. K. Savile, S. Pannuri, B. Kosjek, & J. M. Janey. *Comprehensive Chirality*, Elsevier Science, Amsterdam, **2012**.
- [3] Khan M. R., *Bull. Natl. Res. Cent.* **2021**, 45, 207
- [4] J. H. Bartha-Vári, L. C. Bencze, E. Bell, L. Poppe, G. Katona, F.-D. Irimie, C. Paizs, M. I. Toşa, *Period. Polytech. Chem. Eng.* **2017**, 61, 59–66.
- [5] K. Boros, M. E. Moişă, Cs. L. Nagy, C. Paizs, M. I. Toşa, L. C. Bencze, *Catal. Sci. Technol.* **2021**, 11, 5553–5563.

## Köszönetnyilvánítás

Iszlai András-Ernő köszöni az anyagi támogatást az Előfűtár Szövetségnek és a Külgazdasági és Külügyminisztérium Ballasi Bálint ösztöndíjprogramjának.

