

# A BME VBK ipari enzimfejlesztési kutatásai

MOLNÁR Zsófia,<sup>a,b,\*\*</sup> TELEK András,<sup>c,d</sup> INCZE Dániel,<sup>e</sup> EMŐDI Nikolett,<sup>e</sup> SZEMES József,<sup>a</sup>  
CSUKA Pál,<sup>a</sup> NYÍRI Kinga,<sup>b,c</sup> NAGY Gergely Nándor,<sup>b,c</sup> BATA Zsófia,<sup>e</sup> TASNÁDI Gábor,<sup>d</sup>  
VÉRTESSY G. Beáta<sup>b,c</sup> és POPPE László<sup>a</sup>

<sup>a</sup>BME VBK, Szerves Kémia és Technológia Tanszék, Műegyetem rkp. 3., 1111 Budapest, Magyarország

<sup>b</sup>HUN-REN TTK, Molekuláris Élettudományi Intézet, Magyar tudósok körútja 2., 1117 Budapest, Magyarország

<sup>c</sup>BME VBK, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék, Műegyetem rkp. 3., 1111 Budapest, Magyarország

<sup>d</sup>Servier Kutatóintézet Zrt., 1031 Budapest, Magyarország

<sup>e</sup>Dr. Bata Zrt., 2364 Ócsa, Magyarország

## 1. Bevezetés

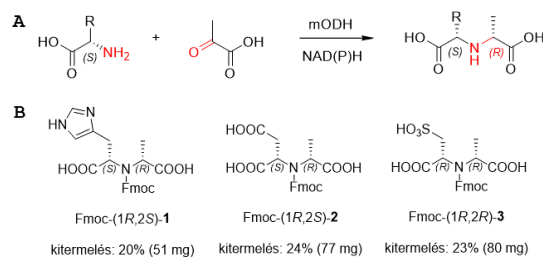
Napjainkban egyre nagyobb hangsúly kerül a környezetbarát megoldásokra mind a hétköznapi életben, mind az ipari folyamatokban. Ez többek között a gyógyszer- és az élelmiszeripart is érinti, ahol egyre nagyobb szerepet kapnak a zöld eljárások, mint például a biokatalízis.<sup>1</sup> Az enzimek (illetve az őket magukba foglaló sejtek) ipari szintű felhasználására bőven akad példa, elég csak a glükóz-izomeráz felhasználásával előállított magas fruktóztartalmú kukoricaszirupra,<sup>2</sup> vagy a szitagliptin antidiabetikum transzamináz enzim katalizálta előállítására gondolni.<sup>3</sup> A biokatalízisnek számos előnye van, mint például a kiváló szubsztrát-, sztereo- és régiószelektivitás, valamint a működéshez szükséges enyhe reakciókörülmények. Széleskörű felhasználásukat azonban nagyban hátráltatja, hogy az ipari folyamatokban már megszokott, hagyományos katalizátorokhoz képest más infrastruktúra és kompetenciák szükségesek az előállításukhoz, fejlesztésükhöz és alkalmazásukhoz. A közeli jövőben azonban várhatóan egyre nagyobb jelentősége lesz az enzimtechnológiáknak. Az utóbbi évtizedekben robbanásszerű fejlődésnek indult mind a molekuláris biológia területe, mind pedig a számítástechnikai szerkezetmodellezések megbízhatósága és gyorsasága (a mesterséges intelligencia kiaknázásában rejlő lehetőségekről nem is beszélve). Ezek új területeket nyitottak meg az enzimek célzott fejlesztésében, az úgynevezett enzimmérnökségben.<sup>4</sup> A tudományterület relevanciáját jól jelzi, hogy számos Nobel-díjat osztottak ki ilyen irányú kutatásokra az elmúlt években.<sup>5-7</sup>

A mérnöki irányú kutatásokban kiemelt fontosságú, hogy szoros együttműködésre törekedjünk az ipari partnerekkel, és hogy valós problémák megoldását tűzzük ki célul. A BME VBK-n több, jelenleg futó kutatás is ezt az elvet követi. Ezek az interdiszciplináris együttműködések olyan területeket ölelnek fel, mint például a metagenomikus enzimek bioinformatikai úton történő azonosítása és kísérletes vizsgálata, szerkezetmeghatározás és azon alapuló modellezés, az enzimek célzott pontmutációkkal történő fejlesztése és az iparilag releváns körülmények közötti tesztelés. Az alábbi összefoglaló cikkben ezen eredményeinket mutatjuk be.

## 2. Opin származékok enzimatiszintézise

A modern gyógyszerjelölt molekulák szerkezete egyre összetettebb, gyakran több kiralitáscentrumot is tartalmaz, melyek gazdaságos szintézise hatalmas kihívás a szintetikus vegyészek számára. Mivel a királis aminosavak építőelemek nagyon gyakran előfordulnak a kismolekulás hatóanyagokban,<sup>8</sup> a szén-nitrogén kötés sztereoselektív kialakítása kiemelt fontossággal bír. Felismerve a biokatalízis királis aminosavak előállítására kínált lehetőségeit, a Servier kutatóintézet és a BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszékén működő Biostruct Labor egy redukzív amináz enzim gyűjtemény létrehozását és funkcionális jellemzését tűzte ki célul. A célvegyületekként megjelölt ún. opin-származékok  $\alpha$ -ketosavak és  $\alpha$ -aminoészterek reakciójából nyerhetők, melyek értékes építőelemei számos bioaktív molekulának, mint például a peptidomimetikum típusú ACE2 gátlószereknek.

Munkánkat opin-dehidrogenázok (ODH) vizsgálatával kezdtük, mivel ezen enzimek a természetben  $\alpha$ -aminosavak és piruvát redukzív aminálásával opinokat szintetizálnak (1. Ábra A).<sup>9</sup> Az ELTE PIT bioinformatikai csoportja segítségével 10 új ODH szekvenciát azonosítottunk hőforrásból nyert metagenomikai adatbázisokból. Ezekből 6 enzim (mODH) karakterizálását valósítottuk meg, melyek az irodalomban leírtakhoz képest eltérő szubsztrátokon, jellemzően negatív töltésű poláros aminosavakon, mutatnak aktivitást. Egy kiválasztott metagenomikus enzimmel több preparatív méretű (~100 mg) transzformációt is elvégeztünk (1. Ábra B, 1-3). Az mODH-k eddig példátlan aminosav preferenciáját szerkezeti modellek segítségével értelmeztük, majd célzott pont mutációkkal bizonyítottuk.<sup>10</sup>

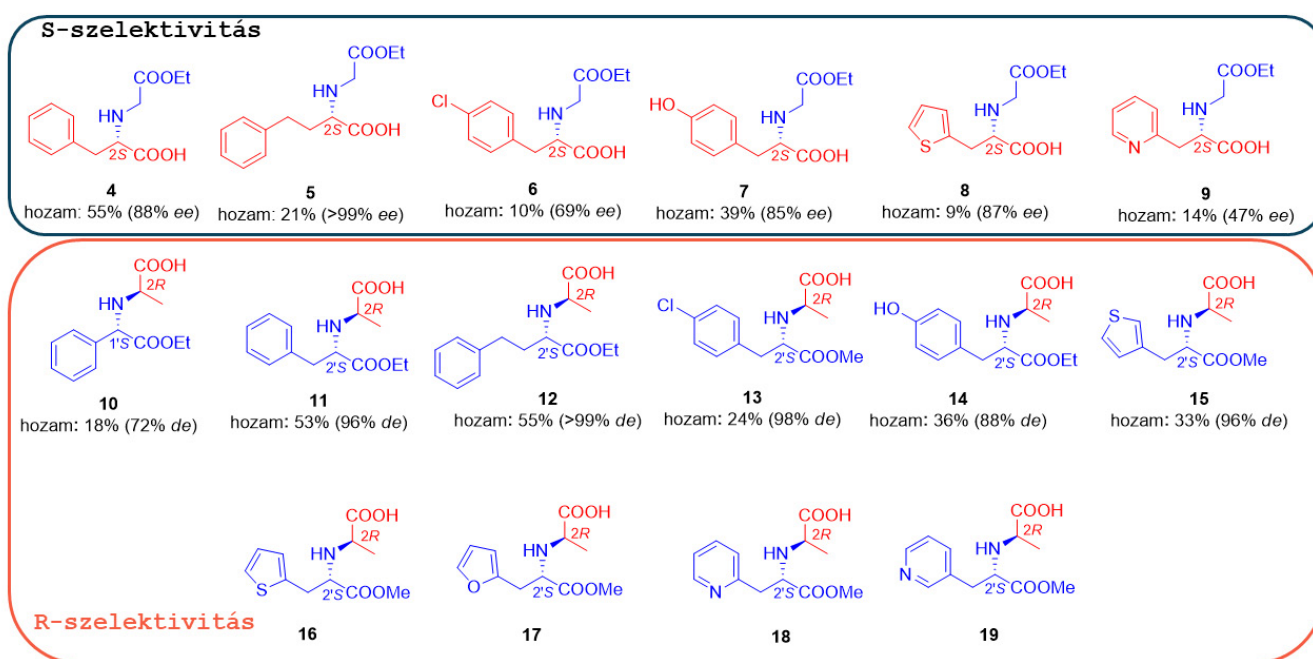


**1. Ábra.** A Az mODH-k által katalizált reakció általános egyenlete. B Az mODH-k felhasználásával szintetizált új molekulák.

\* Főszerező. E-mail: molnar.zsofia@vbk.bme.hu

Mivel az ODH-k nem mutattak aktivitást sem aminoésztereken, sem ketoésztereken, figyelmünket kereskedelmi forgalomban kapható imin-reduktázokra (IRED), valamint irodalomban leírt iminosav-reduktázokra (IARED) fordítottuk. A tesztelések eredményeként azonosítottuk a *Rattus norvegicus*-ból származó ketimin-reduktázt (*Rn*KIRED), amely kiemelkedő aktivitást mutatott a-ketosav/a-aminoészter szubsztrátkombinációval. A reakciókörülmények optimalizálását követően feltérképeztük ezen enzim szubsztrátkörét és elvégeztünk 16 preparatív méretű átalakítást, valamint a vegyületek kémiai karakterizálását (2. Ábra). A termékek abszolút konfigurációjának meghatározása során egy érdekes jelenséget tapasztaltunk. Egyedülálló módon, ezekben az enzimatis reakciókban a szubsztrátok mérete befolyásolja az újonnan létrejövő sztereocentrum

konfigurációját: aromás ketosavak és l-alanin etil észter reakciójában (*S*)-szelektivitást (**4-9**), míg piruvát és aromás aminoészterek esetében (*R*)-szelektivitást (**10-19**) mutat az *Rn*KIRED az újonnan kialakuló kiralitáscentrum esetében. Ezt a jelenséget szerkezeti modellek segítségével értelmeztük.<sup>11</sup> Azonban meg kell jegyezni, hogy csökkent aktivitást figyeltünk meg néhány szubsztrátkombináció esetében, mint például az (*S*)-alanin-*tert*-butil-észter és a benzilpiruvát közötti reakció esetén (<10%-os konverzió 3 nap alatt). Mivel utóbbi reakció terméke több ACE2 gátló közös intermediere, jelenleg laboratóriumi evolúciós módszerekkel növeljük az enzim szintetikus alkalmazhatóságát. Ennek a munkának szerves eleme egy új típusú, sejtmentes enzim-mérnöki fejlesztés fókuszált variánskönyvtárak gyors vizsgálata céljából.



2. Ábra. Az *Rn*KIRED által katalizált reakciókban előállított vegyületek az újonnan kialakított sztereocentrum konfigurációja szerint csoportosítva. (A kék szín az aminoészter reakciópartnerből, a piros a ketosavból származó molekularészt jelöli.)

### 3. Mikotoxinnal szennyezett élelmiszerek és takarmányok enzimes detoxikálása

A mikotoxinok olyan toxikus másodlagos anyagcseretermékek, amelyeket különböző penészgombák termelnek, és gyakran előfordulnak gabonafélékben, csonthéjasokban és fűszerekben.<sup>12</sup> Az ezen anyagokkal szennyezett élelmiszerek vagy takarmányok fogyasztása mikotoxikózishoz vezethet, amely emberben és haszonállatokban egyaránt súlyos egészségkárosodást okozhat.<sup>13</sup> A fumonizinek olyan mikotoxinok, amelyek jelentős élelmiszer- és takarmánybiztonsági kockázatot jelentenek, közülük a fumonizin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) a legtoxikusabb és leggyakrabban előforduló vegyület.<sup>14</sup> A fumonizin észterázokkal (FE-k) végzett enzimes detoxikálás ígéretes alternatívát kínál,<sup>15</sup> a hagyományos kémiai és fizikai kezelések korlátaival szemben.<sup>16</sup> Munkánk

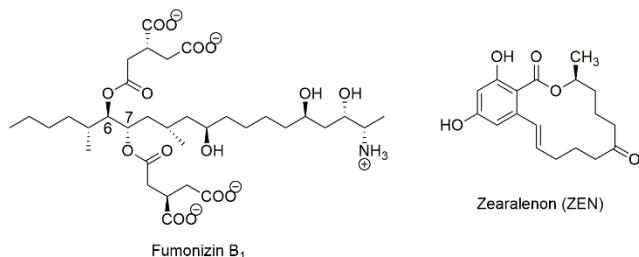
során két fumonizin-észteráz, az FE1 és FE2 kinetikai és szerkezeti jellemzését végeztük el, különös tekintettel azok regioszelektivitására és katalitikus hatékonyságára.<sup>15</sup>

Eredményeink alapján mindkét enzim kétlépéses mechanizmuson keresztül hidrolizálja az FB<sub>1</sub>-et: először a C6 pozícióban található trikarballilsav-észtert hasítják le, így jön létre a pHFB<sub>1\_7</sub> köztitermék, majd ezt követi a teljes hidrolízis, amely során a végső, teljesen hidrolizált forma (HFB<sub>1</sub>) keletkezik. Az acil-migráció, amely a két monoészter köztitermék (pHFB<sub>1\_6</sub> és pHFB<sub>1\_7</sub>) között zajlik, nem enzimatis folyamat és pH- és hőmérsékletfüggő – lúgos közegben gyorsabb átrendeződés figyelhető meg. Kinetikai elemzéseink azt mutatták, hogy az FE2 enzim alacsonyabb *K<sub>M</sub>* értékkel és magasabb katalitikus hatékonysággal rendelkezik, különösen a pHFB<sub>1\_7</sub> hidrolízisének során (1. táblázat).

Ez a gyakorlati alkalmazás szempontjából kritikus, mivel az FE2  $K_M$  értékei egybeesnek a nemzetközi fumonizin-határértékekkel, ami alátámasztja az enzim alkalmasságát az  $FB_1$  teljes hidrolízisére a környezeti koncentrációkban.

Az igen kedvező kinetikai paraméterek molekuláris hátterének feltárása érdekében meghatároztuk az FE2 kristályszerkezetét (2,24 Å felbontással), amelyben kirajzolódott a klasszikus  $\alpha/\beta$ -hidroláz felépítés, az enzim katalitikus triádja (S227, E343, H435) és az oxianion-lyuk. Felfedezhető egy, a rokon szerkezetekben nem fellelhető, pozitív töltésű szubsztrátkötő zseb is az aktív centrumban, amit arginin oldalláncok alakítanak ki. Molekuláris dokkolási vizsgálatok megerősítették az aktív centrum szerepét, és a fumonizin molekulacsalád további tagjainak ( $FB_2$ ,  $FB_3$ ,  $FA_1$ ) kötődését is valószínűsítették.

Végül, az FE2 gyakorlati alkalmazhatóságát a kukorica nedvesítési feldolgozási körülményei között is vizsgáltuk, ahol az áztatóléban és a szilárd frakcióban is több mint 95%-os  $FB_1$  hidrolízist értünk el, ami az enzim ipari alkalmazásának potenciálját is alátámasztotta. Eredményeink hozzájárulnak a fumonizin észterázok működésének jobb megértéséhez, és alapot adnak az enzimfejlesztési törekvésekhez, amelyek célja a hatékonyabb és szélesebb körben alkalmazható mikotoxin inaktíváló enzimek kifejlesztése.



3. Ábra. A fumonizin  $B_1$  és zearalenon mikotoxinok szerkezete

A fumonizinek mellett a zearalenon (ZEN) az egyik leggyakrabban előforduló mikotoxin a gabonafélékben.<sup>12</sup> A zearalenon egy ösztrogénhatással rendelkező molekula, amely felhalmozódva a szervezetben hiperösztrogenizmust idéz elő, ezáltal kedvezőtlenül befolyásolja a szaporodásbiológiai folyamatokat. Emellett gyulladást okoz a bél nyálkahártyájában, ami az immunrendszer működésének gyengüléséhez vezethet.<sup>18</sup> A haszonállatok zearalenonnal szennyezett takarmányozása különösen súlyos egészségügyi problémákat okozhat, elsősorban a sertések esetében, melyek a legérzékenyebbek a kitétségre.

A takarmányok zearalenon szennyezettségének csökkentésére a lakton-hidroláz enzimek egyre nagyobb kutatási érdeklődést váltanak ki, mivel képesek a ZEN lebontására a laktonkötés hidrolízisével, így nem toxikus vegyületekké alakítják azt.<sup>19</sup> Jelen kutatásunk célja olyan új zearalenon-laktonázok azonosítása, amelyek alacsony  $K_m$  és magas  $k_{cat}$  értékekkel rendelkeznek, ezáltal hatékonyan képesek semlegesíteni a ZEN-t már alacsony környezeti koncentrációkban is.

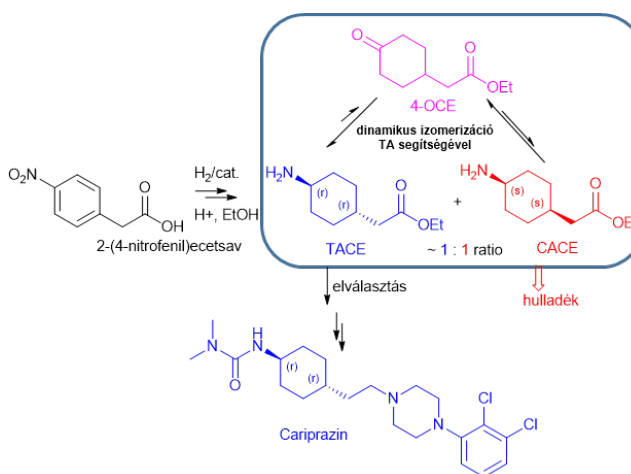
1. Táblázat. Az FE1 és FE2 enzimek kinetikai paraméterei (pH 6,0; 37 °C)

Enzim	Szubsztrát	$K_M$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $s^{-1} M^{-1}$ )
FE1	$FB_1$	$8.37 \pm 0.55$	$140 \pm 2$	$1.67 \times 10^7$
FE1	pHFB $_1$ _7	$44.3 \pm 2.23$	$121 \pm 2$	$2.73 \times 10^6$
FE2	$FB_1$	$6.03 \pm 0.41$	$115 \pm 2$	$1.91 \times 10^7$
FE2	pHFB $_1$ _7	$4.76 \pm 0.61$	$124 \pm 3$	$2.60 \times 10^7$

#### 4. Cariprazin gyártás közttermékének enzimés deracemizálása

A Richter Gedeon Nyrt. által kifejlesztett és gyártott Cariprazin hatóanyag jelenleg a cég zászlóshajója, melyet Európában Reagila<sup>®</sup>, Amerikában pedig Vraylar<sup>®</sup> néven hoznak forgalomba a skizofrénia és a bipoláris depresszió kezelésére.<sup>20</sup> A gyógyszer hatóanyagának része egy ciklohexán gyűrűegység, mely két pseudoaszimmetria centrumot tartalmaz, így a gyártás során *transz* és *cisz* közttermékek keletkeznek. Az aktív hatóanyag a *transz* közttermék, melyet hagyományos kristályosítási módszerrel választanak el a *cisz* köztterméktől. Kutatócsoportunkban a gyógyszer-gyártó céggel közösen egy biokatalízisen alapú gyártás-fejlesztési lehetőséget dolgoztunk ki, mellyel növelni lehetne a hatásos *transz* közttermék mennyiségét.

A gyártás során a 2-(4-nitrofenil)ecetsav katalitikus hidrogénezése során keletkezik az etil-2-(4-aminociklohexil)acetát, melyben a ciklohexán gyűrű 1- és 4-helyzetben két pseudoaszimmetria centrumot tartalmaz. Így a gyártás során a kívánt *transz* (TACE) közttermék mellett a hulladékként kezelt *cisz* (CACE) izomer is közel azonos mennyiségben keletkezik. A *cisz*-szelektív transzamináz enzim lehetőséget adnak, hogy dinamikus izomerizációval a CACE izomerből TACE izomert állítsunk elő a saját keton (4-OCE) köztterméken keresztül.<sup>21,22</sup>



4. ábra A Cariprazin hatóanyag TACE közttermékének előállítás transzamináz enzimmel az eddig hulladékként kezelt CACE-ből

A gyártás során melléktermékként keletkező CACE-t dinamikus izomerizációval alakítottuk át TACE terméké. A megfelelő transzamináz enzimek kiválasztásához számos enzimet teszteltünk, mint például a *Chromobacterium violaceum* illetve a *Vibrio fluvialis* baktériumtörzsekből származó transzaminázokat és ezek mutánsait (Codexis® ATA screening kit). A legnagyobb CACE-TACE átalakítást az ATA217 enzimmel sikerült elérni, így további fejlesztéseinket ezzel az enzimmel végeztük. A vizsgálatok során számos reakciót befolyásoló paramétert optimaltunk, többek között a hőmérséklet, piridoxál-5'-foszfát kofaktor koncentrációja, koszubsztrát arány, aminakceptor függés, szubsztrát koncentráció. A fejlesztés során olyan magas szubsztrát koncentrációval is sikerült dolgoznunk (50-100 g/L) és olyan mértékű diasztereomertisztaságot ( $de_{TACE}$ :70-80 %) értünk el az optimálási folyamatnak köszönhetően, ami a méretnövelési kísérleteknek és az iparosíthatósági feltételeknek jó alapja.

A kutatási projekt során az ATA217 transzamináz számos a kutatócsoportunk által fejlesztett kovalens alapú enzim hordozóhoz rögzítettük és vizsgáltuk a biotranszformáció során a CACE-TACE átalakítást és visszaforgathatóságot. Méretnövelési reakciókat (200 mL reakciótér fogat) végeztünk számos formájú ATA217 biokatalizátorral (natív enzim, hordozóhoz rögzített enzim, egészsejtes, feltárt sejtes forma) melyekkel 10 g-ot meghaladó TACE-t állítottunk elő.

### Köszönetnyilvánítás

A C1580174 számú projekt a Kulturális és Innovációs Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a NVKDP-2021 pályázati program finanszírozásában valósult meg. A C1341189 számú projekt a Kulturális és Innovációs Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a KDP-2021 pályázati program finanszírozásában valósult meg. A 2024-2.1.2-EKÖP-KDP-2024-00005 számú projekt a Kulturális és Innovációs Minisztérium Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a EKÖP\_KDP-24-1-BME-25 pályázati program finanszírozásában valósult meg. A publikáció a Richter Gedeon Nyrt. által létrehozott Richter Gedeon Talentum Alapítvány támogatásával, a Richter Gedeon Kiválósági PhD Ösztöndíj keretében készült.

### Hivatkozások

- Bornscheuer, U., Huisman, G., Kazlauskas, R., Lutz, S., Moore, J., Robins, K. *Nature* **2012**, *485*, 185–194. <https://doi.org/10.1038/nature11117>
- Marshall, R., Kooi, E. *Science* **1957**, *125* (3249), 648–649. <https://doi.org/10.1126/science.125.3249.648>
- Savile, C., Janey, J., Mundorff, E., Moore, J., Tam, S., Jarvis, W., Colbeck, J., Krebber, A., Fleitz, F., Brands, J., Devine, P., Huisman, G., Hughes, G. *Science* **2010**, *329* (5989), 305–309 <https://doi.org/10.1126/science.1188934>
- Buller, R., Damborsky, J., Hilvert, D., Bornscheuer, U. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2025**, *64*, e202421686 <https://doi.org/10.1002/anie.202421686>
- The Nobel Prize in Chemistry 2018. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach 2025. Mon. 28 Apr **2025**. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/summary/>
- The Nobel Prize in Chemistry 2020. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach 2025. Mon. 28 Apr **2025**. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/summary/>
- The Nobel Prize in Chemistry 2024. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach 2025. Mon. 28 Apr **2025**. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2024/summary/>
- Bhutani, P.; Joshi, G.; Raja, N.; Bachhav, N.; Rajanna, P. K.; Bhutani, H.; Paul, A. T.; Kumar, R. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 2339–2381. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01786>
- Telek, A.; Molnár, Zs.; Vértessy, G. B.; Tasnádi, G. *Biotechnol. Bioeng.* **2023**, *120*, 2793–2808. <https://doi.org/10.1002/bit.28469>
- Telek, A.; Molnár, Zs.; Takács, K.; Varga, B.; Grlomusz, V.; Tasnádi, G.; Vértessy, G. B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2024**, *108*, 101. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12871-z>
- Telek, A.; Dargó, G.; Kovács, R.; Molnár, Zs.; Vértessy, G. B.; Tasnádi, G. *ChemCatChem* **2025**, DOI: 10.1002/cctc.202402066. <https://doi.org/10.1002/cctc.202402066>
- WHO. Mycotoxins. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins> (Fact sheet, 2 October 2023).
- Eskola, M.; Kos, G.; Elliott, C. T.; Hajšlová, J.; Mayar, S.; Krska, R. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 2773–2789. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>
- Chen, J.; Wei, Z.; Wang, Y.; Long, M.; Wu, W.; Kuca, K. *Food Chem. Toxicol.* **2021**, *149*, 111977. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.111977>
- Incze, D. J.; Molnár, Zs.; Nagy, G. N.; Leveles, I.; Vértessy, B. G.; Poppe, L.; Bata, Zs. *Food Chem.* **2025**, *473*, 143110. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143110>
- Liu, M.; Zhao, L.; Gong, G.; Zhang, L.; Shi, L.; Dai, J.; Sun, L. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2022**, *13* (1), 19. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00661-4>
- Gruber-Dorninger, C.; Jenkins, T.; Schatzmayr, G. *Toxins* **2019**, *11* (7), 375. <https://doi.org/10.3390/toxins11070375>
- Zinedine, A.; Soriano, J. M.; Moltó, J. C.; Manes, J. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.030>
- Peng, W.; Ko, T. P.; Yang, Y.; Zheng, Y.; Chen, C. C.; Zhu, Z.; Guo, R. T. *RSC Adv.* **2014**, *4* (107), 62321–62325 <https://doi.org/10.1039/C4RA12111B>
- Ágainé Csongor, É., Galambos, J., Nógrádi, K., Vágó, I., Gyertyán, I., Kiss, B., Laszlovszky, I., Laszy, J., Sággy, K. WO2005/012266A1
- Farkas, E., Sátorhelyi, P., Szakács, Z., Dékány, M., Vaskó, D., Hornyánszky, G., Poppe, L., Éles J. *Commun Chem.* **2024**, *7*, 86. doi: 10.1038/s42004-024-01148-9. <https://doi.org/10.1038/s42004-024-01148-9>
- Farkas, E., Poppe, L., Hornyánszky, G., Incze, D., Éles, J., Sánta-Bell, E., Molnár, Zs., Szemes, J., Csuka, P. WO2023/042081A1.

## Industrial enzyme research at the Faculty of Chemical Technology and Biotechnology of BME

In recent years, there has been a growing emphasis on environmentally friendly solutions in both everyday life and industrial processes, including both the pharmaceutical and food industries. One such green approach is biocatalysis, which offers advantages such as excellent substrate, stereo-, and regioselectivity under mild conditions. However, the widespread industrial use of enzymes still faces challenges related to infrastructure and expertise. Thanks to advances in molecular biology, computational modeling, and artificial intelligence, enzyme engineering has become a rapidly growing field, highlighted by several recent Nobel Prizes. At BME VBK, interdisciplinary collaborations with industrial partners focus on solving real-world problems through projects like metagenomic enzyme screening, structural analysis and modelling, and targeted development of industrially relevant enzymatic technologies.

One major project involved the enzymatic synthesis of opine derivatives. Recognizing the importance of chiral amine building blocks in drug development, we aimed to establish and characterize a library of reductive aminase enzymes. Using bioinformatic metagenome mining, ten new opine dehydrogenases (ODHs) were identified from thermophilic metagenomic databases, with six novel enzymes (mODHs) showing unique substrate preferences. Additionally, a ketimine reductase (RnKIREd) from *Rattus*

*norvegicus* was found to catalyze key reactions with impressive stereoselectivity, depending on substrate size. Efforts are ongoing to improve enzymatic activity for less reactive substrates through cell-free enzyme engineering.

Another line of research focused on the enzymatic detoxification of mycotoxins. Mycotoxins such as fumonisins and zearalenone (ZEN) pose serious food and feed safety risks. Two fumonisin esterases (FE1 and FE2) were kinetically and structurally characterized, revealing a two-step hydrolysis mechanism and a novel positively charged binding pocket in FE2. FE2 showed excellent catalytic efficiency even at environmental concentrations, highlighting its industrial application potential. Similarly, research into lactonase enzymes aims to identify candidates capable of effectively detoxifying ZEN at low concentrations.

Finally, our project in collaboration with Richter Gedeon Plc. targeted process optimization for the production of Cariprazin, an antipsychotic drug. We developed a biocatalytic method to convert the by-product *cis*-intermediate (CACE) into the desired *trans*-form (TACE) using selective transaminase enzymes. After screening several enzymes, ATA217 was identified as the most effective enzyme, and optimization efforts are ongoing to enhance process efficiency.