

## 1. Bevezetés

A technológiák fejlesztésével foglalkozó vegyészek már régóta felismerték és elfogadták annak a ténynek a jelentőségét, hogy a végső gyártásban alkalmazandó kémiai folyamatok kidolgozásakor a környezeti és gazdasági mutatókat is mérlegelni kell. A klasszikus katalitikus folyamatok előnyei már ismertek, azonban manapság egyre nagyobb hangsúlyt kapnak a biológiailag katalizált kémiai reakciók is, azaz a biokatalízis. A biokatalízis széles körben alkalmazható és környezetbarát módszer<sup>1</sup>. Az üzemanyagok, vegyi anyagok és egyéb vegyipari alapanyagok fenntartható, bioalapú folyamatainak fejlesztése egyre vonzóbbá válik a felfokozott környezetvédelmi aggodalmak miatt. A kémiai szintézis folyamatai általában nem környezetkímélők, és gyakran vezetnek nemkívánatos melléktermékek megjelenéséhez, ezáltal csökkentve ezek hatékonyságot és növelve végső feldolgozási költségeket. A kémiai katalízissel összehasonlítva a biokatalízis számos egyedi előnyt kínál, valamint hatékony és környezetbarát alternatívát jelent a klasszikus kémiai szintézisekhez<sup>2</sup>. Az elmúlt évtizedekben számos biokatalitikus eljárást mutattak be és hajtottak végre különféle ipari termékek előállításában<sup>3</sup>. Az optikailag aktív vegyületek - amely számos gyógyszermolekulának rendkívül értékes építőeleme lehet - egyik korszerű, és zöld előállítási technikája, a folyamatos üzemű áramlásos biotranszformáció. A biotranszformációk fontosságát és térhódítását az enzimek ipari felhasználása is bizonyítja, a BASF évente több mint, 3000 tonna királis amint termel a lipáz katalizált folyamatos áramlású biotranszformációban<sup>4</sup>.

A PhD munkám alapvető célja volt olyan biokatalitikus rendszerek kidolgozása, amik alkalmasak optikailag aktív vegyületek előállítására. Célul tűztük ki olyan eddig kevésbé kutatott élesztő törzsek keresését és vizsgálatát amelyek sokoldalú biokatalitikus aktivitással rendelkeznek és alkalmasak lehetnek különböző alkohol enantiomereinek előállítására. Továbbá célunk volt olyan „igény szerint kapcsolható” rögzített egész-sejtes biokatalizátor fejlesztése, amivel különböző típusú biotranszformációk (bioredukció vagy acilon kondenzáció) hatjhatók végre úgy, hogy működésüket a hozzáadott szubsztrát és a megfelelő reakciókörülmények határozzák meg/aktiválják, akár egymást követő reakciókban is, ahol az aktuális reakció független az előző ciklusban végrehajtott reakciótól, és a termékeik külön-külön kinyerhetők. Ezenkívül olyan biokatalitikus kaszkád rendszer fejlesztését tűztük ki célul, amely különböző biokatalitikus aktivitású mikrobiális sejtek együttes rögzítésével érhető el. Az együtt rögzített sejtek előállításához egyszerűen, közvetlenül a fermentáció után kivitelezhető módszer fejlesztése volt a célunk, ami által hosszú távon tárolható és jó mechanikai stabilitású biokatalizátor kapható.

## 2. Irodalmi háttér

Az enzimek sokoldalú biokatalizátorok, amelyek általában egy adott típusú biotranszformációt képesek szelektív és környezetbarát módon katalizálni. A mikrobiális sejtek, amelyek számos enzim természetes forrása, robosztus biokatalizátorként működnek, ezáltal lehetővé téve a természetes, de a szintetikus anyagok sokféle biotranszformációját is. Az egész-sejtes biokatalizátorok használata az izolált enzimekkel, összehasonlítva számos előnyt kínálnak, például könnyű kezelhetőséget, sejtlízis és enzimsztítási folyamatok elkerülését, valamint fokozott a stabilitásuk és a természetes kofaktorok megtalálhatók bennük<sup>5</sup>.

---

1 J.M. Woodley, M. Breuer, D. Mink, *Chem Eng Res Des*, **2013**, *91*, 2029–2036.

2 J. Wachtmeister, D. Rother, *Curr Opin Biotechnol*. **2016**, *42*, 169–77.

3 K.A. Curran, H.S. Alper, *Metab Eng*. **2012**, *14*, 289–97.

4 T.C. Nugent, „*Chiral Amine Synthesis: Methods, Developments and Applications*”, Wiley-VCH, Weinheim, **2010**.

5 B. Pscheidt, A. Glieder, *Microbiol. Cell Fact*. **2008**, *7*, 1–36.

Az élesztők, azon belül is a sütőélesztő (BY, *Saccharomyces cerevisiae*) az egyik leggyakrabban használt biokatalizátorként van számontartva, a kedvező tulajdonságai miatt. A sütőélesztő olcsó, nem patogén, valamint egyszerűen alkalmazható egész-sejtes rendszerként kemo-, regio-, és sztereoszelektív biotranszformációkban<sup>6</sup>. A sütőélesztő, mint sokoldalú biokatalizátor különféle reakciók kivitelezésére használható, többek között C=O és C=C redukciók, oxidációs és racemizációs reakciók, C-C kötés létrehozása és hidrolitikus reakciók. A szárított vagy liofilizált élesztő sejtek előnyeit (könnyű használat, jó tárolhatóság) már korábban felismerték. Azonban hátrányuk, hogy a rehidratált sejtek nem nyerhetők vissza a vizes reakcióelegyből eredeti formájukban, ezáltal működésük és felhasználásuk csak egy használatra, illetve egy biokatalitikus átalakításra (egy típusú reakció) korlátozódik.

Az utóbbi években az  $\omega$ -transzaminázok ( $\omega$ -TA) egyre jobban a biotechnológia kutatások előterébe kerültek<sup>7</sup>. Prokirális ketonok aszimmetrikus redukív aminálását és/vagy racém aminok kinetikus rezolválását, aminok deracemizálását képesek katalizálni. Az  $\omega$ -transzaminázok piridoxál-5'-foszfát (PLP) kofaktor függő enzimek, ami molekuláris transzferként szolgál az ammónia és elektronok, valamint a szubsztrát és termék között. Az  $\omega$ -transzaminázok rögzített formában töltött oszlopos folyamatos üzemű biotranszformációk megvalósítására alkalmasak. Más enzim osztályokkal (ketoreduktázokkal, alkohol-dehidrogenázokkal, transzketolázokkal, imin-reduktázokkal és monoamin-oxidázokkal) való jó kompatibilitásuknak köszönhetően, alkalmazhatóságuk folyamatosan növekvő kutatási terület.

Számos tanulmány kimutatta, hogy az izolált enzimeket alkalmazó kaszkád reakciók alacsony működési stabilitással bírnak és az alkalmazott biokatalizátorok újrahasznosítása nem lehetséges<sup>8</sup>. A liofilizált vagy polimer mátrixba zárt egész-sejtes rendszerek alkalmazása képes javítani a multienzimes biotranszformációk alkalmazhatóságát, a sejtek stabilitását és eltarthatóságát. Korábban már sikerrel valósították meg az élesztők és a baktériumok együttes immobilizációját és egyidejű működését almabor fermentációban és a bioszenzorok felépítésében.

Az élesztősejtek immobilizálása révén egy olyan előnyös tulajdonságuk válik elérhetővé, amely által a rögzített egész-sejtek újrahasznosítható biokatalizátorokká válnak. Az egész-sejtek csapdázása polimer mátrixba egy jól ismert módszer az immobilizált biokatalizátorok előállítására. A korábban bemutatott módszerek eredményeképpen kapható folyamatos üzemű áramlásos biotranszformációkhoz alkalmazható biokatalizátorok, azonban sokszor negatív tulajdonságokkal is rendelkeznek. Ilyen például a szárított alginát gyöngyökbe zárt egész-sejtes biokatalizátor, amelyek duzzadnak és gyorsan szétesnek alacsony sótartalmú oldatok jelenlétében<sup>9</sup>. Különféle immobilizációs módszereket dolgoztak már ki újr felhasználható biokatalizátorok létrehozására (célzottan egy bizonyos biotranszformációhoz), azonban az immobilizált mikrobiális egész-sejtes biokatalizátorokban a sokrétű bioaktivitások megőrzése és egymást követő reakciókban az ismételt felhasználása ezidáig még mindig megoldott, felfedezetlen terület.

A lipázok az egyik legszélesebb körben alkalmazott biokatalizátorok a szerves szintézisekben, amelyek regio- és enantioszelektivitást biztosítanak az általuk katalizált reakciókban. A lipázok (EC 3.1.1.3) nélkülözhetetlenek a lipidek (például trigliceridek, zsírok, olajok) emésztésében, szállításában és feldolgozásában, ha nem is az összes, de a legtöbb élő szervezetben megtalálhatók. A lipázok immobilizálása javíthatja az aktivitásukat, a hő- és működési stabilitásukat, valamint az újra felhasználhatóságukat, amelyek az ipari alkalmazásuk

---

6 B. Erdélyi, Á. Szabó, G. Seres, L. Birincsik, J. Ivanics, G. Sztatzker, L. Poppe, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 268–274.

7 M. L. Contente, F. Paradisi, *Nature Catal.* **2018**, *1*, 452–459.

8 L. Pääviö, T. Kanerva, *Process Biochem.* **2013**, *48*, 1488–1494.

9 V. De Vitis, F. Dall'Oglio, A. Pinto, C. De Micheli, F. Molinari, P. Conti, D. Romano, L. Tamborini, *Chem. Open* **2017**, *6*, 668–673.

alapvető előnyei<sup>10</sup>. A rendelkezésre álló különböző rögzítési eljárások közül a megfelelően felületmódosított hordozókra történő hidrofób adszorpció az egyik leghatékonyabb módszernek bizonyult már korábban is, ami nem csak az immobilizáláshoz használható, hanem a lipázok elválasztásához is. Különböző eljárásokkal előállított rögzített lipáz katalizátorokat sikeresen alkalmaztak már mind szakaszos, mind folyamatos üzemű áramlásos biotranszformációkban.

### 3. Kísérleti módszerek

#### 3.1. Egész-sejtek immobilizálása/koimmobilizálása szol-gél mátrixba

Első lépésként a szilika szolt következőképpen állítottuk elő: 0,72 ml TEOS-t hozzáadtunk 65 µl 0,1 M HNO<sub>3</sub>-at és 0,25 ml desztillált vizet tartalmazó oldathoz, és az elegyet 5 percig ultrahangos fürdővel (Emag Emmi 20HC Ultrasonic Bath, 45 kHz) szonikáltattuk, majd 4 °C-on állni hagytuk 24 óráig. Ezt követően 150 mg MAT540-et adtunk 3 ml sejtmassza oldatkeverékhez [0,5 g centrifugált élesztő sejtmassza vagy 0,33 g centrifugált *Lodderomyces elongisporus* sejtmassza és *Escherichia coli* (*Chromobacterium violaceum* ω-transzaminázt expresszáló) sejtmassza (2:1 m/m) szuszpendálva 3 ml 0,1 M foszfát pufferben], majd intenzíven rázattuk (Emag Emmi 20HC Ultrasonic Bath, 45 kHz), míg homogén nem lett. Végül az előkészített szilika szolt hozzáadtuk a hordozóval kevert sejtsuszpenzióhoz és 5 percen át szobahőmérsékleten rázattuk (Technokartell TT Shake Model T3SK, 40 Hz). A gélképződés szobahőmérsékleten 30 percen belül lejátszódott, ezt követően a gél 48 órán keresztül 4 °C-on öregítettük. A nyers biokatalizátort foszfát pufferrel mostuk (2 × 15 ml, 0,1 M, pH 7,5), centrifugáltuk majd szobahőmérsékleten szárítottuk (24 óra). Az így kapott immobilizált készítményt felhasználásig 4 °C-on tároltuk.

#### 3.2. Igény szerint kapcsolható folyamatos üzemű áramlásos biotranszformációk

A folyamatos üzemű reakciók megvalósításához laboratóriumi léptékű reaktor rendszert építettünk, ami a következő egységeket tartalmazta: Knauer Azura P4.1S izokratikus HPLC pumpa, SynbioCart oszlop reaktor [rozsdamentes acél, belső átmérő: 4 mm, hossza: 70 mm, belső térfogat: 0,87 ml

A multifunkcionális biokatalizátorokat egymást követően alkalmaztuk folyamatos üzemű aciloin kondenzációban majd ketonok bioredukciójában, rögzített *LeKRED* vagy *PcKRED* egész-sejtekkel töltött SynbioCart oszlopot tartalmazó reaktor rendszeren hajtottuk végre. Első lépésként a töltött oszlopot foszfát pufferrel (100 mM, pH 7,5) előmostuk (100 µl perc<sup>-1</sup>, 60 perc), majd ezt követően a reakcióelegyet [keton **1a** (17 mM), foszfát puffer (100 ml, 100 mM, pH 7,5), NADH (0,1 mM), 2-propanol (2 v/v%)] 50 µl perc<sup>-1</sup> áramlási sebességgel 24 órán keresztül tápláltuk a 30 °C-ra termosztált reaktor rendszerbe. A kifolyó elegyből meghatározott időnként 200 µl mintát vettünk, etil-acetáttal (700 µl) extraháltuk, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fölött szárítottuk, és királis állófázist tartalmazó kolonnán, gázkromatográfiás módszerrel elemeztük. A 24 óra folyamán, a stacioner állapot beállta után gyűjtött elegyből a termékként kapott (*S*)-**2a** alkoholt izoláltuk, valamint a NADH kofaktort visszanyertük.

Ezután a rendszert citrát pufferrel mostuk (100 µl perc<sup>-1</sup>, 60 perc), majd második lépésként a reakcióelegyet [benzaldehyd **3** (20 mM), citrát puffer (100 ml, 100 mM, pH 5,0), nátrium-piruvát (3 ekv), TPP (0,2 mM) és MgCl<sub>2</sub> (1,0 mM)] 50 µl perc<sup>-1</sup> áramlási sebességgel tápláltuk a 25 °C-ra termosztált reaktor rendszerbe 24 órán keresztül. A kifolyó elegyből meghatározott időnként 200 µl mintát vettünk, etil-acetáttal (700 µl) extraháltuk, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fölött szárítottuk, és királis állófázist tartalmazó kolonnán gázkromatográfiás módszerrel elemeztük. A 24 óra folyamán a stacioner állapot beállta után gyűjtött elegyből a termékként kapott (*R*)-**4** alkoholt izoláltuk a korábban leírt eljárás szerint.

---

10 C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.*, **2007**, *40*, 1451–1463.

Harmadik lépésként az egész-sejtekkel töltött oszlopot először foszfát pufferrel (100 mM, pH 7,5) előmostuk (100 µl perc<sup>-1</sup>, 60 perc), majd ezt követően a reakcióelegyet [keton **1a** (17 mM), visszanyert, kofaktort tartalmazó foszfát puffer (100 ml, ~100 mM, pH 7,5), 2-propanol (2 v/v%)] 50 µl perc<sup>-1</sup> áramlási sebességgel 24 órán keresztül tápláltuk a 30 °C-ra termosztált reaktor rendszerbe. A kifolyó elegyből meghatározott időnként 200 µl mintát vettünk, etil-acetáttal (700 µl) extraháltuk, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fölött szárítottuk, és királis állófázist tartalmazó kolonnán gázkromatográfiás módszerrel elemeztük. A 24 óra folyamán után a stacioner állapot beállta után gyűjtött elegyből a termékként kapott (*S*)-**2a** alkoholt izoláltuk a korábban leírt eljárás szerint.

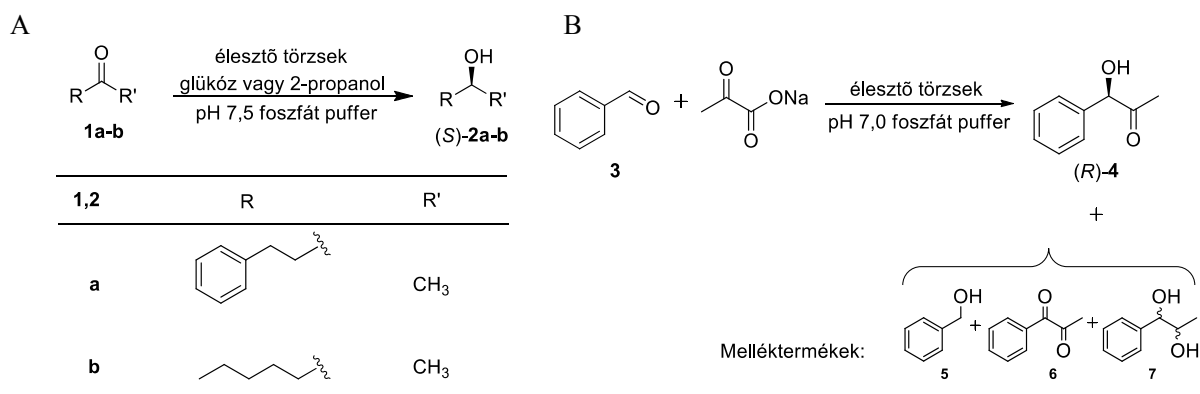
### 3.3. Folyamatos üzemű áramlásos kaszkádreakciók együtt rögzített egész sejtekkel

A preparatív léptékű folyamatos üzemű kinetikus rezolválás/enantiotóp szelektív redukció kaszkád reakciót két sorba kötött, rögzített *CvTA* - *LeKRED* egész-sejtekkel töltött SynbioCart oszlopot tartalmazó reaktor rendszeren hajtottuk végre. A töltött oszlopot először foszfát pufferrel (100 mM, pH 7,5) előmostuk (100 µl perc<sup>-1</sup>, 60 perc), majd ezt követően a reakcióelegyet [ amin (±)-**8b** vagy (±)-**8f** (7,5 mM), foszfát puffer (100 ml, 100 mM, pH 7,5), nátrium-piruvát (30 mM) és PLP (0,2 mM), NADH (0,1 mM) és 2-propanol (2 v/v%)] 50 µl perc<sup>-1</sup> áramlási sebességgel 24 órán keresztül tápláltuk a 30 °C-ra termosztált reaktor rendszerbe. A kifolyó elegyből meghatározott időnként 200 µl mintát vettünk, etil-acetáttal (700 µl) extraháltuk. A szerves fázist Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fölött szárítottuk, majd ecetsav anhidrid (1 µl) hozzáadásával derivatizáltuk (60 °C, 3 óra), végül királis állófázist tartalmazó kolonnán gázkromatográfiás módszerrel elemeztük. A 24 óra folyamán, a stacioner állapot beállta után, az átfolyó reakcióelegyet gyűjtöttük. A termékeket a fentebb leírt módszerekkel izoláltuk a reakció elegyből.

## 4. Eredmények

### 4.1. Élesztő törzsekkel megvalósított egész-sejtes biotranszformációk

Az előkísérletek során a Fermentia Kft. munkatársai segítségével a *Witaria* törzsgyűjtemény több, mint 300 különböző baktérium- és élesztőtörzsét vizsgáltuk ketoreduktáz aktivitásra. Az előzetes tesztek után a 9 törzset választottuk ki részletesebb vizsgálatokhoz. A törzsek aktivitását és szelektivitását glükóz és 2-propanol koszubsztrát jelenlétében az 1-fenilpropán-2-on **1a** (aromás keton) és 2-heptanon **1b** (alifás keton) bioredukciójában, valamint a benzaldehid **3** aciloin kondenzációjában vizsgáltuk (1. ábra).



**1. ábra** Élesztő törzsek katalizálta prokirális ketonok bioredukciója **1a-b** (A panel) és a benzaldehid **3** aciloin kondenzációja (B panel).

Első körben az **1a-b** ketonok bioredukciójában vizsgáltuk a liofilizált élesztő törzseket 2-propanol vagy glükóz koszubsztrát jelenlétében. Az előzetes kísérletek [keton (30 mM) liofilizált sejtek, foszfát pufferben (100 mM, pH 7,5) 2-propanol (4 v/v%) vagy glükóz jelenlétében (6 w/v%) 30 °C-on 24 óra után] rámutattak a *L. elongisporus*, *P. carsonii*, *C. norvegica*, *D. fabryi*, *W. subpelliculosus* WY3 és *W. subpelliculosus* WY13 törzsek megfelelő aktivitására és enantiotóp szelektivitására az **1a-b** ketonok bioredukciójában (1. táblázat).

**1. táblázat** Ketoreduktáz aktivitás vizsgálata 2-propanol (4v/v%) és glükóz (6w/v%) koszubsztrát jelenlétében az **1a** és **1b** keton bioredukciójában

Törzs név	2-propanol koszubsztráttal				glükóz koszubsztráttal			
	$c_{1a}(\%)$	$ee_{(S)-2a}(\%)$	$c_{1b}(\%)$	$ee_{(S)-2b}(\%)$	$c_{1a}(\%)$	$ee_{(S)-2a}(\%)$	$c_{1b}(\%)$	$ee_{(S)-2b}(\%)$
<i>Candida norvegica</i>	97	97	91	>99	6	63	15	50
<i>Pichia carsonii</i>	97	>99	89	>99	37	81	17	0
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	96	>99	90	>99	<1	-	<1	-
<i>Debaryomyces fabryi</i>	92	>99	78	>99	2	89	5	71
<i>W. subpelliculosus</i> WY3	56	>99	19	>99	96	>99	63	>99
<i>W. subpelliculosus</i> WY13	40	70	13	>99	99	>99	50	>99

Legjobb tudomásunk szerint a *Wickerhamomyces subpelliculosus*-t soha nem említették még előttünk biokatalizátorként sztereoszelektív bioredukciókban, ezért működését szélesebb körben is vizsgáltuk, többek között: a glükóz és 2-propanol koncentrációjának, reakció hőmérsékletnek, reakcióközeg pH-nak és a hozzáadott szerves oldószereknek biotranszformációs képességére gyakorolt hatását. A glükóz mennyiségét magasabb koncentrációban tolerálta (16 w/v%-ig), mint a 2-propanolt (4 v/v%-ig). A 8 w/v%-os glükóz koncentrációt találtuk az optimális koszubsztrát mennyiségének az **1a** redukcióban, ami kiváló konverzióval és enantiomer tisztasággal produkálta az (S)-**2a** alkoholt ( $c_{(S)-2a} = 99,8\%$  és  $ee_{(S)-2a} = 99,6\%$  WY3 törzssel, és  $c_{(S)-2a} = 99,9\%$ ,  $ee_{(S)-2a} = 99,8\%$  törzssel WY13). Mindkét törzs mérsékelt hőmérséklet stabilitást mutatott (40 °C-ig), azonban széles pH tartományban (3-10) használhatók, és a számos szerves oldószer jelenlétét tolerálta 5 w/v% koncentrációig. Kísérleteink folyamán sikeresen alkalmaztuk a *W. subpelliculosus* törzseket preparatív méretű bioredukciókban is.

A munkánk során tanulmányoztuk az újonnan izolált vad-típusú élesztő törzsek (2. táblázat) aktivitását és szelektivitását a benzaldehid **3** aciloin kondenzációjában (1. ábra B panel). A reakciókat, az előzőleg bemutatott bioredukciókhoz hasonlóan, vizes pufferben szuszpendált liofilizált élesztősejtekkel hajtottuk végre. Az aciloin kondenzációra jó affinitást mutató törzsek közül kettőnél magas ketoreduktáz aktivitást is megállapítottunk, ezek a *L. elongisporus* ( $x_{(R)-4} = 59\%$ ,  $ee_{(R)-4} = 96\%$ ) és *P. carsonii* ( $x_{(R)-4} = 53\%$  aciloin,  $ee_{(R)-4} = 96\%$ ) törzsek, amik jó termeléssel és szelektivitással produkálták az (R)-**4** aciloin terméket is.

**2. táblázat** Liofilizált élesztő törzsek vizsgálata potenciális biokatalizátorként a benzaldehid **3** aciloin kondenzációjában

Törzs név	$c_3$ (%) <sup>a)</sup>	$ee_{(R)-4}$ (%)	$x_4$ (%) <sup>b)</sup>
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	100	96	59
<i>Pichia carsonii</i>	98	96	53
<i>Candida norvegica</i>	17	89	17
<i>Debaryomyces fabryi</i>	100	95	31
<i>W. subpelliculosus</i> WY3	29	93	24
<i>W. subpelliculosus</i> WY13	11	59	5

Az általunk vizsgált élesztő törzsek biotranszformációkban való alkalmazása ezidáig egy kevésbé tanulmányozott terület volt. A *L. elongisporus*-t már azonosították, mint az 1,3-butándiol enantiomer szelektív oxidációjára képes törzset, valamint egy másik kutatás során az általa termelt aldo-ketoreduktázokat is tanulmányozták<sup>11</sup>. A *P. carsonii* red-ox reakcióit csak érintőlegesen említették ezidáig<sup>12</sup>, ezen kívül nem találtunk adatokat a *C. norvegica* vagy *D. fabryi* alkalmazására enantiomertiszta alkoholok előállításában.

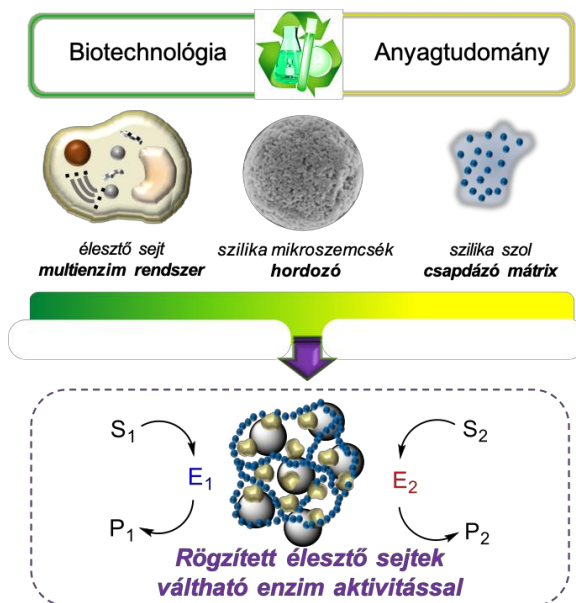
#### 4.2. Keton bioredukciója vagy aciloin kondenzáció, mint igény szerint kapcsolható katalízis

Az eddig használt sejtek liofilizált formában könnyen kezelhetők, tárolhatók és szállíthatók és számos egyéb pozitív tulajdonsággal rendelkeznek, azonban az eredeti formájukban és aktivitásukban mégsem nyerhetők vissza a vizes közegű reakciókból. Így a liofilizált élesztősejtes biokatalizátorokkal csak egy reakció (és egy típusú transzformáció) valósítható meg. Célul tűztük ki egy olyan immobilizálási forma kidolgozását, ami lehetővé teszi az egészsejtes biokatalizátorok többszöri felhasználását mind szakaszos, mind folyamatos üzemben (2. ábra). Az előzetes tesztek alapján jó biokatalitikus aktivitást mutató négy törzs (*L. elongisporus*, *P. carsonii*, *C. norvegica* and *D. fabryi*) szol-gél mátrixba való rögzítését valósítottuk meg. A szol-gél képzési folyamat első lépése a szilika szol előállítása, a tetraetil-ortoszilikát szilán prekursor savkatalizált hidrolízisével<sup>13</sup>. A következő lépésben a fermentáció után lecentrifugált sejtmasszát foszfát pufferben szuszpendáltuk és ezt adtuk a MAT540 (üreges szilika mikrogömbök, aktivált aminoalkil és vinil funkciókkal) hordozóval az előzőleg előállított szilika szolhoz. Az **1a** keton bioredukciójában vizsgáltuk a hordozó mennyiségének hatását az aktivitásra és a készítmény állagára. A sejtmassza mennyiségére számított 30 m/m% MAT540 hordozót tartalmazó készítmény magas aktivitást és szelektivitást mutatott megfelelő mechanikai tulajdonságokkal.

11 C. Ning, E. Su, D. Wei, *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *564*, 219–228.

12 M. Chartrain, R. Greasham, J. Moore, P. Reider, D. Robinson, B. Buckland, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 503–512.

13 K. Kato, H. Nakamura, K. Nakanishi, *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *293*, 312–317.

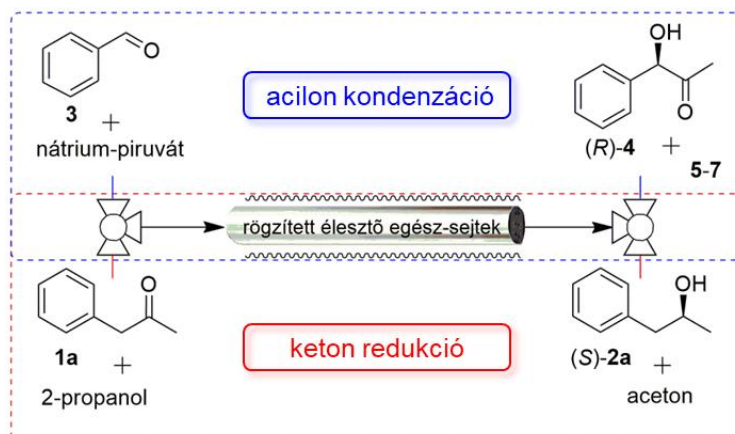


2. ábra Élesztő egész-sejtek rögzítése, változtatható enzim aktivitással

Vizsgáltuk a négy immobilizált egész-sejtes biokatalizátor folytonos átfolyású reaktorokban való alkalmazhatóságát az **1a** és **1b** ketonok redukciójában és a benzaldehid **3** aciloin kondenzációjában. A folyamatos üzemű reakció körülményei között, a rögzített *L. elongisporus* és a *P. carsonii* törzsek magas konverzióval és kiváló szelektivitással katalizálták az **1a** enantiotóp szelektív bioredukcióját ( $c_{1a} = 95\%$  *L. elongisporus* törzs használatakor és  $c_{1a} = 92\%$  *P. carsonii* törzssel, mindkét esetben az  $ee_{(S)-2a} > 99\%$ ). A *C. norvegica* és *D. fabryi* tartalmú biokatalizátorokkal, megegyező körülmények között végzett bioredukcióiban, nagy szelektivitással, de kisebb konverziókat, detektálhattunk ( $c_{1a} = 41\%$ ;  $ee_{(S)-2a} > 99\%$  és  $c_{1b} = 49\%$ ,  $ee_{(S)-2b} > 99\%$  *C. norvegica*-val; valamint  $c_{1a} = 25\%$ ;  $ee_{(S)-2a} > 99\%$  és  $c_{1b} = 22\%$ ,  $ee_{(S)-2b} > 99\%$  *D. fabryi*-val).

A biokatalitikus rendszerünket fenntarthatóbbá téve, a teljes átfolyó reakcióelegyből visszanyertük a NADH kofaktort, egy korábbi tanulmány során kidolgozott módszer módosításával<sup>9</sup>. Az így visszanyert NADH tartalmú kofaktor oldattal megismételtük az **1a** és **1b** ketonok folyamatos üzemű átfolyásos reaktorban végzett bioredukcióit immobilizált élesztősejtekkel. A visszanyert NADH oldatban végzett bioredukciók eredményei a *L. elongisporus* és *P. carsonii* törzsek esetében minimális aktivitás csökkenéssel összehasonlíthatók a friss NADH oldat jelenlétében végzett folyamatos üzemű reakciókkal ( $c_{1a} = 92\%$  *L. elongisporus* és  $c_{1a} = 90\%$  a *P. carsonii*, valamint  $ee_{(S)-2a} > 99\%$  24 óra működés után).

A folyamatos üzemű körülmények között végzett, aciloin kondenzációkban felhasznált immobilizált élesztősejtes biokatalitikus teljesítményében javulást értünk el a szakaszos üzemű reakciók eredményéhez képest. A képződött (*R*)-**4** mennyisége a kifolyó reakcióelegyben a stacioner állapot elérése után 44%-ról 51%-ra nőtt az *L. elongisporus* tartalmú és 5%-ról 19%-ig emelkedett a *P. carsonii* tartalmú bioreaktor használatakor a folyamatos üzemű rendszerben a rázatott lombikos eredményekhez képest. A rögzített *L. elongisporus* törzsek katalizálta reakcióban az (*R*)-**4** aciloin termék enantiomer tisztasága is javult ( $ee_{(R)-4} = 96\%$ ). Munkánk során sikerült találnunk két különböző élesztő törzset (*P. carsonii* és *L. elongisporus*), amelyek hatékony biokatalizátornak bizonyultak mind a ketonok enantiotóp szelektív bioredukcióiban (ketoreduktáz aktivitás), mind az aciloin kondenzációs reakcióban (piruvát-dekarboxiláz aktivitás), ezért ezeket a törzseket a következőkben immobilizált egész-sejtes, többcélú/kapcsolható aktivitású biokatalizátorként vizsgáltuk (3. ábra).



3. ábra Kapcsolható biotranszformációk folyamatos üzemű reaktorokban

A kapcsolható biotranszformációk vizsgálatait elsőként szakaszos üzemen, rázatott lombikos kísérletekben tanulmányoztuk [rögzített *L. elongisporus* katalizálta aciloin kondenzáció, első reakcióként ( $x_{(R)-4}$  = 44%,  $ee_{(R)-4}$  = 92%), majd az **1a** keton redukciója második lépésént ( $c_{1a}$  = 44%,  $ee_{(S)-2a}$  >99%); és a rögzített *P. carsonii*- katalizálta aciloin kondenzáció, első reakcióként ( $x_{(R)-4}$  = 5%,  $ee_{(R)-4}$  = 92%), majd az **1a** keton redukciója második lépésént ( $c_{1a}$  = 52%,  $ee_{(S)-2a}$  >99%)]. A rázatott lombikban végzett előzetes kísérletek után „az igény szerint kapcsolható” biotranszformációkat folyamatos üzemű átfolyós bioreaktorokban hajtottuk végre egymást követő bioredukciós és aciloin kondenzációs folyamatokban. A különböző bioaktivitások közötti kapcsolhatóság demonstrálásához mindkét biokatalizátort egy hosszabb biotranszformációs folyamatban alkalmaztunk.

3. táblázat Az **1a** keton és **3** aldehid kapcsolható biotranszformációi rögzített egész-sejtes biokatalizátorral töltött mikroreaktorban, folyamatos üzemen

Biokatalizátor	Reakció	Szubsztrát	Y (%)	ee (%)
<i>L. elongisporus</i>	1	<b>1a</b>	90	>99
<i>L. elongisporus</i>	2	<b>3</b>	47	97
<i>L. elongisporus</i>	3	<b>1a</b>	91	>99
<i>P. carsonii</i>	1	<b>1a</b>	86	>99
<i>P. carsonii</i>	2	<b>3</b>	15	90
<i>P. carsonii</i>	3	<b>1a</b>	87	>99

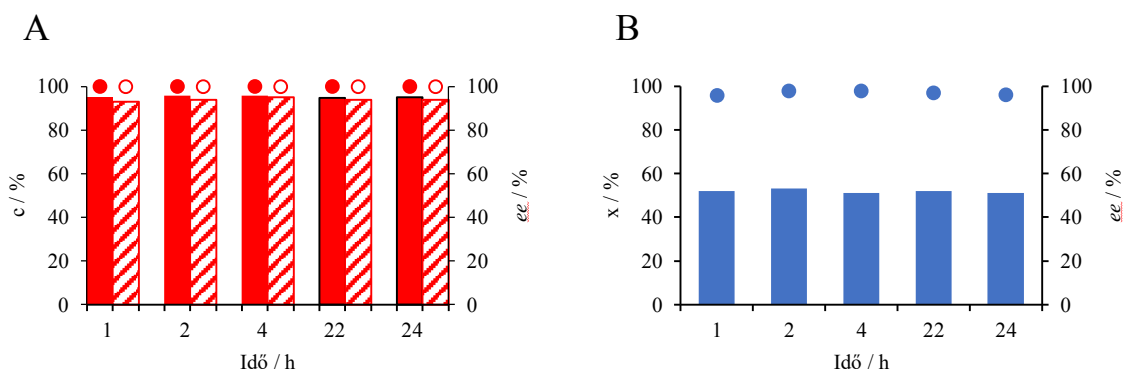
Elsőként az *L. elongisporus* alapú biokatalizátorral töltött oszlopban, az **1a** keton enantiotóp szelektív bioredukcióját hajtottuk végre, ami az előzményeknek megfelelően a keton majdnem teljes átalakulását eredményezte az (*S*)-**2a** terméké, kiváló enantiotóp szelektivitással ( $c_{1a}$  = 95%;  $ee_{(S)-2a}$  > 99%). A 2. reakciót megelőzően a rendszert citrát pufferrel mostuk, majd a 2. reakcióban a **3** benzaldehid aciloin kondenzációját végeztük el elfogadható produktivitással ( $x_{(R)-4}$  = 51%) és nagy enantiomer tisztasággal ( $ee_{(R)-4}$  = 97%). Ezt követően foszfát-pufferrel való megfelelő mosás után ismételt az **1a** keton bioredukcióját tanulmányoztuk a 3. reakcióban, ugyanazon a töltött oszlopon. A 3. reakcióban is az 1. reakcióhoz hasonlóan, minimális visszaeséssel, de még mindig magas termeléssel sikerült előállítanunk az (*S*)-**2a** alkoholt ( $c_{1a}$  = 93%), megőrizve a kiváló enantiomer tisztaságot ( $ee_{(S)-2a}$  > 99%) (3.táblázat).

A *P. carsonii* tartalmú töltött ágyas bioreaktorok vizsgálata esetén valamivel alacsonyabb konverzióval, de hasonló eredményeket és trendeket figyelhettünk meg az egyes reakcióknál. Az így kidolgozott rendszerünkkel sikerült megvalósítanunk különböző enantiomer tiszta



vegyületek [(*S*)-**2a** 1. és 3. reakcióban és (*R*)-**4**, a 2. reakcióban] egymás utáni szintéziseit, ugyanazzal a töltött oszlopos bioreaktorral, folyamatos üzemben.

A kapcsolható biotranszformációs folyamat három reakciója során megállapítottuk, hogy a szol-gél rögzített biokatalizátorok jó működési stabilitással rendelkeznek az összesen három napos folyamat során (4. ábra). Sajnos az egész-sejt tartalmú biokatalizátorokkal megvalósított folyamatos üzemi aciloin kondenzációkban alacsonyabb működési stabilitás volt megfigyelhető, ezért egy 4. reakcióban való felhasználása nem volt eredményes. 1 óra elteltével kevesebb mint, 5% (*R*)-**4** keletkezett és további aktivitás csökkenés volt megfigyelhető feltételezhetően (*R*)-**4** termék előállításához szükséges piruvát-dekarboxiláz enzimaktivitás elvesztése és az élesztő sejtek degradációja miatt.



**4. ábra** Működés közbeni stabilitás vizsgálata a rögzített *L. elongisporus* sejtek három egymást követő különböző folyamatos üzemi biotranszformációjában. A mutatja az **1a** keton enantiotóp szelektív redukciójának az eredményeit az 1. reakcióban ( $c_{1a}$ : ■;  $ee_{(S)-2a}$ : ●) és a 3. reakcióban ( $c_{1a}$ : □;  $ee_{(S)-2a}$ : ○). B panel tartalmazza a **3** aciloin kondenzáció eredményeit a 2. reakcióban ( $x_{(R)-4}$ : ■;  $ee_{(R)-4a}$ : ●).

#### 4.3. Közösen rögzített biokatalizátorok vizsgálata folyamatos üzemi átfolyós kaszkád bioreaktorokban

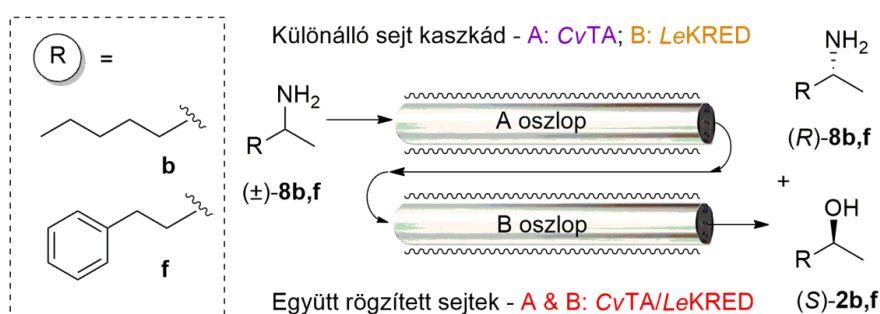
A kiválasztott egész-sejtes együtt rögzített rendszer biokatalitikus tulajdonságainak tesztelésére modell biotranszformációként a racém 4-fenil-bután-2-amin [(±)-**8f**] kinetikus rezolválását és hozzá kapcsolt reakcióként a keletkező keton enantiotóp szelektív redukcióját választottunk. A racém 4-fenil-bután-2-amin [(±)-**8f**] szubsztrátként való kiválasztásánál figyelembe vettük, hogy a reakciójából származó termékek valódi szintetikus jelentőséggel bírnak. A visszamaradó (*R*)-amin (*R*)-**8f**, a Dilevalol vérnyomáscsökkentő szer intermedierje<sup>14</sup>, és a reakció során képződő (*S*)-alkohol (*S*)-**2f** felhasználása ízesítő szerek, vérnyomáscsökkentő szerek, valamint görcsoldó (epilepszia elleni) szerek szintézis prekursoraként is ismert<sup>15</sup>. Az amin [(±)-**8f**] a *Chromobacterium violaceum* (CvTA) ω-transzamináz már ismert szubsztrátja, és a megfelelő ketonra is jó aktivitást mutatott már korábban a *Lodderomyces elongisporus* (LeKRED) élesztőtörzs. A folyamat működési hipotézise a következő volt; a kaszkád reakció során a CvTA katalizálta első lépésben az (*S*)-**8f** amin **1f** ketonná alakul át, míg a kevésbé reaktív (*R*)-**8f** amin enantiomertiszta formában marad az oldatban. Ezután a LeKRED által katalizált második lépésben a **1f** ketont sztereoselektíven (*S*)-**2f** alkoholra redukáljuk. A módszerek robusztusságának bizonyítása céljából a kaszkád reakció rendszert, a heptán-2-amin (±)-**8b** biotranszformációiban is vizsgáltuk.

A rögzítési kísérletek során a már élesztősejtekre kidolgozott módszert alkalmaztuk (közvetlenül a fermentáció utáni centrifugált sejtmassza immobilizálása, TEOS szilika prekursor használata és MAT540 üreges szilika mikrogömbök hordozóként való hozzáadása). Mind a bakteriális, mind az együtt rögzített egész-sejtek esetében a 30 m/m% szilika hordozó

14 J.E. Clifton, I. Collins, P. Hallett, D. Hartley, L.H.C. Lunts, P.D. Wicks, *J. Med. Chem.* **1982**, 25, 670-679.

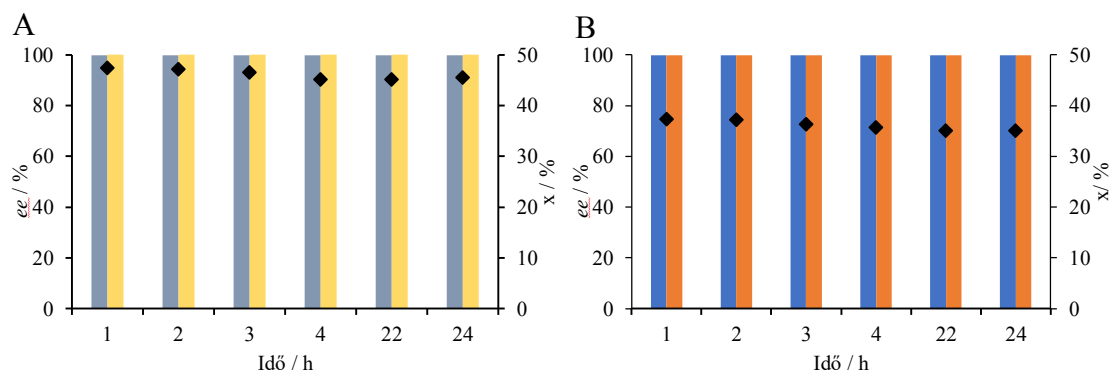
15 A. Liese, K. Seelbach, C. Wandry, *Industrial Biotransformation*, Wiley-VCH, New-York, **2000**, 423 pp

tartalom bizonyult az optimálisnak az immobilizált biokatalizátorok aktivitására és állagára. Szükséges volt a koimmobilizált biokatalizátor fejlesztésekor a sejt arány optimalására is. Amennyiben sejteket 1:1 tömegarányban kevertük össze, az kis mennyiségű, de enantiomer tiszta alkoholt (*S*)-**2f** ( $x_{(S)\text{-}2f} = 19\%$ ) eredményezett. Abban az esetben, ha 2:1 arányban mértük és kevertük be a *Le*KRED és *Cv*TA sejteket, akkor szolgél rögzített készítményünk kiváló biokatalitikus viselkedést mutatott ( $x_{(S)\text{-}2f} = 46\%$ ;  $ee_{(R)\text{-}8f} > 99\%$  és  $ee_{(S)\text{-}2f} > 99\%$ ). A sejtarány 4:1-re történő további növelése a képződő alkohol mennyiségére és a visszamaradó amin enantiomer tisztaságára is negatív hatással volt a kaszkád rendszerben.



5. ábra A (±)-**8b,f** aminok folyamatos üzemű átalakítása enantiomertiszta aminná (*R*)-**8b,f** és alkohollá (*S*)-**2b,f** ko-immobilizált egész-sejtes bioreaktorokban

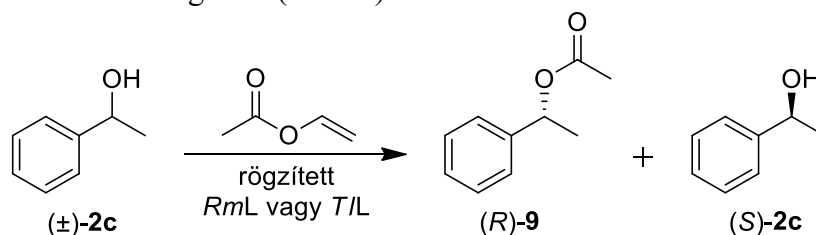
A különböző mikrobiális eredetű és különböző enzimaktivitásokkal rendelkező egész-sejtek együttes rögzítésének alkalmazhatóságát a (±)-**8b,f** aminok folyamatos üzemű kaszkád reakciójában vizsgáltuk. Az együtt rögzített *Le*KRED/*Cv*TA biokatalizátor előnyeinek bemutatásához a rendszer hosszabb működési stabilitásának eredményeit hasonlítottuk össze a különálló egész-sejtes *Cv*TA és *Le*KRED katalizálta kaszkádéval (5. ábra). A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a közösen rögzített egész-sejtek 24 óra működés után nagyobb aktivitással rendelkeztek folyamatos üzemű áramlásos reaktorokban, ezáltal nagyobb végkonverzióval nyerhető ki a rendszerből a keletkező (*S*)-**2f** alkohol (47%), mint a különálló rögzített sejtes rendszerben (42%). A hosszú távú stabilitási vizsgálatok első három órájában detektált konverziók átlag és szórás értékeit (1. óra, 2. óra, 3. óra:  $x_{(S)\text{-}2f} = 47,0 \pm 0,1\%$  különálló sejt kaszkád és  $x_{(S)\text{-}2f} = 47,0 \pm 0,4\%$  koimmobilizált sejtek esetében) az ugyanazon reakciók utolsó három órájában mért értékeihez viszonyítottuk (22. óra, 23. óra, 24. óra  $x_{(S)\text{-}2f} = 42 \pm 0,1\%$  különálló sejt kaszkád és  $x_{(S)\text{-}2f} = 46 \pm 0,2\%$  koimmobilizált sejtek esetében), és megállapítottuk, hogy a közösen rögzített TA-KRED sejtes rendszer jobb stabilitást mutatott a hosszú távú vizsgálatok során, mint a *Cv*TA és a *Le*KRED különálló egész-sejtes kaszkád rendszer. Ennek oka, hogy a KRED sejtek működése előnyös hatással bír a TA sejtek mellett a kaszkád reakcióban azáltal, hogy fokozza a transzamináz reakció működését, a képződő keton azonnali átalakításával, és eltávolításával az egyensúlyi folyamatból (6. ábra).



6. ábra A (±)-8f [(■) ee<sub>(R)</sub>-8f; (■) ee<sub>(S)</sub>-2f; (◆) x<sub>(S)</sub>-2f) Panel A) és (±)-8b [(■) ee<sub>(R)</sub>-8b; (■) ee<sub>(S)</sub>-2b; (◆) x<sub>(S)</sub>-2b) Panel B) amin folyamatos üzemi kinetikus rezolválás/bioredukció kaszkád időbeli stabilitása rögzített CvTA/LeKRED egész-sejtekkel töltött bioreaktorban.

#### 4.4. Rögzített *Rhizomucor miehei* és a *Thermomyces lanuginosus* lipáz enzim biokatalizátorok fejlesztése és vizsgálata a racém 1-feniletanol kintekus rezolválásában

Munkánk ezen szakaszában a hidrofób adszorpcióval előállított *Rhizomucor miehei* (RmL) és *Thermomyces lanuginosus* lipáz biokatalizátorokat tanulmányoztuk. A 19 különböző felületmódosított mezopórusos szilikagélre rögzített készítmény mellett, a módosítatlan és aktivált (4 napig rázatva 0,5 v/v% cc. NH<sub>4</sub>OH-t tartalmazó etanolban) hordozóra rögzített változatok biokatalitikus aktivitását is tanulmányoztuk. Az így előállított enzim biokatalizátorok produktivitását és szelektivitását a racém 1-fenil-etanol (±)-2c lipáz katalizált kinetikus rezolválásában vizsgáltuk (7. ábra).



7. ábra Racém 1-feniletanol (±)-2c kinetikus rezolválása rögzített RmL vagy TIL enzimekkel, rázatott lombikban

Eredményeink alapján megállapítható, hogy az *RmL* és *TIL* enzimek eredményesen rögzíthetők felületmódosított mezopórusos szilikagélekre. (4. táblázat). Megállapítható, hogy az enzimek rögzítésére alkalmazott optimális módszer függ a szubsztrát jellegétől és a reakciókörülményektől is. Tanulmányunk szerint a *Rhizomucor miehei* és *Thermomyces lanuginosus* lipázok különféle felületmódosított szilikagélekre való rögzítése utána kapott biokatalizátorok közül találtunk olyan készítményt, ami megfelelő katalitikus paraméterekkel bírt a racém 1-fenil-etanol (±)-2c kinetikus rezolválásában.

**4. táblázat** A (±)-2c kinetikus rezolválása felületmódosított szilikagélre adszorpciósan rögzített *Rhizomucor miehei* és *Thermomyces lanuginosus* lipáz készítménnyel

Felületmódosító csoport	<i>RmL</i>				<i>TiL</i>			
	$c_{(\pm)-2c}$ (%)	$ee_{(R)-9}$ (%)	E (-)	$U_B$ ( $\mu\text{mol perc}^{-1} \text{g}^{-1}$ )	$c_{(\pm)-2c}$ (%)	$ee_{(R)-9}$ (%)	E (-)	$U_B$ ( $\mu\text{mol perc}^{-1} \text{g}^{-1}$ )
-	0,4	74,6	6,9	1,2	1,3	97,9	93	3,6
metil	6,4	98,4	132	17,6	13,5	97,3	84	37,1
etil	7,8	98,3	128	21,2	17,1	96,9	77	46,9
propil	16,3	98,5	163	44,9	10,6	97,5	90	29,2
hexil	1,3	96,8	62	3,5	6,5	98	106	17,8
decil	1,8	97,3	76	4,9	9,7	97,6	91	26,7
dodecil	0,8	96,1	59	2,1	6,5	98	105	18,1
oktadecil	1,8	97,3	74	4,9	6,8	97,8	97	18,7
fenil	7,8	98,6	151	21,5	14	97,3	85	39
perfluoroktil	10,5	98,5	148	29	17,8	97,1	82	49,6
vinil	3,9	98,3	120	10,8	14,5	97	78	39,7
2-cianoetil	3,9	98,6	147	10,7	10,4	97,5	90	29
3-klórpropil	6,3	98,9	187	17,2	13,9	97,2	81	38,3
3-merkaptopropil	5,2	98,6	152	14,3	14,8	97,1	80	41,1
dimetil	0,3	98,6	142	0,9	13,5	97,2	82	37,2
fenil–metil	9	98,7	172	24,8	20,2	96,6	73	55,9
ciklohexil–metil	1,6	97,9	96	4,5	10,3	97,8	99	28,7

## 5. Tézisek

1. Elsőként mutattuk be a *Wickerhamomyces subpelliculosus* élesztő törzs izolátumokat, alifás és aromás ketonok bioredukciójának hatékony biokatalizátoraiként, különböző koszsusztrátok jelenlétében, szakaszos üzemű rázatott lombikos eljárásban. [I]
2. Kidolgoztunk egy új és általánosítható, racionális fizikai rögzítésen alapuló stratégiát, amely lehetővé tette közvetlenül a fermentáció után a különböző biokatalitikus aktivitással rendelkező egész-sejtek immobilizálását. Ezáltal egy könnyen előállítható, hosszútávon tárolható és jó mechanikai stabilitású biokatalizátort kaptunk. A kidolgozott sejt immobilizációs eljárással elkerülhetők azok a pénz és időigényes folyamatok, ami tisztított enzimalapú biokatalizátorok előállításánál felmerülhetnek (például a sejtek feltárása, enzim izolálás és tisztítás). [I, II, III]
3. Megvalósítottuk ketonok folyamatos üzemű átfolyásos reaktorban való bioredukcióját, eddig kevésbé vizsgált, rögzített élesztő egész-sejtes biokatalizátorokkal. A fenntarthatóságot szem előtt tartva, a NADH kofaktor visszanyerésére alkalmas módszert dolgoztunk ki, majd a visszanyert kofaktort következő a bioredukciókban sikerrel használtuk fel. [IV]
4. Sikeresen alkalmaztunk ezidáig nem vizsgált élesztő egész-sejtes szol-gél biokatalizátorokat aciloin kondenzációs reakcióban. A készítményekkel megvalósítottuk az L-fenilacetilkarbinol előállítását folytonos átfolyású bioreaktorban, melyben az élesztő készítmények magasabb aktivitását mutattuk ki a szakaszos üzemben tapasztaltakhoz képest. [III, IV]
5. Elsőként állítottunk elő élesztő egész-sejtek szol-gél rögzítésének segítségével különböző biotranszformációkra „igény szerint kapcsolható” biokatalizátorokat. A kapott biokatalizátorok alkalmasak többféle biotranszformációra, működésüket a hozzáadott szubsztrát és a megfelelő reakciókörülmények határozzák meg/aktiválják, akár egymást követő reakciókban is, ahol az aktuális reakció független az előző ciklusban végrehajtott reakciótól, és a termékeik külön-külön kinyerhetők. [IV]
6. Sikeresen valósítottunk meg királis aminok és alkoholok előállítására alkalmazható, szakaszos és folyamatos üzemben is használható biokatalitikus kaszkád rendszert, a különböző mikrobiális eredetű (*E.coliban* expresszált *Chromobacterium violaceum* és *Lodderomyces elongisporus* élesztőtörzs) és különböző enzimaktivitásokkal rendelkező ( $\omega$ -transzamináz és ketoreduktáz) egész-sejtek együttes rögzítésének köszönhetően. [II]
7. Bebizonyítottuk, hogy a mezopórusos szilika gélek hatékony hordozónak bizonyultak a *Rhizomucor miehei* és a *Thermomyces lanuginosus* lipázok adszorpciós immobilizációjában, valamint felületmódosító csoportok befolyásolják a rögzített lipázok biokatalitikus működését az alkoholok kinetikus rezolválásában. [V]

## 6. Alkalmazási lehetőség

A ketoreduktáz aktivitásukról ismert élesztőket előszeretettel alkalmazzák prokirális ketonok enantiomertiszta alkoholokká történő redukciójában, amelyek értékes építőelemek a különféle gyógyszerek szintézisében. Az enantiomertiszta aciloin termékek – ketoalkoholok is fontos szerepet töltenek be az aktív gyógyszeripari hatóanyagok előállításában. Eredményeink

alapján a *L. elongisporus*, *P. carsonii*, *C. norvegica*, *D. fabryi*, *W. subpelliculosus* WY3 és *W. subpelliculosus* WY13 törzseket bátran ajánlhatók a kémiai eszköztár bővítésére, a keton redukciókban és/vagy aciloin kondenzációban mutatott jó aktivitására és magas szelektivitására alapozva.

A biokatalitikus kaszkád rendszerek pedig jó alternatívaként szolgálhatnak a komplex reakciók, enyhe reakciókörülmények között történő végrehajtására. Munkánk során a különböző eredetű és különböző enzimaktivitású (*E. coli*-ban expresszált *Chromobacterium violaceum*  $\omega$ -transzamináz aktivitással és *Lodderomyces elongisporus* ketoreduktáz aktivitással) mikrobiális sejtekre kidolgozott szol-gél rendszerbe rögzített biokatalizátorok, hatékonyan alkalmazhatók biokatalitikus kaszkád rendszerekben, királis vegyületek előállítására.

## 7. Közlemények

### Értekezés alapjául szolgáló közlemények

[I] V. Bódai, L. Nagy-Győr, R. Örkényi, Zs. Molnár, Sz. Kohári, B. Erdélyi, Zs. Nagymáté, Cs. romsics, Cs. Paizs, L. Poppe, G. Hornyánszky: *Wickerhamomyces subpelliculosus* as whole-cell biocatalyst for stereoselective bioreduction of ketones, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2016**, *134*, 206–214. DOI: 10.1016/j.molcatb.2016.11.003. IF: 2,269, szerzői arány: 80%; I: 2, FI: 1.

[II] L. Nagy-Győr, E. Abaházi, V. Bódai, P. Sátorhelyi, B. Erdélyi, D. Balogh-Weiser, Cs. Paizs, G. Hornyánszky, L. Poppe: Co-immobilized whole-cells with  $\omega$ -transaminase and ketoreductase activity for continuous-flow cascade reaction, *ChemBioChem*, **2018**, *19*, 1845–1848. DOI: doi.org/10.1002/cbic.201800286. IF: 2,774, szerzői arány: 51%; I: 2.

[III] L. Nagy-Győr, E. Farkas, G. Tóth, D. Incze, G. Hornyánszky, L. Poppe, D. Balogh-Weiser: Conversation of the biocatalytic activity of whole-cells – 2<sup>nd</sup> generation sol-gel entrapment of yeast for sustainable acyloin condensation, *Periodica Polytechnica – Chemical Engineering*, **2019**. DOI: 10.3311/PPch.14645. IF: 1,382, szerzőiarány: 55%

[IV] L. Nagy-Győr, M. Lacatus, D. Balogh-Weiser, P. Csuka, V. Bódai, B. Erdélyi, Zs. Molnár, G. Hornyánszky, Cs. Paizs, L. Poppe: How to turn yeast cells into sustainable and switchable biocatalyst? On-demand catalysis of ketone bioreduction or acyloin condensation, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **2019**, DOI:10.1021/acssuschemeng.9b03367. IF: 6,97, szerzői arány: 60%

[V] L. Nagy-Győr, Z. Boros, L. Poppe: Immobilization of lipases from *Rhizomucor miehei* and *Thermomyces lanuginosus* by adsorption on variously grafted silica gels, *Periodica Polytechnica – Chemical Engineering*, **2013**, *57*, 37–40. DOI: 10.3311/PPch.2168. IF: 0,130, szerzői arány: 95%; I: 5, FI: 2.

### Egyéb publikációk

Z. Boros, L. Nagy-Győr, K. Kátai-Fadgyas, I. Kőhegyi, I. Ling, T. Nagy, Z. Iványi, M. Oláh, Gy. Ruzsics, O. Temesi, B. Volk, B. *Journal Flow Chemistry*, **2019**, *9*, 101–113. IF: 1,658, szerzői arány: 15%

E. Farkas, E. Abaházi, L. Nagy-Győr, Z. Szakács, J. Kóti, P. Sátorhelyi, J. Éles, L. Poppe, G. Hornyánszky, XL. Kémiai Előadói Napok, Conference Book (ISBN: 978-963-9970-83-0), 2017.

### **Előadások**

Nagy-Győr L., Boros Z., Poppe L.: Biodízel újszerű felhasználása oldószermentes enzimátikus kinetikus rezolválásokban, *XVIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia*, **2012.** november 22–25., Félixfürdő, Románia

Nagy-Győr L., Boros Z., Kátai-Fadgyas K., Kőhegyi I., Ling I., Nagy T., Iványi Z., Oláh M., Ruzsics Gy., Temesi O., Volk B.: Lombikból áramlásos reaktorba: a technológia váltásának lehetőségei a vortioxetin szintézisének példáján keresztül, *XLII. Kémiai Előadói Napok*, **2019.** október 28–30., Szeged

### **Poszterek**

Nagy-Győr L., Boros Z., Poppe L.: Biodízel újszerű alkalmazása oldószermentes enzimkatalizált kinetikus rezolválásokban, *MKE Vegyészkonferencia*, **2013.** június 26–28., Hajdúszoboszló, Magyarország

L. Nagy-Győr, Cs. Kalinák, V. Bódai, P. Sátorhelyi, B. Erdélyi, Z. Boros, L. Poppe: Novel ketoreductases from yeasts for stereoselective bioreductions of ketones, *COST CM1303 “SysBiocat” Training School*, **2014.** május 28 – június 1., Certosa di Pontignano, Olaszország

Nagy-Győr L., Bell E., Boros Z., Oláh M., Weiser D., Dr. Hornyánszky G., Dr. Nagy J., Dr. Csajági Cs., Dr. Poppe L.: Új típusú, komplex kódolási eljárás alapuló biztonsági, eredet- és egyediségjelölő, hamisítás elleni rendszerek kifejlesztése, *Oláh György Doktori Iskola XII. Konferencia*, **2015.** február 5., Budapest, Magyarország

Nagy-Győr L., Molnár Zs., Dr. Bódai V., Dr. Erdélyi B., Dr. Hornyánszky G., Dr. Poppe L., Dr. Paizs Cs.: *Wickerhamomyces subpelliculosus* felhasználása egészséjtes biokatalizátorként ketonok sztereoselektív bioredukciójában, *Oláh György Doktori Iskola XIII. Konferencia*, **2016.** február 11., Budapest, Magyarország

L. Nagy-Győr, E. Abaházi, V. Bódai, P. Sátorhelyi, B. Erdélyi, G. Hornyánszky, L. Poppe, *BioTrans, 13th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations*, 9 – 13 July **2017**, Budapest, Hungary