



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR
OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA

Fém-fehérje komplex és átmenetifém katalizátorok fejlesztése és
alkalmazása

Tézisfüzet

Szerző: Sánta-Bell Evelin
Témavezető: Dr. Hornyánszky Gábor
Konzulens: Dr. Poppe László

Szerves Kémia és Technológia Tanszék
Bioorganikus Kémiai Kutatócsoport

2021

1. Bevezetés és célkitűzések

Napjainkban egyre inkább előtérbe kerülnek a különböző katalizátorok alkalmazásával megvalósítható szerves kémiai reakciók. Legyen szó akár kémiai, akár biokatalízisről, jellemzően sokkal kedvezőbb körülmények között teszik lehetővé a kívánt vegyület átalakítását. Olyan reakcióutat nyithatók meg segítségükkel, amellyel sok esetben elkerülhető a magas hőmérséklet, nagy reagens felesleg, vagy éppen az erélyes oxidáló- vagy redukálószer alkalmazása.

Az eredendően meghatározott kiralitással rendelkező biokatalizátorokkal lehetőségünk nyílik sztereo-, regio- és enantioszelektív reakciók megvalósítására. Számos átmeneti fémeket alkalmazhatunk elemi vagy ionos formában oxidációs vagy redukációs folyamatok, kapcsolási reakciók során. Az anyagtudomány fejlődésével egyre hatékonyabban és egyre jobb tulajdonságokkal és katalitikus aktivitással rendelkező fémkatalizátorokat tudunk előállítani akár a nano-mérettartományban is.

Mind enzimek, mind a nanoméretű fémkatalizátorok esetében a hatékony alkalmazáshoz szükség lehet, hogy rögzítsük ezeket a katalizátorokat valamilyen szilárd hordozóhoz. Ezzel növelhetjük a katalizátor stabilitását és egyben könnyen szeparálhatóvá és visszaforgathatóvá tehetjük, így élettartama is jelentősen megnő.

Doktori munkám keretében rögzített-fémionaffinitás-technológián alapuló szelektív enzimrögzítési eljárásokat kívántunk kifejleszteni, melyek esetén nem szükséges az enzim előzetes tisztítása. Meg akartuk mutatni a fémionok erőteljes befolyásoló hatását mind a rögzítés folyamatára, mind pedig a rögzített katalizátor tulajdonságaira.

Aminocsoportokat tartalmazó nanorészecskék részleges felületmódosításával kialakított vegyes amin-komplekképző felszínű szilikarészecskét kívántunk alkalmazni hisztidinjelölt foszfataz enzim kétlépéses, szelektív, kovalens rögzítése során. Emellett egy új felületmódosítási módszerrel kívántuk ötvözni a kovalens rögzítés stabilitását a fémionaffinitás-kromatográfia szelektivitásával bifunkciós felületű hordozókon, melyekkel ugyanabban a folyamatban valósítható meg a szelektív kovalens rögzítés. Célunk volt az utóbbi eljárást kiterjeszteni eltérő morfológiájú hordozókra is. Be kívántuk mutatni, hogy az általunk kifejlesztett rögzítési eljárások lehetővé teszik, hogy a rendelkezésünkre álló sokféle többfunkciós epoxivegyület alkalmazásával létrehozzuk az enzim számára legkedvezőbb rögzítési konstrukciót, ezzel is növelve a végső biokatalizátor aktivitását.

Doktori munkám során az arany nanorészecskék előállításában ritkán alkalmazott természetes polimer, az agaróz, hatását terveztük vizsgálni a képződő részecske tulajdonságaira. Az előállított gyenge mechanikai tulajdonságokkal rendelkező agarózgélbe ágyazott nanorészecskék stabilizálását is meg akartuk valósítani egy pórusos metakrilát polimer hordozón történő rögzítéssel. Ez a stabilizálási és rögzítési eljárás lehetővé teszi, hogy a katalizátort áramlásos rendszerben is alkalmazzuk.

Munkánk során célunk volt *N*-szubsztituált *mezo*-3,4-pirrolidinek előállítása és az előállítás során leggyakrabban alkalmazott ozmium-tetroxid katalizátor kiváltása egy olcsóbb és kevésbé toxikus módszerrel. Erre egy ruténium-klorid segítségével megvalósítható reakcióutat kívántunk kidolgozni.

2. Irodalmi háttér

2.1. Enzimrögzítés előnyei, lehetséges módszerek

A rögzített enzimkészítmények előnyei ma már vitathatatlanok. A natív, oldott, formában felhasznált enzimek a környezeti körülményeket (pH, hőmérséklet, ionkoncentráció) tekintve csak egy igen szűk tartományban alkalmazhatóak. Kilépve ebből az optimális tartományból akár igen gyors aktivitásvesztéssel is számolni kell. Ennek kiküszöbölésére ad lehetőséget, ha a biokatalizátort rögzített formában alkalmazzák. Rögzítést követően sok esetben szélesebb tartományban változtathatóak a biokatalitikus reakció körülményei: magasabb hőmérsékleten, szélesebb pH tartományban, nagyobb ionkoncentráció mellett vagy éppen szerves oldószer jelenlétében is jól alkalmazhatóvá válhat a választott enzim¹. Emellett hatalmas előny, hogy ebben a formában lehetőség nyílik a heterogén rendszerből a reakciót követően a rögzített biokatalizátor visszanyerésére és újbóli alkalmazására. Az enzimrögzítési módszereket leggyakrabban fizikai vagy kémiai módszerek közé soroljuk aszerint, hogy az enzimet módosítjuk-e kovalens kötésekkel vagy sem. Fizikai módszerek esetén beszélhetünk valamilyen térhálóban történő rögzítésről², vagy felületi rögzítésről valamilyen másodlagos kölcsönhatásnak köszönhetően (adszorpció, ionos kötések, affinitás alapú kölcsönhatás)³. Kémiai módszerek esetén az enzimet kovalens kötésekkel rögzítjük egy szilárd hordozó felszínéhez, vagy az enzimeket egymáshoz, köztük keresztkötéseket kialakítva⁴.

2.2. Rögzített fémionaffinitás-kromatográfia (IMAC)

A számunkra fontos fehérje kinyerése a többkomponensű – szervetlen, szerves és biológiai szennyezőket tartalmazó - elegyből igen bonyolult, többlépcsős folyamat. Az affinkromatográfiai technikák alkalmazásával egy lépésben is igen szelektív elválasztás érhető el. Igen gyakran alkalmazott az oligohisztidin jelölés, mely a fémionaffinitás-kromatográfia alapja. A hisztidin oldalláncában található nitrogén nemkötő elektronpárja képes komplexet képezni átmenetifémek ionjaival. Elsőként 1975-ben *Porath* és munkatársai készítettek IMAC típusú állófázist és a hisztidin és a cisztein cinkkel és rézzel történő komplexképző tulajdonságát kihasználva megvalósították humán szérumfehérjék elválasztását⁵. Azóta számos rekombináns fehérjetermék tisztítására fejlesztettek ki megfelelő IMAC hordozót⁶.

¹ C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451.

² D. Weiser, F. Nagy, G. Bánóczy, M. Oláh, A. Farkas, A. Szilágyi, K. László, Á. Gellért, G. Marosi, S. Kemény, L. Poppe, *Green Chem.* **2017**, *19*, 3927.

³ Z. Boros, D. Weiser, M. Márkus, E. Abaháziová, Á. Magyar, A. Tomin, B. Koczka, P. Kovács, L. Poppe, *Process Biochem.* **2013**, *48*, 1039; M. Yu, D. Liu, L. Sun, J. Li, Q. Chen, L. Pan, J. Shang, S. Zhang, W. Li, *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *103*, 424.

⁴ J.M. Guisan, *Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press, Totowa, **2013**; D. Weiser, A. Varga, K. Kovács, F. Nagy, A. Szilágyi, B. G. Vértessy, C. Paizs, L. Poppe, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 1463.

⁵ J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature* **1975**, *258*, 598.

⁶ H. Block, *Methods Enzymol.* **2009**, *463*, 439.

2.3. Szelektív enzimrögzítési módszerek

A fehérjetisztítási eljárásokban igen elterjedt fémionaffinitás-kromatográfia sok esetben kellő szelektivitással bír ahhoz, hogy ne csak hisztidinjelölt fehérjék tisztítására, hanem egy lépésben rögzített biokatalizátor előállítására is alkalmazzák. Ez esetben a tisztítási folyamat végén elhagyják a célenzim elúcióját és a további felhasználás során is kerülnek azokat a komponenseket, melyek kiszoríthatják akár az enzimet, akár a fémiont a felületen kialakult komplexből. Ehhez a leggyakrabban alkalmazott komplexképzők az iminodiacetsav és a nitrilotriecetsav⁷. Ezen reverzibilis rögzítési módszer lehetőséget biztosít a hordozó regenerálására az enzim inaktiválódása esetén, mely mind gazdasági, mind pedig környezetvédelmi szempontból előnyös⁸.

Azokban az esetekben amikor elkerülhetetlen valamilyen, az enzim elúcióját eredményező körülmény alkalmazása kovalensen rögzített készítményre van szükség. Az elmúlt évtizedekben több példát is láthattunk, amikor fémionaffinitáson alapuló szelektív rögzítési módszert kombináltak kovalens rögzítéssel⁹. Ezekben az esetekben szükséges, hogy a felület a komplexképző funkció mellett tartalmazzon kovalens kötés kialakítására képes csoportokat is. A rögzítés során első lépésben a célenzim szelektív komplexálása történik meg a felületen rögzített fémionokon keresztül. Ezt a gyorsan lejátszódó folyamatot követi a kovalens kötések kialakulása. Ebben az esetben az epoxicsoportok elsősorban a felülethez legközelebb lévő komplexként kötött célenzimmel alakítanak ki kovalens kötések. Így a folyamat végén egy lépésben nyerhető nagy százalékban a célenzimet tartalmazó kovalensen rögzített biokatalizátor.

2.4. Arany nanokatalizátorok előállítása és alkalmazása

Míg a tömbfázisban megjelenő arany rendkívül inert, a méret csökkenésével számos tulajdonsága jelentősen megváltozik. A kolloid mérettartományban reakcióképességük is megnövekszik így hatékony katalizátorokká válnak. Szerves kémiai szempontból a redoxreakciókban mutatott katalitikus aktivitásuk miatt érdemelnek egyre nagyobb figyelmet¹⁰. Gyakran alkalmazott modellreakció a 4-nitrofenol redukciója, mely során nátrium-tetrahidrido-borátot alkalmaznak hidridforrásként. A reakció kinetikáját *Langmuir-Hinshelwood* modellel írják le mely magába foglal egy direkt és egy kondenzációs utat is. A direkt út során egy nitrozo-, majd hidroxil-amin vegyületen keresztül alakul ki az aminocsoport. A kondenzációs reakció szerint azoxi- valamint azovegyületek keletkeznek, és ezek redukciója során keletkező hidrazobenzolon keresztül képződik az aromás amin¹¹.

⁷ G. Cao, J. Gao, L. Zhou, Z. Huang, Y. He, M. Zhu, Y. Jiang, *Biochem. Eng. J.* **2017**, *128*, 116–125; Y.M. Ko, C.I. Chen, C.C. Lin, S.C. Kan, C.Z. Zang, C.W. Yeh, W.F. Chang, C.J. Shieh, Y.C. Liu, *Biochem. Eng. J.* **2013**, *79*, 200–205.

⁸ A.K. Vahidi, Y. Yang, T.P.N. Ngo, Z. Li, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 3157–3161

⁹ C.I. Chen, C.W. Chen, C.W. Huang, Y.C. Liu, *J. Memb. Sci.* **2007**, *298*, 24–29; O. Barbosa, C. Ortiz, R. Torres, R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, *71*, 124–132; D. Alsafadi, F. Paradisi, *Mol. Biotechnol.* **2014**, *56*, 240–247; S. Tural, B. Tural, A. S. Demir, *Chirality* **2015**, *27*, 635–642.

¹⁰ A. Morel, S.I. Nikitenko, K. Gionnet, A. Wattiaux, J. Lai-kee-him, C. Labrugere, B. Chevalier, G. Deleris, C. Petibois, A. Brisson et al. , *ACS Nano* **2008**, *2*, 847.

¹¹ L. Qin, G. Zeng, C. Lai, D. Huang, C. Zhang, M. Cheng, H. Yi, X. Liu, C. Zhou, W. Xiong, F. Huang,

Több módszert is kidolgoztak már arany nanokatalizátorok előállítására. Számos esetben az arany nanorészecskét már egyből a kívánt hordozó felületére választják le, vagy egyszerre képzik a hordozóval. Ezekről jelentősen eltér a kolloid lecsapásos eljárás, amely során elsőként az arany redukciója és a nanorészecskék képződése történik meg, és csak ezt követi valamilyen adszorpciós vagy rögzítési folyamat. A *Turkevich*-féle eljárás során a hidrogén-tetrakloro-aurát oldatát forráspontig melegítik, majd nátrium-citrátot adagolnak hozzá. A nátrium-citrát nem csak redukálószerként szolgál, hanem stabilizálja is a képződő arany nanorészecskéket¹². Az aranysó és citrát arány megfelelő megválasztásával 15-150 nm között jól befolyásolható a kialakuló részecskeméret¹³.

2.5. *mezo*-Diolok előállítása olefinek oxidációjával

Kettős kötésének oxidálásához és két *cis*-z helyzetű hidroxilcsoport beviteléhez a mai napig igen elterjedten alkalmaznak ozmium-tetroxid katalizátort. Az általunk megvalósítani kívánt szubsztituált pirrolin vegyületek *cis*-z-dihidroxilezése során is gyakran alkalmazzák az ozmium-tetroxid katalizátort *N*-metil-morfolin-*N*-oxid jelenlétében¹⁴. Léteznek ugyan nehézfémmentes módszerek melyekkel jó diasztereomer szelektivitással állíthatunk elő *mezo*-diolokat, de a legtöbb esetben nem szolgáltatják tisztán a *cis*-z-vegyületet¹⁵. Jóval ígéretesebbek az ozmium-tetroxid helyett ruténiumvegyületeket alkalmazó módszerek. Korábbi kutatásokban 0,5 mol% RuCl₃ alkalmazása mellett NaIO₄ és *Lewis-sav* jelenlétében számos olefin oxidációját valósították meg sikeresen és állították elő a megfelelő *mezo*-diolt¹⁶.

3. Fontosabb módszerek

3.1. Fenilalanin ammónia-liáz rögzítése komplexképzéssel

A fémionokat tartalmazó polimer hordozóhoz (20 mg) hozzáadtuk a hisztidinjelölt fehérjét tartalmazó lizátumot (1 ml), melyből a sejttörmelékelt előzetesen centrifugálással eltávolítottuk. Az elegyet 30 percig rázattuk szobahőmérsékleten (450 rpm). Az aspecifikusan adszorbeálódott fehérjéket különböző koncentrációjú só- és imidazololdatokkal mostuk le: kis koncentrációjú sóoldat (LS; 1 ml; 30 mM KCl, 50 mM HEPES, pH 7.5), nagy koncentrációjú sóoldat (HS; 1 ml; 300 mM KCl, 50 mM HEPES, pH 7.5), kis koncentrációjú imidazololdat (LIM; 1 ml; 25 mM imidazol LS-ben, pH 7.5). Az így kapott *PcPAL* biokatalizátort desztillált vízzel mostuk (3×1ml), majd vákuum-száritószekrényben szobahőmérsékleten szárítottuk és argon alatt, hűtőben tároltuk.

W. Cao, *Sci. Total Environ.* **2019**, 652, 93; A. Noschese, A. Buonerba, P. Canton, S. Milione, C. Capacchione, A. Grassi, *J. Catal.* **2016**, 340, 30.

¹² J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *J. Phys. Chem.* **1953**, 57, 670.

¹³ P. Zhao, N. Li, D. Astruc, *Coord. Chem. Rev.* **2013**, 257, 638.

¹⁴ J. A. Rodríguez-Rodríguez, R. Brieva, V. Gotor, *Tetrahedron* **2010**, 66, 6789.

¹⁵ L. Emmanuvel, T. M. Ali Shaikh, A. Sudalai, *Org. Lett.* **2005**, 7, 5071; A. Pilevar, A. Hosseini, J. Becker, P. R. Schreiner, *J. Org. Chem.* **2019**, 84, 12377.

¹⁶ B. Plietker, M. Niggemann, *Org. Lett.* **2003**, 5, 3353; B. Plietker, M. Niggemann, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2402.

3.2. Fenilalanin ammónia-liáz rögzítése komplexképzéssel és kovalens kötésekkel

A fémionokat tartalmazó polimer hordozó (10 mg) illetve mágneses nanorészecske (5 mg) lízis pufferes (1 ml; 50 mM TRISZ, 150 mM NaCl; pH 7,5) szuszpenziójához hozzáadtuk a hisztidinjelölt fehérjét tartalmazó lizátumot (1 ml), melyből a sejttörmelékét előzetesen centrifugálással eltávolítottuk. Az elegyet 20 órán keresztül ráztattuk szobahőmérsékleten (450 rpm). A rögzítési idő elteltével az MNPs esetében neodímium mágnes, polimer hordozók esetén centrifugálással elkülönítettük a hordozókat a felülúszótól. A felülúszót eltettük aktivitásmérés céljából. Az aspecifikusan kötődő fehérjéket sóoldatokkal távolítottuk el: először kis koncentrációjú sóoldattal (LS; 1 ml; 30 mM KCl, 50 mM HEPES, pH 7,5), majd nagy koncentrációjú sóoldattal (HS; 1 ml; 300 mM KCl, 50 mM HEPES, pH 7,5) mostuk a rögzített enzimkészítményeket. A csak komplexben rögzített hisztidinjelölt fehérje lemosásához imidazololdatot használtunk (HIM; 1 ml; 500 mM, LS-ben oldva, pH 7,5). Végül az elkészült PcPAL biokatalizátorokat háromszor mostuk TRISZ pufferrel (1 ml; 100 mM, pH 8,8) és felhasználásig puffer alatt tároltuk.

3.3. PhoN-Sf enzim rögzítése funkcionális szilika nanorészecskéken

A felületmódosított szilika nanorészecskét (SNP-AE0,25-Me; 12 mg) szuszpendáltuk TRISZ pufferben (1 ml; 250 mM; pH 8), mely megfelelő mennyiségben tartalmazta a sejttörmelékeltől elválasztott lizátumot (fémionok és a keresztkötő típusának vizsgálata során 1 U/mg részecske; a kereskedelmi hordozókkal és a további biokatalitikus vizsgálatok során 2 U/mg részecske). A szuszpenziót egy éjszakán át ráztattuk (120 rpm), majd elválasztottuk és kétszer mostuk TRISZ pufferrel (2×5ml). A mosások között a nanorészecskét centrifugálással szeparáltuk (10 perc, 3500 rpm). Ezt követően a nanorészecskéhez fémkomplexben rögzített enzimhez hozzáadtuk a megfelelő keresztkötő oldatát [1 ml; 20 V/V% etanolt tartalmazó TRISZ pufferben (250 mM; pH 8), 2 m/m% GB, NB, PB vagy GA]. Az enzimkészítményt egy éjszakán át ráztattuk szobahőmérsékleten (120 rpm), majd TRISZ pufferrel (2×5ml; 250 mM; pH 8) alaposan mostuk. A rögzített enzimkészítményeket liofilizálást követően 4 °C-on tároltuk.

3.4. Arany nanorészecskék előállítása és rögzítése

Az agaróz oldatát (4,5 ml; 0,5-3,0 m/V % végkoncentráció) folyamatos kevertetés mellett (400 rpm) 90 °C-ra melegítettük. Amikor az agaróz oldat áttetsző lett hozzáadtuk az arany(III)-klorid oldatot (500 µl; 0,1 mM végkoncentráció), és további 30 percig 90 °C-on kevertettük. Az agaróz és az arany nanorészecske keverékéhez szobahőmérsékletre hűtést követően hozzáadtuk a pórusos polimer hordozót (400 mg; Resindion EA 403/S), és 10 percig kevertettük. A fehér polimer hordozó jól láthatóan rózsaszínes-lilás színű lett. Ezt követően a katalizátort centrifugálással választottuk el (330 rcf, 10 perc), etanollal mostuk, és szobahőmérsékleten vákuumszáritószekrényben szárítottuk, végül szobahőmérsékleten tároltuk.

3.5. ((2*R*,3*S*)-2,3-Dihidroxiibután-1,4-diil)dimetánszulfonát (**14**) előállítás

Bemértük a CeCl₃-ot (0,990 g, 4 mmol, 10 mol%) és a NaIO₄-ot (12,8 g; 60 mmol, 1,5 ekv.) egy 250 ml gömblombikba. Hozzáadtunk 18 ml desztillált vizet és a szuszpenziót 50°C-os olajfürdőn, kevertetés közben melegíteni kezdtük. Amikor a szuszpenzió élénksárga színű lett, jeges hűtéssel 0°C-ra hűtöttük, és hozzáadtuk az etil-acetát (60 ml) és acetonitril (50 ml) keverékét. Amikor az elegy hőmérséklete ismét elérte a 0 °C-ot, hozzáadtuk a RuCl₃ katalizátort (0,052 g, 0,20 mmol, 0,5 mol%) kevés desztillált vízben feloldva. Ezt követően a katalizátoros elegyhez adtuk a dimezilát (**10**) acetonitriles oldatát (9,77 g; 40 mmol; 10 ml). A reakcióelegyet 15 percen át intenzíven kevertettük folyamatos hűtés közben, majd 20 g Na₂SO₄-ot és 120 ml etil-acetátot adtunk a reakcióelegyhez. A reakcióelegyet ezután közvetlenül intenzíven kevertetett telített Na₂SO₃ oldatba (160 ml) szűrtük. Miután a szerves fázis teljesen elszíntelenedett, a két fázist szétválasztottuk és a szerves fázist Na₂SO₄-on szárítottuk. Szűrés és bepárlás után a halványsárga kristályos terméket diklórmetánnal eldörzsöltük, és üvegszűrőn kevés diklórmetánnal mostuk. Végül 70%-os termeléssel (7,8 g) kaptuk a kívánt fehér kristályos diolt (**14**).

Op.: 111°C; R_f= 0,33 (hexán:etil-acetát 2:8); ¹H NMR (DMSO-d₆): 3,17 (6H, s, 2 CH₃), 3,64 (2H, s, 2 CH), 4,18 (2H, dd, J=10,1, 5,3 Hz, 2 CH-H), 4,33 (2H, d, J=10,1 Hz, 2 CH-H), 5,51 (2H, d, J=5,3 Hz, OH); ¹³C NMR (DMSO-d₆): 36,65 (2 CH₃), 68,62 (2 CH₂), 72,03 (2 CH); IR (KBr): 525, 533, 853, 956, 1080, 1183, 1348, 3036, 3440, 3507.

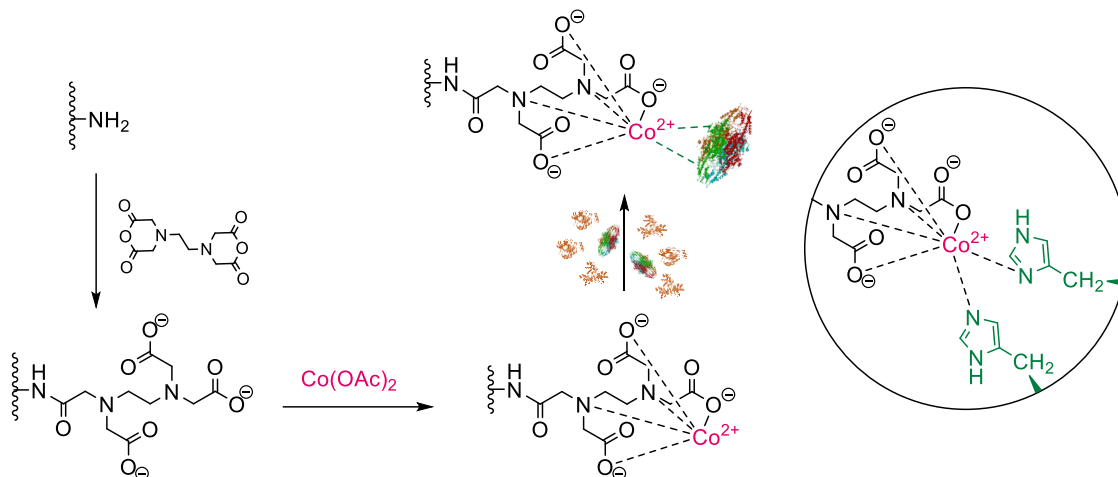
4. Eredmények

4.1. Fenilalanin ammónia-liáz reverzibilis rögzítése¹⁷

Vizsgáltuk a hisztidinjelölt fenilalanin ammónia-liáz enzim szelektív és reverzibilis rögzítését komplexképzővel és különböző átmeneti fémek ionjaival felületmódosított hordozón. A felületmódosítás során az aminocsoportokkal reagáltattunk inert körülmények között etilén-diamin-tetraecetsav-dianhidridet (EDa), így kialakítva a komplexképzésre alkalmas felületet (4.1. ábra). A célenzim rögzítését az öt leggyakrabban alkalmazott átmenetifém-ionnal (Fe³⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) vizsgáltuk. A rögzítéseket minden esetben a fenilalanin ammónia-liázt is tartalmazó fehérjekeverékből végeztük, és kihasználtuk a hordozó maximális enzimirögzítési kapacitását.

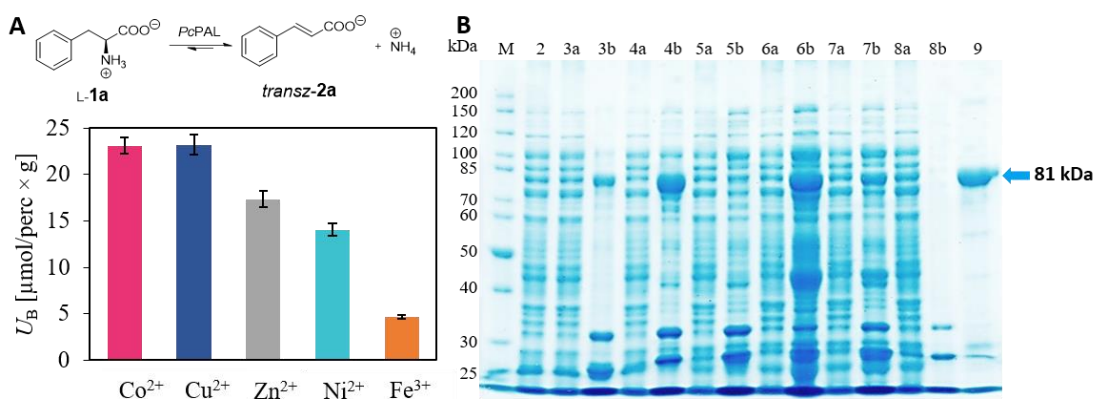
A rögzített biokatalizátorokat az L-fenilalanin (L-**1a**) ammóniaeliminációs reakciójában vizsgáltuk, mely során *transz*-fahéjsav (*transz*-**2a**) keletkezik. A Fe³⁺-és Cu²⁺-ionokat tartalmazó katalizátorok esetén a reakció során intenzív fémionszivárgást figyeltünk meg, mely jól láthatóan narancssárgára, valamint kékre színezte a reakcióelegyet. Co²⁺-ionok alkalmazása mellett mértük az egyik legjobb biokatalitikus aktivitás értékeket (4.2. ábra A).

¹⁷ D. Weiser, Z. Boros, J. Nagy, G. Hornyánszky, E. Bell, P. Sátorhelyi, L. Poppe, SynBiocat: Protein purification, immobilization and continuous-flow processes. Biocatalysis: An Industrial Perspective, Cambridge Royal Society of Chemistry Publishing, 2018, 397-430. ISBN: 978-1-78262-619-0.; E. Sánta-Bell, N.K. Kovács, B. Alács, Z. Molnár, G. Hornyánszky, Periodica Polytechnica-Chemical Engineering, 2021, közlésre elfogadva.



4.1. ábra. Felületi fémkomplex kialakítása aminocsoportokon keresztül etilén-diamin-tetraecetsav-dianhidriddel és hisztidinjelölt fenilalanin ammónia-liáz szelektív rögzítése.

Elvégeztük a rögzítést fémionmentes hordozón is, de egyik esetben sem tapasztaltunk mérhető enzimaktivitást. A rögzítést követően a visszamaradó fehérjekeverék, valamint a hordozó felületén megkötődött fehérjék összetételét gélelektroforézissel vizsgáltuk (4.2. ábra B). Jól látható, hogy a fémionmentes hordozó esetén valóban nem kötődött meg a célenzim (4.2. ábra B-8b). A Cu^{2+} -és a Co^{2+} -tartalmú polimer esetén tapasztaltuk a legnagyobb kapacitást, de előbbinél ez igen csekély szelektivitással társult (4.2. ábra B-4b és 6b). Ezzel ellentétben Fe^{3+} -ionok alkalmazásakor a célenzim jóval kisebb mennyiségben, de jó szelektivitással kötődött (4.2. ábra B-3b).



4.2. ábra. A: Rögzített PcPAL enzimkészítmények biokatalitikus aktivitása L-fenilalanin ammóniaelminációs reakciójában az alkalmazott fémion (■ Co^{2+} ; ■ Cu^{2+} ; ■ Zn^{2+} ; ■ Ni^{2+} ; ■ Fe^{3+} ;) függvényében. **B:** Rögzített PcPAL biokatalizátorok SDS-PAGE vizsgálata. M: standard fehérjekeverék, 2: Sejtlizátum, 3-7: PcPAL rögzítése a különböző fémionokat tartalmazó IMAC-hordozón (3: Fe^{3+} , 4: Co^{2+} , 5: Ni^{2+} , 6: Cu^{2+} , 7: Zn^{2+} , 8: fém mentes; a: fehérjekeverék a rögzítést követően, b: hordozó a rögzítést követően), 9: NiNTA-n tisztított PcPAL (81 kDa).

Mivel a Co^{2+} -ionokat tartalmazó hordozó esetén nem tapasztaltunk fémionszivárgást, az így kapott biokatalizátorok aktivitása végig kiemelkedő, ez esetben a legjobb a kapacitás és a szelektivásban is az elsők között volt. Így a továbbiakban ezzel a biokatalizátorral (HA- E_{Co} -PAL) végeztünk hőstabilitási és visszaforgathatósági vizsgálatokat.

A hőstabilitási vizsgálatok során 20 és 80 °C között 5 °C-os lépésközöket alkalmazva

vizsgáltuk a hőmérséklet hatását a biokatalitikus aktivitásra L-fenilalanin (L-1a) átalakítása során. Azt tapasztaltuk, hogy a 2 óra alatt elért konverzió 60 °C-ig folyamatosan nőtt, de 40 °C-nál már végbementek olyan változások melyek már tartósan negatívan befolyásolták a biokatalizátor aktivitását. A 65 °C-nál nagyobb hőmérsékletek esetén már oly mértékben károsodott az enzim, mely szinte teljes inaktiválódást eredményezett.

Vizsgáltuk, hogy több egymást követő ciklusban hogyan teljesít a HA-E_{Co}-PAL biokatalizátor. Az eredményekből megállapítható, hogy a harmadik ciklus után kezdődik egy jelentősebb aktivitásvesztés, de az ötödik kör végén is még közel 50%-a megmaradt a kezdeti aktivitásnak. Mivel egy reverzibilis rögzítési módszert alkalmaztunk ezért lehetőség nyílt nem csak a biokatalizátor, hanem a katalizátorhordozó visszaforgatására is. Ehhez kidolgoztunk egy megfelelő módszert a PcPAL lemosására. A komplexált Co²⁺-ionok és így a PcPAL jelentős részét dietilén-triamin oldattal (5 V/V%), majd az erős ionos kölcsönhatás miatt a felületen maradt enzimet egy telített sóoldatos mosással távolítottuk el, és a megtisztított hordozót kipróbáltuk egy következő enzimirögzítési ciklusban. A felületre Co²⁺-ionokat komplexáltattunk, majd a fehérjekeverékből elvégeztük a PcPAL rögzítését. Az első, valamint a második rögzítést követően mért biokatalitikus aktivitásokat összehasonlítva elmondható, hogy nincs jelentős különbség az újonnan előállított és a regenerált hordozón mért aktivitások között (friss hordozó: 23,1±0,8 U/g; regenerált hordozó: 22,8±1,0 U/g).

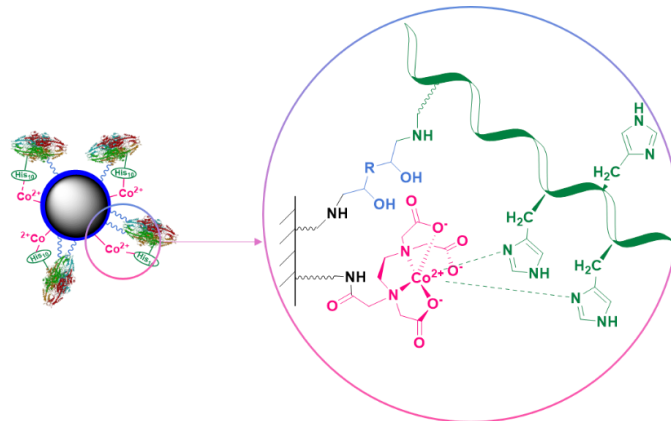
Vizsgáltuk a rögzítésben résztvevő funkciók felületi sűrűségének hatását is. Az EDTA-dianhidriddel mellett glicidolt alkalmazva 8 különböző arányban vittük be a felületre a két csoportot. Így lehetőségünk nyílt, hogy szabályozzuk a rögzített enzim mennyiségét és felületi elhelyezkedését. Amennyiben túl sűrűn vannak a kötőpontok előfordulhat, hogy a zsúfoltan elhelyezkedő enzimek akadályozzák egymás konformációs mozgását. Bár a rögzített enzimmészítmények biokatalitikus aktivitásában nem tapasztaltunk jelentős eltérést, a kötőpontok ritkítása a legtöbb esetben alacsonyabb kapacitással járt, a fajlagos enzimaktivitás pedig ennek megfelelően megnövekedett. Ez azt jelenti, hogy ugyanakkora biokatalitikus aktivitással rendelkező készítmény előállításához kevesebb enzimre volt szükség. A felületmódosítás optimalizálásával tehát elértük, hogy a csak komplexképző csoportokat tartalmazó hordozóhoz (HA-E_{Co}-PAL) képest az EDTA-dianhidrid és glicidol 1:24 arányú keverékével felületmódosított polimer esetén (HA-EG24_{Co}-PAL) közel 30%-pontosan növekedett a fajlagos enzimaktivitás, és elérte a natív, rögzítetlen enzim aktivitását (fajlagos enzimaktivitás: HA-E_{Co}-PAL: 76%; HA-EG24_{Co}-PAL: 103%).

4.2. Fenilalanin ammónia-liáz szelektív kovalens rögzítése¹⁸

Bifunkciós felületű – komplexképző és epoxicsoportokat is tartalmazó – hordozón megvalósítottuk a fenilalanin ammónia-liáz rögzítését (4.3. ábra). Az általunk kidolgozott felületmódosítási eljárás lehetőséget biztosít a komplexképző és az

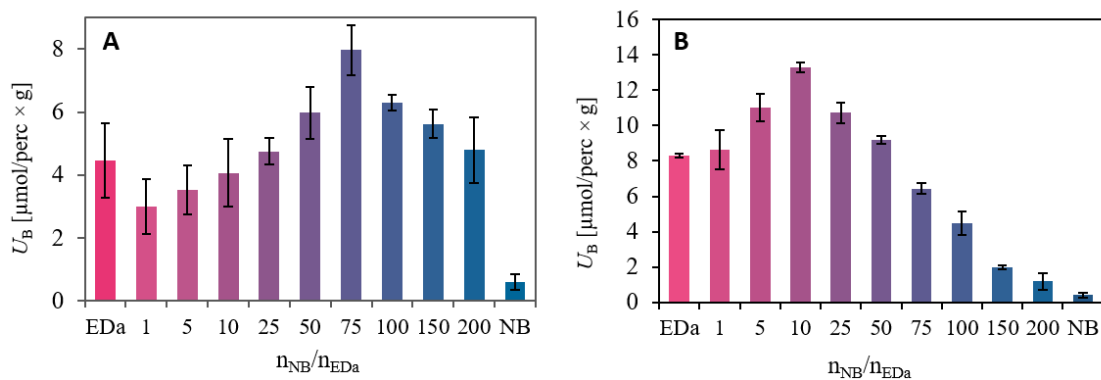
¹⁸ E. Sánta-Bell, Z. Molnár, A. Varga, F. Nagy, G. Hornyánszky, C. Paizs, D. Balogh-Weiser, L. Poppe: *Molecules*, **2019**, 24(22), 4146.

epoxidegyület változatos alkalmazására.



4.3. ábra. Fenilalanin ammónia-liáz szelektív kovalens rögzítése.

A két funkciós csoport arányát egy pórusos polimer hordozón és mágneses nanohordozón is optimalizáltuk. Polimer hordozó esetén az 1:75, míg nanorészecske esetén az 1:10 EDTA-dianhidrid:neopentilglikol-diglicidil-éter arány bizonyult a legjobbnak (4.4. ábra).



4.4. ábra. A felületmódosítás során alkalmazott bisepoxi- és komplexképző vegyületek arányának hatása a rögzített PcPAL biokatalizátorok specifikus biokatalitikus aktivitására az L-1a ammóniaeliminációs reakciójában A: polimer hordozón, B: mágneses nanorészecsken.

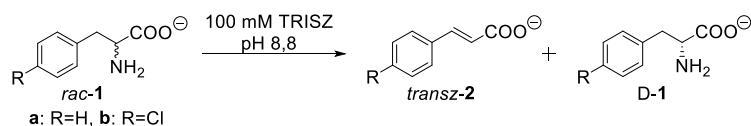
Hordozónként a legjobb arányt alkalmazva megvalósítottuk a felületmódosítást 10 különböző epoxidegyülettel. Mindkét hordozótípus esetén egy nagy térkitöltésű három aromás gyűrűt tartalmazó triszepoxidegyülettel kaptuk a legnagyobb kapacitású és aktivitású biokatalizátort (P:14,8 U/g; MNP:24,7 U/g).

4.1. Táblázat. Szelektív és nem specifikus kovalens rögzítés hatékonysága különböző célezimtartalmú fehérjekeverékek esetén. A biokatalizátorokat az L-1a ammóniaeliminációs reakciójában vizsgáltuk.

Célezimtartalom [%]	$U_B^{\text{MNP-NP-PAL}}$ [$\mu\text{mol} \times \text{perc}^{-1} \times \text{g}^{-1}$]	$U_B^{\text{MNP-E/NP10Co-PAL}}$ [$\mu\text{mol} \times \text{perc}^{-1} \times \text{g}^{-1}$]	$\frac{U_B^{\text{MNP-E/NP10Co-PAL}}}{U_B^{\text{MNP-NP-PAL}}}$
3,8	0,4	13,7	34,2
5,0	0,5	12,3	24,1
10,0	1,0	12,6	13,2
25,0	3,3	13,2	4,0
50,0	8,3	13,4	1,6
75,0	11,9	13,6	1,2
90,0	12,4	13,6	1,1
100,0	14,2	14,1	1,0

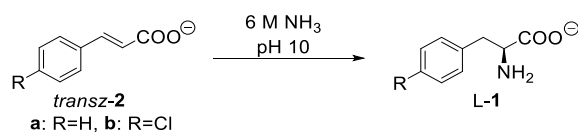
Vizsgáltuk az általunk előállított, szelektív rögzítésre alkalmas hordozó hatékonyságát különböző célenzimtartalmú fehérjekeverékeken. Referenciaként minden esetben elvégeztük az enzimrögzítést a szelektivitás biztosító csoportokat nem tartalmazó, csak epoxivegyülettel módosított, részecskén. Eredményeinkből kiderült, hogy még magas célenzim-koncentráció esetén is hatékonyabb a szelektivitást biztosító részecske. Egyedül a tisztított enzimoldatból történő rögzítés esetén kaptunk magasabb biokatalitikus aktivitással rendelkező készítményt.

4.2. Táblázat. MNP-E/NB10_{C₀}-PAL és MNP-E/FT10_{C₀}-PAL biokatalizátorok hatékonysága a *rac-1a* és *rac-1b* ammóniaeliminációs reakcióiban öt cikluson keresztül.



	Visszaforgatási ciklus száma	MNP-E/NB10 _{C₀} -PAL		MNP-E/FT10 _{C₀} -PAL	
		c [%]	ee _{D-1} [%]	c [%]	ee _{D-1} [%]
<i>rac-1a</i>	1	49	82	52	93
	2	48	78	51	92
	3	45	71	48	91
	4	43	67	47	91
	5	43	64	47	89
<i>rac-1b</i>	1	49	»99	50	»99
	2	49	»99	50	»99
	3	49	»99	49	»99
	4	49	»99	50	»99
	5	49	99	49	»99

4.3. Táblázat. MNP-E/NB10_{C₀}-PAL és MNP-E/FT10_{C₀}-PAL biokatalizátorok hatékonysága a *transz-1a* és *transz-1b* ammóniaaddíciós reakcióiban öt cikluson keresztül.

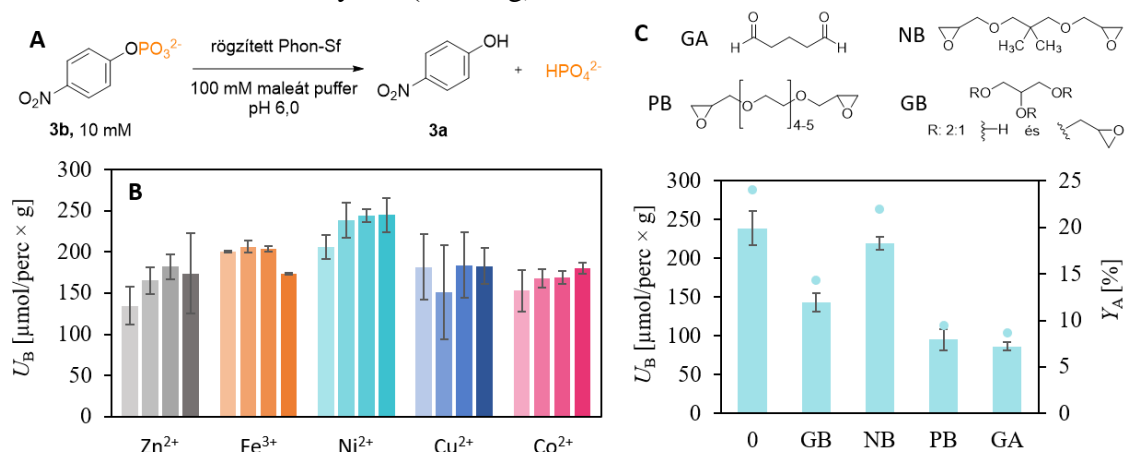


	Visszaforgatási ciklus száma	MNP-E/NB10 _{C₀} -PAL		MNP-E/FT10 _{C₀} -PAL	
		c [%]	ee _{L-1} [%]	c [%]	ee _{L-1} [%]
<i>transz-2a</i>	1	85	»99	86	»99
	2	86	»99	87	»99
	3	85	»99	86	»99
	4	82	»99	86	»99
	5	70	»99	83	»99
<i>transz-2b</i>	1	92	»99	91	»99
	2	91	»99	91	»99
	3	88	»99	89	»99
	4	79	»99	85	»99
	5	61	»99	73	»99

4.3. Savas foszfátok szelektív rögzítése¹⁹

A foszfát enzimmel kapcsolatos kísérletek a grazi Műszaki Egyetemen való együttműködésben zajlottak. A bemutatott eredmények Nagy Flórával való közös munka nyomán születtek.

Munkánk során egy hisztidinjelöléssel ellátott savas foszfátot – Phon-Sf – rögzítettünk komplexképző ágenst és aminocsoportokat tartalmazó bifunkciós szilika részecskékhez. A rögzítés során első lépésben szelektíven komplexáltuk a célenzimet a sejtizátumból, majd egy második lépésben biszepoxidokkal vagy glutáraldehiddel kovalensen kötések hoztunk létre a felület aminocsoportjai és az enzim reaktív oldalláncai között. Optimalizáltuk a szükséges komplexképző mennyiségét és vizsgáltuk a fémionok hatását is (4.5. ábra B). Az eredmények alapján kapacitásban, aktivitásban és szelektivitásban is a Ni²⁺-tartalmú részecskék bizonyultak a legalkalmasabbnak a savas foszfát rögzítésére. Három biszepoxidegyülettel (GB, NB, PB) és az enzimirögzítések során gyakran alkalmazott glutáraldehiddel is megvalósítottuk a kovalens stabilizálást (4.5. ábra C). A legjobb eredményt a neopentilglikol-diglicidil-éterrel értük el, amely 220 U/g-os specifikus biokatalitikus aktivitása alig maradt el a kiindulási keresztkööt nem tartalmazó készítményétől (239 U/g).



4.5. ábra. Rögzített Phon-Sf biokatalizátorok vizsgálata. **A:** a vizsgált tesztreakció a 4-nitrofenil-foszfát (3b) hidrolízise. **B:** a felületi komplexképző-mennyiség és a fémionok hatása a biokatalitikus aktivitásra. A felületmódosítás során alkalmazott EDA mennyiségek minden fém esetén a következők voltak: 0,125; 0,250; 0,375 és 0,500 ekvivalens az előző felületmódosítási lépésben alkalmazott aminoszilán mennyiségéhez viszonyítva. **C:** Keresztköötők hatása a szelektíven rögzített és kovalensen stabilizált Phon-Sf biokatalizátorok aktivitására.

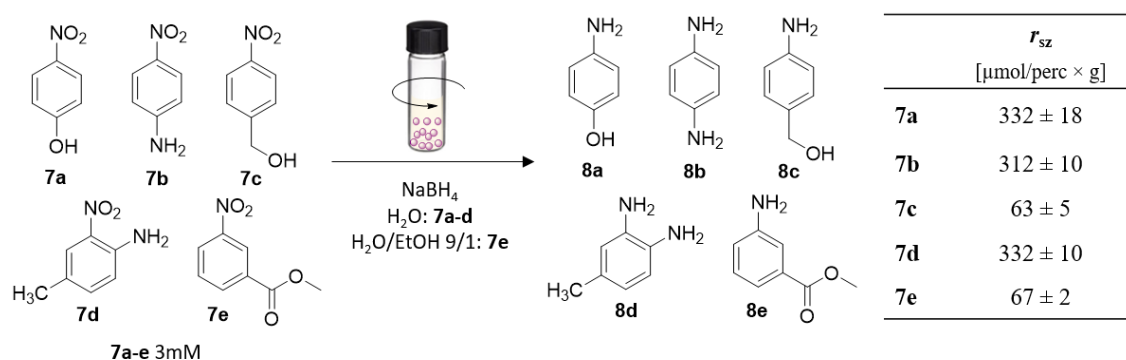
A komplexképzés során alkalmazott enzimmennyiség növelésével a végső biokatalizátor aktivitást sikerült majdnem háromszorosára növelni (600 U/g), mely messze meghaladta a kereskedelmi Fe³⁺ tartalmú, hisztidinjelölt fehérjék komplexképzésére kifejlesztett hordozó (EziG-1, 2, és 3Fe) alkalmazásával kapott készítmény aktivitását (EziG1-3Fe: 80-105 U/g).

¹⁹ F. Nagy, G. Tasnádi, D. Weiser, E. Bell, M. Hall, K. Ditrich, K. Faber, L. Poppe, *ChemCatChem*, **2018** 53 pp. 1-11.

4.4. Arany nanorészecskék előállítása és alkalmazása²⁰

Az agaróz és arany(III)-só arányának optimalizálását követően 0,1 mM HAuCl₄ és 1 m/V% agaróz összetételű reakcióban állítottunk elő 50 nm-nél kisebb arany nanorészecskéket (AuNPs). Az agarózgélbe ágyazott AuNPs-t egy pórusos metakrilát polimer hordozón (Resindion EA 403/S) rögzítettük. Az így előállított könnyen kezelhető és jó mechanikai stabilitással rendelkező katalizátort 5 aromás nitrovegyület redukciójában alkalmaztuk. Minden esetben a kívánt aromás amint kaptuk.

Az AuNPs-AR-P katalizátort oszlopba töltve folyamatos áramlásos rendszerben is kipróbáltuk a **7a** redukciójában. A redukálószer NaBH₄-et végig tízszeres feleslegben alkalmaztuk a nitrovegyülethez képest. Mind az áramlási sebességnek, mind pedig a szubsztrát koncentrációnak jelentős hatása volt a konverzióra. Megfelelő beállítások mellett azonban hatékonyan tudtuk alkalmazni a folyamatos áramlásos rendszert a modellvegyületként választott **7a** redukciójában. A rögzítés megfelelően stabilnak bizonyult, sem szakaszos sem folyamatos áramlásos rendszerben nem tapasztaltuk az arany nanorészecskék szivárgását.



4.6. ábra. Aromás nitrovegyületek redukciója NaBH₄-del AuNPs-AR-P katalizátor jelenlétében.

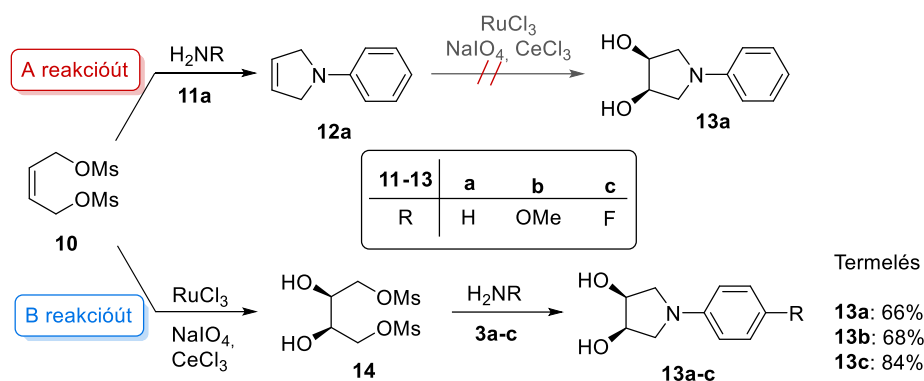
4.5. N-Szubsztituált *mezo*-3,4-dihidroxipirrolidin-vegyületek előállítása ruténiumkatalízissal²¹

Mivel a **12a** vegyület ruténium jelenlétében történő oxidációja során nem jártunk sikerrel korábbi irodalmi analógia alapján megvalósítottuk a **10** vegyület *cis*-dihidroxilezését RuCl₃ és NaIO₄ jelenlétében.

Méretnövelés és a reakcióidő optimalizálását követően 0,005 ekvivalens RuCl₃ katalizátor alkalmazása mellett, oszlopkromatográfiás tisztítás nélkül 70%-os termeléssel állítottuk elő a kívánt **14** diolt. A gyűrűzárást három aromás aminnal valósítottuk meg, így jutva a szubsztituált *mezo*-3,4-dihidroxipirrolidin-származékokhoz.

²⁰ R. Szűcs, D. Balogh-Weiser, E. Sánta-Bell, E. Tóth-Szeles, T. Varga, Z. Kónya, L. Poppe, I. Lagzi, *RSC Advances*, **2019**, 9, pp. 9193.

²¹ E. Bell, Z. Boros, G. Hornyánszky, *Periodica Polytechnica-Chemical Engineering*, **2015** 59:(2) 124.



4.7. ábra. *N*-szubsztituált *mezo*-3,4-dihidropirrolidin-vegyületek előállítása OsO₄ mentes reakcióban.

5. Tézisek

1. Sikeresen megvalósítottuk a *Petroselinum crispum* fenilalanin ammónia-liáz enzimének szelektív rögzítését a reverzibilis kötést biztosító fémionaffinitás-kromatográfia elvét alkalmazva. Azonosítottuk a kobaltot, mint a legnagyobb szelektivitással, kapacitással rendelkező és a leghatékonyabb biokatalizátort eredményező fémiont. Maximalizáltuk a fajlagos enzimaktivitást a rögzítési pontok mennyiségének szabályozásával glicidolt alkalmazva a felületmódosítás során. [P I, P III]
2. Kidolgoztunk egy regenerálási módszert, mely alkalmas a reverzibilisen rögzített enzim és a fémion eltávolítására a hordozó felületéről. Bizonyítottuk, hogy a regenerált hordozón elvégzett rögzítés ugyanolyan hatékony biokatalizátort eredményez, mint a frissen felületmódosított hordozó alkalmazása esetén. [P I]
3. Kifejlesztettünk egy olyan új felületmódosítási eljárást hisztidinjelölt enzimek szelektív rögzítésére, mely könnyen alkalmazható aminocsoportokkal funkcionizált felületeken, és lehetőséget biztosít, mind a komplexképzők, mind pedig az epoxivegyületek változatos alkalmazására. Sikeresen alkalmaztuk a módszert és optimalizáltuk két egymástól teljesen eltérő hordozó típuson a fenilalanin ammónia-liáz enzim szelektív rögzítésében. A rögzítést tíz eltérő epoxivegyülettel megvalósítva megmutattuk, hogy a módosító epoxivegyület típusa jelentős hatással van a végső biokatalizátor aktivitására. [P II]
4. Bizonyítottuk, hogy az általunk előállított, fémionaffinitás-elemet és epoxifunkciókat tartalmazó bifunkciós mágneses nanohordozó még nagy célenzim koncentráció mellett is hatékonyabb, mint szelektivitást biztosító fémionaffinitás-elemmel nem rendelkező, csak epoxifunkciókat tartalmazó változata. Sikeresen megvalósítottuk a racém fenilalanin és racém 4-klórfenilalanin rezolválását és az *L*-fenilalanin, valamint az *L*-4-klórfenilalanin előállítását a szelektíven rögzített fenilalanin ammónia-liáz katalizátorokkal. Igazoltuk, hogy a biokatalizátorok öt körben visszaforgatva végig kiváló enantiomerfelesleggel képezték az *L*-aminosavakat a telítetlen savakra történő ammóniaaddíciós folyamatban. [P II]
5. Megvalósítottuk egy savas foszfatáz enzim kétlépéses szelektív rögzítését közvetlenül a sejtlyázumból. Szisztematikusan optimalizálva a fémion típusát és a

komplekképző mennyiségét elértük, hogy nagy enzimkötő kapacitás mellett is elegendő aminocsoport maradjon az utólagos kovalens stabilizáláshoz. Neopentilglikol-diglicidil-éter keresztkötő alkalmazásával a kovalens stabilizálást követően alig tapasztaltunk csökkenést a készítmény specifikus biokatalitikus aktivitásában. Az általunk fejlesztett rögzített készítmény aktivitása messze felülmúlta a kereskedelmi referencia hordozókkal elért eredményeket. [P IV]

6. Hatékonyan alkalmaztuk szilárd hordozóként egy makropórusos metakrilát polimert agarózgélbe ágyazott arany nanorészecskék rögzítésére. Feltártuk, hogy az agaróz és az arany(III)-oldat koncentrációjának pontos beállításával jól szabályozható a keletkező arany nanorészecskék mérete és méreteloszlása. Sikeresen alkalmaztuk az így előállított katalizátort aromás nitrovegyületek redukciója során. Demonstráltuk a polimer hordozó nyújtotta előnyöket egy szubsztrát esetén folyamatos átfolyásos rendszerben is. [P V]
7. Megvalósítottuk a ((Z)-but-2-én-1,4-diil)dimetánszulfonát oxidációját ruténiumkatalizált reakciókban, és kettős kötésből egy *cis*-diol szerkezetet alakítottunk ki. Az így előállított vegyület gyűrűzárását három aromás aminnal is megvalósítottuk. Kidolgoztunk egy jóval gazdaságosabb és munkavédelmi szempontból is előnyösebb utat *N*-szubsztituált *mezo*-3,4-dihidroxipirrolidin vegyületek előállítására. Ilyen típusú vegyületek előállítását korábban leginkább az igen drága és toxikus ozmium-tetroxid felhasználásával valósították meg. [P VI]

6. Összefoglalás és alkalmazási lehetőségek

Doktori munkám során céлом volt kémiai és biokatalizátorok alkalmazása, illetve rögzítése és a rögzített katalizátorok előnyeinek bemutatása: könnyű szeparálhatóság a reakcióközegtől, egyszerű visszaforgatás vagy éppen folyamatos áramlásos rendszerben való alkalmazás.

Hisztidinjelölt enzimek rögzítését több különböző módon is megvalósítottuk, minden esetben kihasználva a rögzítettfézionaffinitás-kromatográfia (IMAC) szelektivitását. Így, a sok esetben költséges kromatográfias eljárásokat kihagyva, közvetlenül a fehérjekeverékből végeztük el a rögzítést. A gazdasági előnyök mellett a módszer alkalmas lehet olyan hisztidinjelölt enzimek rögzítésére is, melyek nem elég stabilak és a tisztítási eljárások során kicsapódnának, inaktiválódnának. Az IMAC-módszert reverzibilis rögzítések során és kovalens rögzítéssel kombinálva is alkalmaztuk. A fém-fehérje komplexben reverzibilisen rögzített célenzim eltávolítására kidolgoztunk egy módszert a hordozó regenerálására. Ez lehetőséget biztosít drágább vagy nehezebben előállítható hordozók (például bioszenzorok) egyszerű visszaforgatására az enzim inaktiválódása esetén. A szelektív komplekképzés és kovalens rögzítés kombinálására több lépéses és egyedényes módszert is kidolgoztunk. Mindegyik általunk fejlesztett módszer rendkívül nagy változatosságot enged meg az alkalmazott epoxidegyületek, komplekképzők és hordozók terén, mely nagy hatással van a végső aktivitásra, így a legtöbb enzim esetén megtalálhatjuk a legmegfelelőbb felületet.

Eddig ritkán alkalmazott természetes polimert, az agarózt, felhasználva állítottunk elő arany nanorészecskéket és vizsgáltuk a redukálószer szerepét is betöltő agaróz és az

arany(III)-vegyület koncentrációjának hatását a képződő részecske tulajdonságaira. A képződő agarózgélbe ágyazott nanorészecskét egy pórusos polimer hordozón rögzítve egy olyan stabilizációs módszert mutattunk meg mely várhatóan más gélbe ágyazott fém-nanokatalizátorokra is kiterjeszhető.

Ruténiumkatalizált reakciókban megvalósítottuk a ((Z)-but-2-én-1,4-diil)dimetánszulfonát oxidációját, és így egy gazdaságosabb és biztonságosabb utat dolgoztunk ki *N*-szubsztituált *mezo*-3,4-dihidroxipirrolidinek előállítására, melyek előállítását korábban leginkább a drága és toxikus ozmium-tetroxid katalízissel valósították meg.

7. Publikációs lista

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- P I **Evelin Sánta-Bell**, Norbert Krisztián Kovács, Bálint Alács, Zsófia Molnár, Gábor Hornyánszky: Immobilization of phenylalanine ammonia-lyase via EDTA based metal chelate complexes - optimization and prospects. *Periodica Polytechnica-Chemical Engineering*, **2021**, közlésre elfogadva. (SBE: 75%; IF-2018: 1,382)
- P II **Evelin Sánta-Bell**, Zsófia Molnár, Andrea Varga, Flóra Nagy, Gábor Hornyánszky, Csaba Paizs, Diána Balogh-Weiser, László Poppe: „Fishing and hunting”– Selective immobilization of a recombinant phenylalanine ammonia-lyase from fermentation media. *Molecules*, **2019**, 24(22), 4146. DOI: 10.3390/molecules24224146. (SBE: 90%; IF: 3,267; FI:1)
- P III Diána Weiser, Zoltán Boros, József Nagy, Gábor Hornyánszky, **Evelin Bell**, Péter Sátorhelyi, László Poppe: Chapter 15: SynBiocat: Protein purification, immobilization and continuous-flow processes. Biocatalysis: An Industrial Perspective, *Cambridge Royal Society of Chemistry Publishing*, **2018**, pp. 397-430. ISBN: 978-1-78262-619-0 (SBE: 90%; FI: 1)
- P IV Flóra Nagy, Gábor Tasnádi, Diána Weiser, **Evelin Bell**, Mélanie Hall, Klaus Ditrich, Kurt Faber, László Poppe: Smart nanoparticles for selective immobilization of acid phosphatases. *ChemCatChem*, **2018** 53 pp. 1-11. DOI: 10.1002/cctc.201800405. (SBE: 15%; IF: 4,495; FI:4)
- P V Rózsa Szűcs, Diána Balogh-Weiser, **Evelin Sánta-Bell**, Eszter Tóth-Szeles, Tamás Varga, Zoltán Kónya, László Poppe, István Lagzi: Green synthesis and in-situ immobilization of gold nanoparticles and their application for the reduction of *p*-nitrophenol in continuous-flow mode. *RSC Advances*, **2019**, 9, pp. 9193-9197. DOI: 10.1039/c8ra10373a. (SBE 100%, IF: 3,119; FI: 2)
- P VI **Evelin Bell**, Zoltán Boros, Gábor Hornyánszky: Novel Synthesis of 1-substituted meso-3,4-dihydroxypyrrrolidines with a RuCl₃-catalyzed Key Reaction. *Periodica Polytechnica-Chemical Engineering*, **2015** 59:(2) pp. 124-128. DOI: 10.3311/PPch.7495. (SBE: 95%; IF: 0,460)

További publikációk

Judith Hajnal Bartha-Vári, László Csaba Bencze, Evelin Bell, László Poppe, Gabriel Katona, Florin-Dan Irimie, Csaba Paizs, Monica Ioana Toşa: Aminated Single-walled Carbon Nanotubes as Carrier for Covalent Immobilization of Phenylalanine Ammonia-lyase, *Periodica Polytechnica-Chemical Engineering*, **2017** 61:(1) 59-66.

Andrea Varga, Alina Filip, László Csaba Bencze, Péter Sátorhelyi, Evelin Bell, Beáta G. Vértessy, László Poppe, Csaba Paizs: Expression and purification of recombinant phenylalanine 2,3-aminomutase from *Pantoea agglomerans*, *Studia Universitatis Babe-Bolyai Chemia*, **2016** 61:(2) 7-19.

Bata Zsófia, Bell Evelin: Biokatalizátorok a zöldebb jövőért - enzimek a vegyiparban. *Élet és Tudomány*, **2018**. március 23. LXXIII évfolyam, 12. szám.

Előadások:

Bell E., Hornyánszky G., Poppe L.: Polimer hordozó funkciós csoportjainak finomhangolása és felhasználása többféle biotechnológiai célra. *XX. Tavaszi Szél Konferencia, Biológiai Tudományi Szekció*, **2017**. március 31., Miskolc, Magyarország.

Bell E., Boros Z., Hornyánszky G., Poppe L.: Polimer alapú hordozók fejlesztése és felhasználása fehérjetisztításra affinkromatográfiával. *XX. Jubileumi Országos Magyar Élelmiszer-tudományi és Technológiai Egyesület, Tudományos Diákköri Konferencia, Élelmiszer-biotechnológia szekció*, **2014**. május 13., Budapest, Magyarország.

Bell E., Boros Z., Hornyánszky G., Poppe L.: Gyűrűs vicnális *cis*-diolok előállítása és vizsgálatuk enzimkatalizált acilezési reakciókban. *XXXVI. Kémiai Előadói Napok, Katalízis II. szekció*, **2013**. október 28-30., Szeged, Magyarország.

Poszterek:

Sánta-Bell E., Kovács N. K., Molnár Zs., Sátorhelyi P., Balogh-Weiser D., Hornyánszky G., Poppe L.: Szelektív enzimrögzítési módszerek fejlesztése mágneses nanorészecskéken, *Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája*, **2020**. november 26., Magyarország, poszter-díj nyertes.

E. Sánta-Bell, N. K. Kovács, Z. Molnár, P. Sátorhelyi, D. Balogh-Weiser, G. Hornyánszky, L. Poppe.: Selective enzyme immobilization techniques on magnetic nanoparticles, *14th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformation*, **2019**. július 7-11., Groningen, Hollandia.

E. Sánta-Bell, N. K. Kovács, Z. Molnár, P. Sátorhelyi, D. Balogh-Weiser, G. Hornyánszky, L. Poppe.: Selective enzyme immobilization techniques using magnetic nanostructures, *6th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials*, **2019**. március 11-15., Sitges, Spanyolország.

E. Bell, P. Sátorhelyi, G. Hornyánszky, L. Poppe.: Affinity chromatography and selective enzyme immobilization on polymer supports, *13th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformation*, **2017**. július 9-13., Budapest, Magyarország.

E. Bell, F. Ranga, D. Weiser, P. Sátorhelyi, G. Hornyánszky, L. Poppe: Development of metal chelate-epoxy supports for selective enzyme immobilization, *COST Training School – System Biocatalysis*, **2016**. április 27-30., Certosa di Pontignano, Siena, Olaszország.