

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

---

BIOKATALIZÁTOR FEJLESZTÉSEK ENANTIOMERTISZTA VEGYÜLETEK  
ELŐÁLLÍTÁSÁHOZ

PHD TÉZISFÜZET

SZERZŐ: CSUKA PÁL

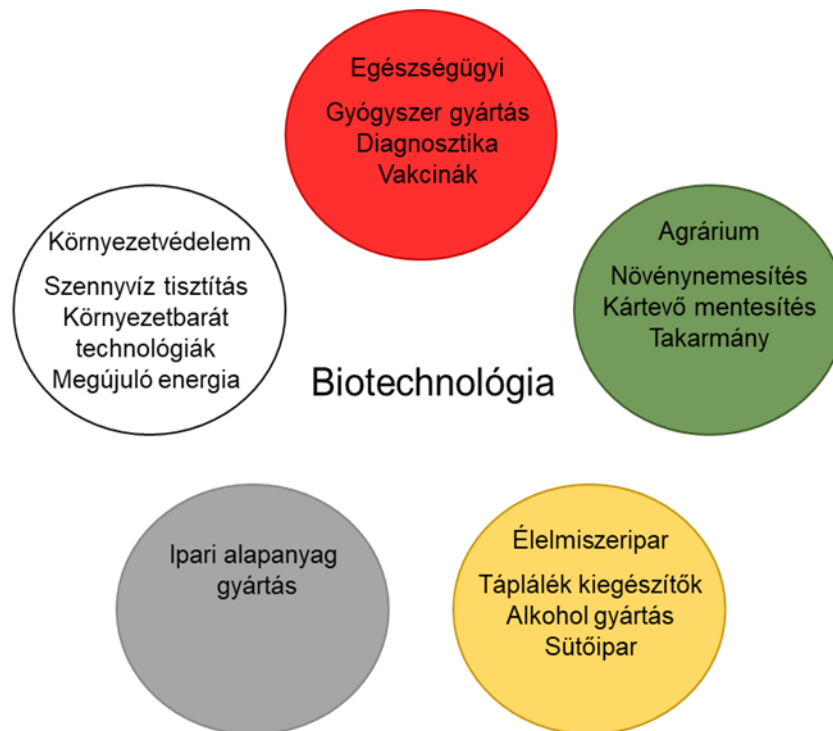
TÉMAVEZETŐ: DR. POPPE LÁSZLÓ

SZERVES KÉMIA ÉS TECHNOLÓGIA TANSZÉK

2021

## 1. Bevezetés

A doktori disszertációmban feldolgozott témák a biotechnológia változatos részeihez kapcsolódnak. A biotechnológia párhuzamosan fejlődött az technológiai és társadalmi változásokkal. A biotechnológiai ágazatoknak kétségtelenül hatalmas szerepe van a nemzetgazdaságok növekedésében, olyan fontos iparágakkal kapcsolatban, mint az élelmiszeripar, agrárium, gyógyszeripar, energiaipar, vegyipar és környezetvédelem. A hagyományos biotechnológia alapvetően a fermentációs technológiákra épít. Itt mikroorganizmusok felszaporítására és a természetes anyagok mikroorganizmusokkal történő előállítására kell gondolni. A modern biotechnológiát a géntechnológia megjelenésétől számítjuk. A lehetőség, hogy meg tudunk változtatni géneket, más organizmusba tudjuk helyezni, rengeteg új lehetőséget nyitott meg a biológiával kapcsolatos kutatások területén. Ez a lehetőség nyitotta meg az utat, hogy rekombináns fehérjéket állítsunk elő. A folyamatos fejlődés a biológián belül ma már új, önálló tudományterületeket hozott létre, mint például az enzimológia, az immunológia, a molekuláris diagnosztika vagy a bioinformatika. A biotechnológia főbb meghatározó irányait az 1. ábra szemlélteti.



1. ábra A biotechnológia főbb területei

A doktori munkám során több eltérő biokatalizátorral is foglalkoztam, melyekkel eltérő technológiai alapon valósíthatóak meg nagy enantiomertisztaságú vegyületek előállítása. Vizsgáltuk lipáz enzimek készítmények hatékonyságát kinetikus rezolválásban és állítottunk elő nagy enantiomertisztaságú savamid-származékokat, melyeket továbbalakítva potenciális tirozin kináz inhibitorokat állítottunk elő. Továbbá vizsgáltunk egészséjtes élesztőtörzseket, melyek oxidoreduktáz enzimek készítményét felhasználva ketonok sztereoselektív redukcióját valósítottuk meg. Hat különböző élesztő törzsszel és három eltérő típusú tesztsubstráttal

végrehajtott bioredukciókat ortogonális kísérlettervezéssel optimaltunk, majd karakterizáltuk az élesztő törzseket pH, reakció hőmérséklet és az (*S*)-alkohol előállításának produktivitás alapján. Továbbá célunk volt új MIO-enzimek (aromás aminosav ammónia-liázok és 2,3-aminomutázok) azonosítása, előállítása és karakterizálása. A MIO-enzimeket szekvencia adatbázisban hasonlóság alapján kerestük és jósoltuk meg a természetes szubsztrát elfogadását. Az enzimek előállításával és karakterizálásával terveztük az enzimek felhasználhatóságát vizsgálni. Az enzimeket felhasználtuk nagy enantiomer tisztaságú természetes és nem természetes aminosavak előállítására kinetikus rezolválással és aszimmetrikus szintézissel.

## 2. Irodalmi háttér

### 2.1. Kinetikus rezolválás *Candida antarctica* B lipázzal

A *Candida antarctica* törzsből származó B lipáz (*CaLB*) iparilag releváns enzim, mellyel számos hidrolízis, észterképzés és acilezési reakció valósítható meg. A *CaLB* enzimet leggyakrabban immobilizált formában használják.<sup>1</sup> Kiválóan alkalmazható szerves közegben aminok és alkoholok kinetikus rezolválására is. Az acilezési reakciókat aromás és alifás aminokkal és alkoholokkal is vizsgálták már: butilamin, 1-feniletilamin, 2-fenil-1-propilamin, indol, 2-butanol illetve számos acilezőszerrel: etil-acetát, izopropil-acetát, etil-metoxiacetát, izopropil-butanoát vagy butil-acetát.<sup>2,3</sup> Az racém 1-feniletilamin kinetikus rezolválása etil-metoxiacetáttal ipari mértékben megoldott a BASF szabadalma alapján. A keletkező (*R*)-amid és a visszamaradó (*S*)-amin forráspontra alapján elválasztható, a termékek nagy enantiomertisztasággal keletkeznek a rezolválás során.<sup>4</sup>

### 2.2. Sztereoselektív alkohol szintézis ketoreduktáz aktivitású élesztőkkel

A ketoreduktázok az oxidoreduktáz enzimosztályába tartoznak. A nevükből adódóan a ketocsoportot szekunder alkoholokká redukálják, illetve a szekunder alkoholokat ketonná képesek oxidálni. Az enzimek működéséhez nélkülözhetetlen a NAD(P)H kofaktor jelenléte, ez biztosítja a hidrogén transzportját a reakcióban. Abban az esetben, ha a ketocsoporthoz kapcsolódó szénláncok minőségében eltérés van, akkor a bioredukcióban két enantiomer képződésére van lehetőség, így enzimtől függően fordul elő, hogy melyik enantiomer képződése lesz a preferált a redukció során, illetve az oxidáció során melyik enantiomer lesz a preferáltan oxidálendő szubsztrát. Az enzim 3D szerkezete határozza meg, hogy az (*R*)- vagy (*S*)-izomer lesz a preferált, annak függvényében, hogy a szubsztrát és a kofaktor, milyen módon képes az enzim kötőhelyében elhelyezkedni. A ketoreduktázok igen elterjedtek és számos

---

<sup>1</sup> G. Hellner, Z. Boros, A. Tomin, L. Poppe, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2481–2491.

<sup>2</sup> Z. Boros, P. Falus, M. Márkus, D. Weiser, M. Oláh, G. Hornyánszky, J. Nagy, L. Poppe, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2013**, 85–86, 119–125.

<sup>3</sup> M. Oláh, S. Suba, Z. Boros, P. Kovács, M. Gosselin, C. Gaudreault, G. Hornyánszky, *Period. Polytech. Chem. Eng.* **2018**, 62, 519–532.

<sup>4</sup> A. Schmid, J. S. Doderick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, 409, 258–268.

metabolit átalakításáért felelősek az élőszervezetekben, ebből kifolyólag egy organizmus számos ketoreduktázt tartalmazhat, melyek tulajdonságai nem feltétlen egyeznek meg. A legjelentősebb eltérés abban mutatkozik meg, hogy a szubsztrát képes az enzimbe való kötődésre vagy sem (szubsztrát szelektivitás), tehát valós szubsztrátja-e vagy sem az enzimnek.<sup>5,6</sup> Célszerű felhasználni egészszejtes élesztőtörzseket biotranszformációkhoz, hiszen előállításuk fermentációval a könnyebben megvalósítható technológiák közé tartozik. A legtöbb élesztő nem jelent veszélyt az ember számára, az általános munkavédelmi szabályokat betartva az egészségre nem veszélyesek. Az egészszejtesek használatával szükség esetén meg lehet oldani a kofatorok regenerálását a sejten belül is. Élesztő sejtekkel számos biotranszformációt hajtanak végre a laboratóriumi mértéktől az ipari méretekig. Egészszejtes élesztőkkel megvalósíthatóak ketonok redukciói, C=C redukciók, hidrolitikus reakciók és C-C kötés kialakítása is.<sup>7,8</sup>

### 2.3. MIO enzimek azonosítása és felhasználása

A MIO-enzimcsaládba olyan aromás ammónia-liázok és 2,3-aminomutázok tartoznak, melyeknek proszttranszlációsan kialakuló katalitikus csoportja van: 3,5-dihidro-5-metilidén-4*H*-imidazol-4-on (MIO-csoport). Az enzimek aromás aminosavak nem oxidatív reverzibilis ammónia eliminációját, illetve az amincsoport  $\alpha,\beta$ -izomerizációját katalizálják. Ez a katalitikus csoport minden MIO-enzimben megtalálható, mutációs kísérletekben bizonyították, ha a polipeptid lánc nem tartalmazza a kialakuláshoz szükséges ASG vagy TSG aminosav triádot, melyből kialakul a MIO-csoport, akkor az enzimek elveszítik katalitikus tulajdonságaikat.<sup>9,10</sup>

A MIO-enzimcsaládba tartozó ammónia-liázok közül alapvetően hármat különböztetünk meg, de léteznek már átfedések is. A három legnagyobb csoportjukat a fenilalanin ammónia-liázok (PAL), tirozin ammónia-liázok (TAL) és a hisztidin ammónia-liázok (HAL) alkotják, azonban már leírták a fenilalanin/tirozin ammónia-liázokat (PTAL) is. A 2,3-aminomutázok közé a fenilalanin 2,3-aminomutáz (PAM) és tirozin 2,3-aminomutázok (TAM) tartoznak. A fenilalanin 2,3-aminomutázok és a tirozin 2,3-aminomutázok sztereoszelektíven (*R/S*) képesek katalizálni az  $\alpha,\beta$  izomerizációs reakciókat. A MIO-enzimek csoportosítását mutatja be a 2. ábra.

---

<sup>5</sup> G. W. Huisman, J. Liang, A. Krebber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 122–129

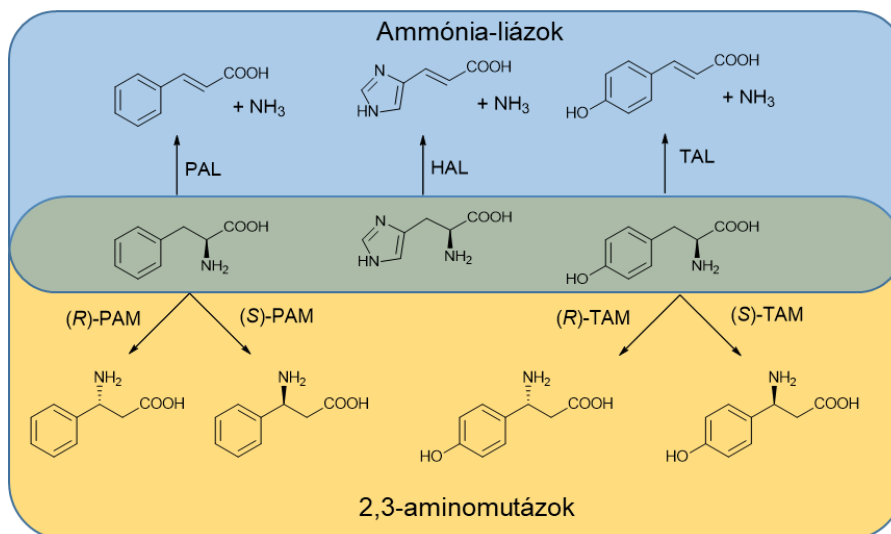
<sup>6</sup> S. F. Haq, A. P. Shanbhag, S. Karthikeyan, I. Hassan, *Microb. Cell Fact.* **2018**, 1–14.

<sup>7</sup> D. Kuhn, L. M. Blank, A. Schmid, B. Bühler, *Eng. Life Sci.* **2010**, *10*, 384–397.

<sup>8</sup> B. Pscheidt, A. Glieder, *Microb. Cell Fact.* **2008**, *7*, 1–36.

<sup>9</sup> L. Poppe, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 512–524.

<sup>10</sup> F. Parmeggiani, N. J. Weise, S. T. Ahmed, N. J. Turner, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 73–118.



2. ábra MIO-enzimek csoportosítása a katalizált reakció alapján

### 3. Kísérleti módszerek

#### 3.1. *rac*-1-feniletilamin kinetikus rezolválása

A *rac*-1-feniletilamin *rac*-1 (0,41 mmol, 50 mg) és alkil-2-cianoacetát (**2a**: etil-2-cianoacetát: 0,5 ekv., 23 mg; vagy **2b**: izopropil-2-cianoacetát: 0,5 ekv., 36 mg) és 100 mg *CaLB* N435 biokatalizátort 2 mL toluol/tetrahidrofurán elegyéhez adtuk és szobahőmérsékleten 400 rpm ráztattuk 4 órán keresztül. Mintát vettünk 1, 2, 3 és 4 h után. A biokatalizátort kiszűrtük az oldatból, majd a szűrletet vákuumban bepároltuk. A maradékot 7,5 mL 5 % HCl oldatban feloldottuk és  $3 \times 12$  mL diklórmetánnal extraháltuk. A szerves fázist nátrium-szulfáttal szárítottuk és vákuumban bepároltuk, így kaptuk meg az (*R*)-**3** vegyületet. A vizes fázist 5 mL 40 % ammónia oldattal lúgosítottuk és  $3 \times 12$  mL diklórmetánnal extraháltuk. A szerves fázist nátrium-szulfáttal szárítottuk és vákuumban bepároltuk, így kaptuk meg az (*S*)-**1** vegyületet.

Az acilezőszer adagolását a következőképpen vizsgáltuk. A 2 mL toluol/tetrahidrofurán 1:1 elegyéhez *rac*-1-feniletilamint *rac*-1 (0,41 mmol, 50 mg), 100 mg *CaLB* N435 biokatalizátort és etil-2-cianoacetátot **2a** a következők szerint: A változat: 0,5 ekv., 23 mg; B változat: 1 ekv. 46 mg; vagy C változat: 0,5 ekv., 23 mg + 0,25 ekv., 11,5 mg (2 h) + 0,25 ekv., 11,5 mg (4 h). A reakcióelegyet szobahőmérsékleten 400 rpm ráztattuk és mintát vettünk 2; 4; 6 és 24 h időpontban. A reakcióelegyeket az előbbieknél megfelelően dolgoztuk fel.

#### 3.2. Ketoredukciók optimalizálása kísérlettervezéssel

Minden élesztő szubsztrát páros optimalizálási reakció megtervezését és kiértékelését Statistica program DOE (design of experiments) funkciójával ortogonális kísérleti tervek készítésével és kiértékelésével végeztük. A következő paramétereket vizsgáltuk az optimalizálási reakciókban: liofilizált biokatalizátor egységnyi mennyisége ( $\text{mg mL}^{-1}$ ), kosubsztrát mennyisége (V/V%), puffer erősség (mM), reakció hőmérséklete ( $^{\circ}\text{C}$ ) és a puffer pH értéke. Az első körben  $2^{(5-2)}$  alapú kísérleti tervet kiegészítő kísérleti tervvel (foldoverrel) és 3

centrumponi ismétléssel terveztük meg és végeztük el a kísérleteket. Az eredményeket a vizsgált faktorok hatásának és kölcsönhatásának szignifikancia vizsgálatával értékeltük (szignifikánsnak tekintettük ha  $p < 0,05$ ), illetve az illesztett model 3D vizualizációjával. A második körben a szignifikáns faktorok beállításainak megváltoztatásával állapítottuk meg a reakciók optimumát, ehhez  $2^2$ ,  $2^3$  és  $3^2$  teljes kísérletterveket készítettünk. Abban az esetben, ha a linearitás vizsgálatára teljesült a  $p < 0,05$  feltétel, akkor a kísérleti tervet kiegészítettük  $3^2$  kísérleti tervre, így a lineáris és a másodfokú hatásokat és kölcsönhatásokat is értékeltük

A kísérleti tervben meghatározott mennyiségű WY1, WY4 és WY12 törzsekkel 5 mL, míg a WY2, WY7 és WY11 törzsekkel 1 mL reakció térfogatban végeztük a bioredukciókat a kísérleti tervnek megfelelő erősségű nátrium-foszfát pufferben a megfelelő pH-ra beállítva. A reakciókhoz 6 mg mL<sup>-1</sup> szubsztrátot (fenilacetone **6a**, acetofenon **6b** és 2-heptanon **6c**) és a kísérleti tervnek megfelelő mennyiségű 2-propanol kosubsztrátot használtunk. A reakciókat 300 - 400 rpm rázattuk 4 h keresztül a megfelelő hőmérsékleten. A megállapított optimumban vizsgáltuk az egészsejtes élesztők ketoreduktáz aktivitását pH 2-12 tartományban, 25-60 °C hőmérsékleti tartományban, illetve a szubsztrát koncentráció 2-20 mM hatását a produktivitásra (15 min reakcióidővel).

### 3.3. MIO-enzimek azonosítása és felhasználása

#### 3.3.1. MIO-enzimek azonosítása és előállítása

A potenciális MIO-enzimek génjeinek azonosításához BLASTp funkcióval kerestük az NCBI (National Center for Biotechnology Information; Bethesda, Egyesült Államok) adatbázisban. Kereső szekvenciának a MIO-enzimek konzervált szekvencia részleteit használtuk. Az enzim szekvenciákat többszörös szekvencia illesztéssel más ismert MIO-enzimekhez hasonlítottuk: *Pantoea agglomerans* (PaPAM, Q84FL5), *Ustilago maydis* PAL (UmPAL, Q96V77), *Rubrobacter xylanophilus* PAL (RxPAL, Q1AV79), *Anabaena variabilis* PAL (AvPAL, Q3M5Z3), *Petroselinum crispum* PAL (PcPAL, P24481), *Aradopsis thaliana* PAL (AtPAL, P35510), *Sorghum bicolor* PAL (SbPAL, C5XXT9), *Rhodobacter sphaeroides* TAL (RsTAL, Q3IWB0), *Rhodospiridium toruloides* TAL (RtTAL, P11544), *Pseudomonas putida* HAL (PpHAL, P21310), *Taxus canadensis* PAM (TcPAM, Q6GZ04), *Chondromyces crocatus* TAM (CcTAM, Q0VZ68) és *Streptomyces globisporus* TAM (SgTAM, Q8GMG0).

A rekombináns fehérjék termelését *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS baktériummal végeztük, melyek tartalmazzák a pET-19b vektorban az expresszálandó fehérje génjét. A fehérje N-terminális His<sub>10</sub>-tag jelöléssel fog termelődni. Az expresszáláshoz 50 mL LB tápoldatot (kiegészítve 30 µg mL<sup>-1</sup> klóramfenikol és 50 µg mL<sup>-1</sup> karbenicillin antibiotikummal) inokuláltunk és éjszakára 37 °C-on inkubáltuk. A fermentációhoz 500 mL LB tápoldatot oltottunk be 10 mL éjszakai sejt kultúrával. A sejteket 37 °C-on 180-200 rpm OD<sub>600</sub> = 0.6-0.7 növesztettük. A fehérje expresszálasát 0,1 mM IPTG-vel indukáltuk. A PpHAL, PpXAL és PpPAM esetében 28 °C-on és 6 h keresztül, PzaPAL esetében 25 °C-on és 16 h keresztül történt a fehérje termelés.

### 3.3.2. MIO-enzimek felhasználása biokonverziókban

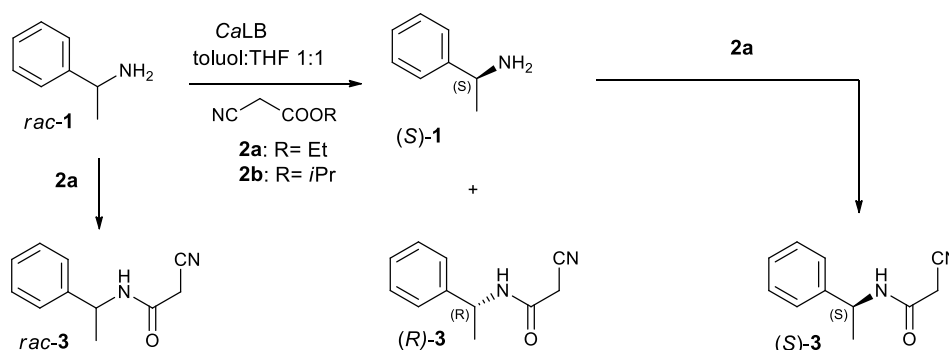
Vizsgáltuk a *Pfp*AM enzimet biokonverziós kísérletekben, 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  enzim jelenlétében 2,3-aminomutáz aktivitást vizsgálva 100 mM Tris pH= 8,5 pufferben a következő kiindulási szubsztrátokkal 2 mM L-fenilalanin (*S*)-**8a**, *rac*- $\alpha$ -fenilalanin *rac*-**8a**, *rac*- $\beta$ -fenilalanin *rac*-**9a**, illetve ammónia addíciós reakcióban 4 M ammónium-karbamát pH= 9,0 pufferben 2 mM fahéjsavból **10a** kiindulva. A reakciót 30 °C-on végeztük, mintákat 1, 3, 5, 18 és 24 h után vettünk.

Vizsgáltuk a *Pza*PAL és *Pc*PAL által katalizált 5 mM szubsztituált fenilalanin-származékok *rac*-**8a-s** kinetikus rezolválását 100 mM Tris pH= 8,5 pufferben 30 °C-on 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  enzim jelenlétében. Mintákat 17 és 168 h után vettünk. Vizsgáltuk a *Pza*PAL és *Pc*PAL által katalizált 5 mM szubsztituált fahéjsavszármazékok *rac*-**10a-s** sztereoselektív szintézissel megvalósuló ammónia addícióját (*Pza*PAL: 3 M ammónium-karbamát pH= 9,1 pufferben és *Pc*PAL: 6 M ammónia pH= 10,0) 30 °C-on 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  enzim jelenlétében. Mintákat 17 és 168 h után vettünk.

## 4. Eredmények

### 4.1. Potenciális tirozin kináz inhibitorokhoz *rac*-1-feniletilamin kinetikus rezolválása

Előállítottuk kemoenzimátikus rendszerben racém és enantiomertiszta formában a potenciális tirozin kináz inhibitorok savamid intermediérjét kémiai acilezéssel és lipáz katalizált kinetikus rezolválással (3. ábra).



3. ábra Kemoenzimátikus rendszerben előállított racém és enantiomertiszta savamidok *rac*-1-feniletilaminból *rac*-1

A hatékony rezolválás végrehajtásáért vizsgáltunk acilezőszer adagolási módokat. Az acilezőszer mennyiségének emelésével a képződő (*R*)-3 savamid enantiomertisztasága feltételezhetően romlani fog, mert a kinetikus rezolválás mellett a kémiai acilezés is zajlik. A megemelt mennyiségű acilezőszer azonban elősegíti, hogy a visszamaradó (*S*)-1 amin enantiomertisztasága magasabb legyen. A megnövelt acilezőszer mennyisége növeli a reakciósebességét és az egyensúlyt eltolja a termékképződés felé és az eddig el nem reagált (*R*)-1 amin is acileződni fog. Ezért három acilezőszer adagolási módszert hasonlítottunk össze. Az „A” eljárás: 0,5 ekvivalens acilezőszer, a „B” eljárás: 1 ekvivalens acilezőszer és a „C” eljárás: 0,5 ekvivalens acilezőszer kezdetben, majd 0,25 és 0,25 ekvivalens acilezőszer 2 h és 4 h után. A reakciókat 2, 4, 6 és 24 h után vizsgáltuk. Az acilezőszer adagolási módszerek eredményeit a 1. táblázat szemlélteti.

Acilezőszer adagolási mód	Reakció idő [h]	Konverzió [%]	$ee_{(R)-3}$ [%]	$ee_{(S)-1}$ [%]	$U_{\text{spec}}$ [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ]
„A” eljárás	2	26	99,9	35,9	9,10
	<b>4</b>	<b>29</b>	<b>99,9</b>	<b>40,4</b>	<b>4,96</b>
	6	30	99,9	41,8	3,38
	24	32	99,9	46,4	0,91
„B” eljárás	2	44	99,9	78,8	15,18
	4	48	99,3	90,1	8,19
	6	49	99,0	94,8	5,61
	24	50	98,2	98,5	1,44
„C” eljárás	2	27	99,9	37,5	9,40
	4	41	99,5	69,9	7,10
	6	47	99,1	89,1	5,44
	<b>24</b>	<b>50</b>	<b>98,9</b>	<b>99,3</b>	<b>1,44</b>

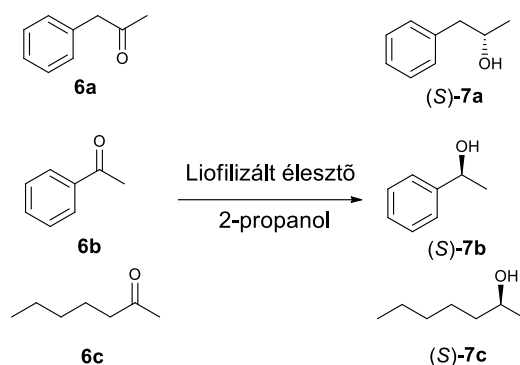
1. táblázat Acilezőszer adagolási módszerek a racém 1-feniletiamin *rac*-**1** kinetikus rezolválásában; A eljárás: 0,5 ekv. acilezőszer; B eljárás: 1 ekv. acilezőszer; C eljárás: adagolásos módszer [0,5 ekv +0,25 ekv. (2 h) +0,25 ekv. 4 h)]; félkövér: optimális eljárások

Az eredmények alapján az (*R*)-**3** savamid előállítására az „A” módszerrel (0,5 ekvivalens acilezőszer) bizonyult a legjobbnak 4 h reakcióidővel. Az eljárás során 29 %-os konverzióval és 99,9 %-os enantiomertisztasággal tudtuk előállítani az (*R*)-**3** savamidot, illetve a biokatalizátor specifikus aktivitása jobbanak bizonyult 4 h reakcióidőnél, mint 6 vagy 24 h reakcióidőnél. A hosszabb reakció idő nem növeli, olyan jelentősen a reakcióban képződő (*R*)-**3** savamid konverziós értéket. A visszamaradó (*S*)-**1** amint az adagolásos „C” módszerrel érdemes előállítani 24 h reakció idővel. A végső magas acilezőszer mennyisége miatt szinte minden (*R*)-**1** amin acileződik. A kezdeti 0,5 ekvivalens acilezőszer még nem segíti olyan, mértékben az (*S*)-**1** amin kémiai acilezését, így a reakcióban ennek az enantiomernek a mennyisége nem csökken olyan jelentősen, azonban az adagolás hatására az (*R*)-**1** amin szinte teljesen elreagál. Így az (*S*)-**1** amin 99,3 %-os enantiomertisztasággal és 41 %-os termeléssel nyertük ki a reakcióelegyből. A nagy enantiomertisztaságú (*S*)-**1** amint kémiailag acilezve etil-2-cianoacetáttal **2a** megkapjuk az (*S*)-**3** savamidot nagy enantiomertisztasággal.

#### 4.2. Egészsejtes élesztőkkel megvalósított sztereoselektív ketoredukciók

Az élesztőtörzseket fenilaceton **6a**, acetofenon **6b** és 2-heptanon **6c** tesztsubstrátokkal vizsgáltuk (4. ábra). Az élesztőkkel végrehajtott ketoredukciók optimalizálására  $2^{(5-2)}$  kísérlettervet használtunk, kiegészítő kísérlettervvel és 3 centrumpontri ismétléssel. Ebben az első körben kaptunk információt arról is, ha egy élesztő nem fogadja el valamelyik substrátot és nem képes katalizálni az alkohol előállítását. A kísérlettervek során az alábbi öt faktort vizsgáltuk: biokatalizátor mennyisége, a 2-propanol kosubsztrát mennyisége, a reakció puffer erőssége, a reakció hőmérséklete és a puffer pH-ja.





4. ábra Liofilizált élesztősejtekkel megvalósított sztereoselektív keton redukciónak

Az első körös vizsgálatokkal így megállapítottuk a WY4 törzsnél, hogy az acetofenont **6b** nem tudja átalakítani alkohollá, illetve a WY7 törzs csupán csak az alifás 2-heptanont **6c** fogadja el természetes szubsztrátjának. A többi élesztő szubsztrát párosnál elértünk olyan hatékony katalizist, hogy érdemben vizsgálni tudjuk a képződő alkohol enantiomertisztaságát és konverzióját. Kiemelendő, hogy 10 % konverzió felett a vizsgált összes élesztőtörzs enzimmészlete nagy szelektivitással tudja előállítani a képződő (S)-alkoholokat,  $ee_{(S)-7a-c} > 99,5\%$ , mely kiváló eredménynek mondható. Az eredmények kiértékelésekor vizsgáltuk, hogy mely faktoroknak van szignifikáns hatása a reakció konverziós értékére. Az első körös kiértékelés során nyert információkból egy újabb kísérlettervet állítottunk össze, azonban itt már csak a szignifikáns hatásokhoz tartozó faktorok reakció beállításait vizsgáltuk, illetve módosítottuk annak fényében, hogy növekvő konverziós értékeket érjünk el. Az optimalizált reakcióparamétereket a 2. táblázat tartalmazza.

Élesztőtörzs	Szubsztrát	Reakció paraméter				Konverzió [%]
		Liofilizált élesztő [mg mL <sup>-1</sup> ]	Koszubsztrát [V/V%]	Hőmérséklet [°C]	pH [-]	
WY1	<b>6a</b>	40	3	35	7	97
	<b>6b</b>	40	4	30	7	83
	<b>6c</b>	40	4	30	7	84
WY2	<b>6a</b>	30	4	30	8	74
	<b>6b</b>	30	2	30	7	38
	<b>6c</b>	30	4	30	8	75
WY4	<b>6a</b>	40	8	30	7	81
	<b>6c</b>	40	8	30	7	83
WY7	<b>6c</b>	30	4	30	8	26
WY11	<b>6a</b>	30	4	27	7	68
	<b>6b</b>	30	2	27	7	35
	<b>6c</b>	30	8	30	7	84
WY12	<b>6a</b>	20	3	35	7	97
	<b>6b</b>	20	4	30	7	82
	<b>6c</b>	20	4	35	7	83

2. táblázat A ketoreduktáz aktivitású élesztőtörzsek faktoriális kísérlettervvel megállapított reakció beállítási paraméterei az optimumban; \* a puffer erősséget 64 mM állítottuk be

### 4.3. MIO-enzimek azonosítása

A MIO-enzimeket szekvencia adatbázisokban pBLAST (lokális szekvencia hasonlóság) funkcióval kerestünk, ez lehetőséget ad arra, hogy az adatbázisokból kiválasszuk azokat a fehérje szekvenciákat, melyek potenciálisan aromás aminosav ammónia-liázok vagy aromás aminosav 2,3-aminomutázok. A legnagyobb biztonsággal MIO-enzimekre találatokat a MIO katalitikus csoport kialakulása környéki szekvencia részlet a legmegfelelőbb. Ez a szekvencia részlet rendelkezik az egyik legnagyobb hasonlósággal a MIO-enzimek között. Az ASG aminosav hármából autokatalitikusan képződő MIO-csoport és a környéki nagyjából 10 aminosav hosszúságú szekvencia minden MIO-enzimben kb. 80-90 % hasonlósággal megtalálható (5. ábra narancssárga jelölés). A szekvencia összerendezésben a 137-138 pozíció tartalmazza azokat az aminosavakat, melyek befolyásolják, hogy az adott ammónia-liáz, melyik természetes aromás aminosav szubsztrátot fogja elfogadni. A PAL enzimekre jellemző az FL motívum (5. ábra világos kék jelölés), a TAL enzimekre a HL/HQL motívum (5. ábra sötét zöld jelölés), míg a HAL enzimekre az SH motívum (5. ábra türkiz jelölés). Ezek alapján feltételeztük, hogy a SH motívumot tartalmazó enzim szekvencia egy HAL enzimé lesz. Ellenőrzésként a *Pp*HAL szekvenciájával 84 % szekvenciaazonosságot mutat, ami megerősíti ezt a feltevésünket. A *Pf*XAL enzimmél FH motívumot fedeztünk fel a 137-138-as pozíciónál, mely mind a PAL és TAL illetve a HAL enzimekre is jellemző, így elképzelhetőnek tartottuk, hogy ez az enzim potenciálisan mind az L-fenilalanin, az L-tirozin és az L-hisztidin aromás aminosavakat elfogadja természetes szubsztrátjának és katalizálja az ammónia eliminációjukat. Legjobb tudomásunk szerint ez volt az első eset, hogy egy organizmusban három MIO-enzimet is azonosítottak.

	109	130		200	348	486
<i>Pc</i> PAL	SYGVT	LQKELIRFLNAGIFGN	-----DNTL	ITASGDLVPL	QDRYALRTSPQ	HNQD
<i>At</i> PAL	SYGVT	LQKELIRFLNAGIFG	-----T-SHTL	ITASGDLVPL	QDRYALRTSPQ	HNQD
<i>Sb</i> PAL	IYGVT	LQVELLRHLNAGIFG	-----GHTL	ITASGDLVPL	QDRYALRTSPQ	HNQD
<i>Pza</i> PAL	IYGIN	LQLALLQMQCGVLP	-----FPTGEPSSAPFALPLTDTETSLVM	ISASGDLSP	QDRYTLRTASQ	ANQA
<i>Um</i> PAL	IYGIN	LQLALLQMQCGVLP	-----FPTGEPSSAPFALPLTDESSLIM	ISASGDLSP	QDRYTLRTASQ	ANQA
<i>Rx</i> PAL	IYGVT	LQKNILRFLGNGI	-----GPLA	CGASGDLVPL	QDKYSIRCAPH	HNQD
<i>Av</i> PAL	IYGVT	LQTNLVWFLKTGA	-----GNKL	IGASGDLVPL	QDRYSLRCLPQ	FNQN
<i>Pf</i> XAL	IYGVT	LPRHLYTFHGCGL	-----GKLL	VGASGDLTPL	QDRYSLRCLPQ	FNQN
<i>Rst</i> TAL	VYGLT	LQANLVHHLASGV	-----GPVL	VGASGDLTPL	QDAYSLRCAPQ	ANQD
<i>Rt</i> TAL	VYGVT	LQKALLEHQLCGVLP	-----SSFDSEFRLGR-----GLENSL	ISASGDLSP	QDRYPLRTSPQ	ANQA
<i>Pp</i> HAL	AYGIN	LQRSVLVLSHAAGI	-----GAPL	VGASGDLAPL	QDPYSLRCQPQ	ANQE
<i>Pf</i> HAL	AYGIN	LQRSVLVLSHAAGV	-----GQPI	VGASGDLAPL	QDPYSLRCQPQ	ANQE
<i>Pa</i> PAM	IYGVN	LQNNLINAVATNV	-----GKYF	LGESGDLGPL	EDAYSIRCTPQ	DFQD
<i>Pf</i> PAM	IYGVN	LQSNLIQGVSTNV	-----AERF	LGESGDLGPL	EDAYSIRCTPQ	DFQD
<i>Tc</i> PAM	IYGVT	LQESLIRCLLAGVFT	-----GCA-----SSVDEL	VSASGDLIPL	QDRYALRSSPQ	HNQD
<i>Cc</i> TAM	IYGVN	LQENLIRSHAAGG	-----GEPF	LGASGDLSP	QDAYTLRAVPQ	SNQD
<i>Sg</i> TAM	IYGVN	LQTNLVRSHSAGV	-----GPLF	LGASGDLAPL	QKAYSLRAIPQ	DNQD

5. ábra MIO-enzimek többszörös szekvencia illesztése a szubsztrátkötőhely és a katalitikus aktivitásért felelős szekvenciaregionoknál; piros: katalitikus tirozin; sötét kék: aromás kötőhely konzervált részei; világos kék: PAL-okra jellemző aromás kötőhely; sötét zöld: TAL-okra jellemző aromás kötőhely; türkiz: HAL-okra jellemző aromás kötőhely; narancssárga: MIO katalitikus csoport; narancs türkizzel: bakteriális PAM MIO katalitikus csoport; világos zöld: MIO-csoport stabilizáló tirozin; sárga: szubsztrát karboxilosortját kötő arginin; lila: PAM aktivitásért felelős fenilalanin

Vizsgáltuk az újonnan előállított enzimek szubsztrát elfogadását ammóniaeliminációs reakciókban természetes L-aminosavakkal. Az aromás kötőhely azonosított aminosavai és a predikciókat figyelembevéve végeztük a kísérleteket. Az alábbi L-aminosavakkal teszteltük az enzimeket: L-fenilalanin, L-tirozin, L-hisztidin, L-triptofán, L-aszparagin, L-aszparaginsav, és L-glutamin. A vizsgált enzimek a vártnak megfelelően nem fogadták el a nem aromás aminosavakat szubsztrátként és az L-triptofánt sem, itt feltehetően a szubsztrát heteroaromás gyűrűje túl nagy ahhoz, hogy az elférjen a kötőhelyen. A *Pf*HAL csupán az L-hisztidint fogadta el szubsztrátnak, mint ahogyan az a HAL enzimekre jellemző, nagyon specifikusak a szubsztrátra. A *Pf*XAL a várakozásainknak megfelelően elfogadta L-fenilalanin, L-tirozin, L-hisztidin szubsztrátokat az előbbi sorrendnek megfelelően csökkenő aktivitással. A *Pza*PAL az L-fenilalanin ammónia eliminációját katalizálta nagy aktivitással, az L-hisztidint és L-tirozin nem fogadta el természetes szubsztrátjának. Így a predikcióink helytállóak voltak, és helyesen következtettünk a szekvencia motívumok alapján a megfelelő enzimekre.

#### 4.4. MIO-enzimek használata biokonverziókban

A *Pf*PAM katalizálta reakciókban vizsgáltuk az  $\alpha$ - és  $\beta$ -fenilalanin izomerizációját. Az enzimet természetes szubsztrátjával L- $\alpha$ -fenilalaninnal (*S*)-**8a** vizsgálva megállapítottuk, hogy az enzim teljesen szelektíven az enantiomertiszta (*S*)- $\beta$ -fenilalanin (*S*)-**9a** képződését katalizálja, a másik enantiomer (*R*)-**9a** egyáltalán nem jelenik meg a reakcióban. Így kijelenthetjük, hogy a *Pf*PAM (*S*)-szelektív 2,3-aminomutáz aktivitással rendelkezik az L- $\alpha$ -fenilalanin szubsztrátra nézve. Az idő előrehaladtával jelentős liázaktivitás is észlelhető az enzimmél, melyre a megnövekedett fahéjsav **10a** jelenlétéből következtethetünk. A reakcióban képződő (*S*)-**9a** aránya az egyensúlyi reakció során 52,5-55,0% között találtuk (3. táblázat 1. sor). A *rac*-**8a** kinetikus rezolválásában is csupán (*S*)-**9a** keletkezik, azonban az el nem reagáló (*R*)-**8a** miatt alacsonyabb az aránya a reakcióelegyben. A *rac*-**8a** kinetikus rezolválása során jelentősebben visszaszorult a *Pf*PAM ammónialiáz-aktivitása az izomerizációs reakció mellett. Az egyensúlyi reakcióelegyben csupán 4% volt a fahéjsav **10a** mennyisége, az előbbi 20%-hoz képest. Tehát az (*R*)-**8a** inhibitorként viselkedik, beköt az aktív centrumba, azonban az enzim sem liáz, sem mutáz aktivitással nincsen irányába (3. táblázat 2. sor). A *rac*- $\beta$ -fenilalaninból *rac*-**9a** kiindulva lassabban keletkezik az (*S*)-**8a**, így a *Pf*PAM enzim liáz aktivitása is alacsonyabb, 24 h után a reakcióelegy csupán 1%-a tartalmazott fahéjsavat **10a** (3. táblázat 3. sor). A *Pf*PAM enzimet vizsgáltuk addíciós reakcióban, fahéjsavból **10a** kiindulva ammóniás közegben az először képződő (*S*)-**8a** termék utána nagyobb aktivitással tovább alakul (*S*)-**9a** terméké (3. táblázat 4. sor). Az eredmények alapján azt állapítottuk meg, hogy a *Pf*PAM a tisztán (*S*)-aminomutáz szelektivitás mellett rendelkezik liázaktivitással is, melyet ki lehet használni addíciós reakciók során is, így enantiomertiszta (*S*)-**8a** és (*S*)-**9a** termékeket állíthatunk elő.

Sorszám	Szubsztrát	Reakció idő [h]	<b>9a</b> [%]	<b>8a</b> [%]	<b>10a</b> [%]
1	<b>(S)-8a</b>	1	52,5	36,9	10,6
		3	53,7	31,9	14,4
		5	54,8	30,5	14,7
		18	56,9	24,1	19,0
		24	55,0	25,0	20,0
2	<b>rac-8a</b>	1	19,0	80,1	0,9
		3	24,1	74,3	1,6
		5	26,2	71,3	2,3
		18	28,0	68,0	4,0
		24	27,8	68,2	4,0
3	<b>rac-9a</b>	1	91,6	7,9	0,5
		3	89,7	9,5	0,8
		5	87,9	11,3	0,8
		18	87,4	11,7	0,9
		24	87,2	11,8	1,0
4	<b>10a</b>	1	4,7	3,1	92,2
		3	8,1	5,7	86,2
		5	13,6	9,2	77,2
		18	31,0	23,3	45,7
		24	33,1	24,8	42,1

3. táblázat A PfpAM katalizált biokonverziók (S)-fenilalanin izomerizációja, rac- $\alpha$ -fenilalanin kinetikus rezolválása, rac- $\beta$ -fenilalanin kinetikus rezolválása és fahéjsav sztereoselektív ammóniaaddíciója

A PzaPAL enzimet vizsgáltuk kinetikus rezolválásban szubsztituált racém  $\alpha$ -fenilalanin származékokkal **rac-8a-s**, melynek eredményeit a 4. táblázat A panel szemlélteti. A vizsgálataink kiterjedtek az aromás gyűrűn mindhárom pozícióban (orto, meta, para) szubsztituált aminosav-származékokra: fluor **8b-d**, klór **8e-g**, nitro **8h-j**, bróm **8k-m**, metil **8n-p** és metoxi **8q-s**. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a PzaPAL enzim magas enantiomer szelektivitással rendelkezik a legtöbb szubsztituált (S)-fenilalanin-származékkal szemben, csupán az orto és para helyzetű nitroszármazék **rac-8h,j** és a para helyzetű brómszármazéknál **rac-8m** jelentkezik, hogy az enzim katalizálja az ammónia-eliminációt az (R)-enantiomerről is. Az eredményekből jól látszódik, hogy a PcPAL már a rövidebb reakció idő alatt is katalizálja az ammónia-eliminációt az (R)-enantiomerről, a visszamaradó (R)-**8a-p,r** enantiomertisztán maradnak a reakcióban. Feltehetően az aktív centrumban helyet foglaló aszparagin és metionin aminosavak (QMQQ motívum) is felelősek lehetnek a PzaPAL nagyobb enantiomerszelektivitásáért. Az elektronküldő csoportokkal (metil és metoxi) rendelkező származékok esetén a kinetikus rezolválás gyengén vagy egyáltalán nem megvalósítható a PzaPAL enzimmal.

A PzaPAL enzimmal megvalósítottuk a szubsztituált aril-akrilátok **10a-s** szelektív ammóniaaddícióját, melynek eredményeit a 4. táblázat B panel szemlélteti. Vizsgáltuk az PzaPAL enzim enantiomer szelektivitását és a reakcióban előállított  $\alpha$ -aminosav konverziós

értékét. A vizsgálatok alapján megállapíthatjuk, hogy a *Pza*PAL enzimnek a fluor szubsztituált akrilátokból **10b-d** szelektívebben állítja elő az L-fenilalanin-származékot (*S*)-**8b-d**, mint a *Pc*PAL enzim. Az orto és para helyzetben szubsztituált klór- és a nitroakrilát-származékokkal *Pza*PAL ugyancsak magasabb enantiomertisztaságban állítja elő az L-fenilalanin-származékot (*S*)-**e,g,h,j** mint a *Pc*PAL enzim. A bróm-, metil- és metoxiszármazékokkal a *Pc*PAL enzim mutat sokkal jobb aktivitást és szelektivitást a sztereoszelektív szintézisben. A *Pza*PAL érdemi aktivitást csupán az orto-bróm- (*S*)-**8k** és az orto-metilszármazék (*S*)-**8n** előállításában mutatott, azonban ezt teljesen enantioszelektíven katalizálta.

A					B				
Subsztrát	17 h reakció idő		168 h reakció idő		Subsztrát	17 h reakció idő		168 h reakció idő	
	<i>Pza</i> PAL Konverzió ( <i>ee</i> ( <i>R</i> )- <b>8a-s</b> ) [%]	<i>Pc</i> PAL Konverzió ( <i>ee</i> ( <i>R</i> )- <b>8a-s</b> ) [%]	<i>Pza</i> PAL Konverzió ( <i>ee</i> ( <i>R</i> )- <b>8a-s</b> ) [%]	<i>Pc</i> PAL Konverzió ( <i>ee</i> ( <i>R</i> )- <b>8a-s</b> ) [%]		<i>Pza</i> PAL Konverzió ( <i>ee</i> ( <i>R</i> )- <b>8a-s</b> ) [%]	<i>Pc</i> PAL Konverzió ( <i>ee</i> ( <i>R</i> )- <b>8a-s</b> ) [%]	<i>Pza</i> PAL Konverzió ( <i>ee</i> ( <i>R</i> )- <b>8a-s</b> ) [%]	<i>Pc</i> PAL Konverzió ( <i>ee</i> ( <i>R</i> )- <b>8a-s</b> ) [%]
<i>rac</i> - <b>8a</b>	49 (>99)	49 (>99)	49 (>99)	<b>54</b> (>99)	<i>rac</i> - <b>8a</b>	49 (>99)	49 (>99)	49 (>99)	<b>54</b> (>99)
<i>rac</i> - <b>8b</b>	49 (>99)	52 (>99)	53 (>99)	<b>69</b> (>99)	<i>rac</i> - <b>8b</b>	49 (>99)	52 (>99)	53 (>99)	<b>69</b> (>99)
<i>rac</i> - <b>8c</b>	49 (>99)	52 (>99)	52 (>99)	<b>63</b> (>99)	<i>rac</i> - <b>8c</b>	49 (>99)	52 (>99)	52 (>99)	<b>63</b> (>99)
<i>rac</i> - <b>8d</b>	51 (>99)	<b>54</b> (>99)	51 (>99)	<b>59</b> (>99)	<i>rac</i> - <b>8d</b>	51 (>99)	<b>54</b> (>99)	51 (>99)	<b>59</b> (>99)
<i>rac</i> - <b>8e</b>	48 (98)	49 (>99)	50 (>99)	<b>64</b> (>99)	<i>rac</i> - <b>8e</b>	48 (98)	49 (>99)	50 (>99)	<b>64</b> (>99)
<i>rac</i> - <b>8f</b>	47 (88)	51 (>99)	50 (>99)	<b>61</b> (>99)	<i>rac</i> - <b>8f</b>	47 (88)	51 (>99)	50 (>99)	<b>61</b> (>99)
<i>rac</i> - <b>8g</b>	44 (82)	<b>53</b> (>99)	50 (>99)	<b>64</b> (>99)	<i>rac</i> - <b>8g</b>	44 (82)	<b>53</b> (>99)	50 (>99)	<b>64</b> (>99)
<i>rac</i> - <b>8h</b>	<b>35</b> (43)	<b>67</b> (>99)	<b>62</b> (>99)	<b>82</b> (>99)	<i>rac</i> - <b>8h</b>	<b>35</b> (43)	<b>67</b> (>99)	<b>62</b> (>99)	<b>82</b> (>99)
<i>rac</i> - <b>8i</b>	21 (26)	<b>63</b> (>99)	40 (64)	<b>91</b> (>99)	<i>rac</i> - <b>8i</b>	21 (26)	<b>63</b> (>99)	40 (64)	<b>91</b> (>99)
<i>rac</i> - <b>8j</b>	<b>56</b> (88)	<b>96</b> (>99)	<b>78</b> (94)	<b>99</b> (94)	<i>rac</i> - <b>8j</b>	<b>56</b> (88)	<b>96</b> (>99)	<b>78</b> (94)	<b>99</b> (94)
<i>rac</i> - <b>8k</b>	43 (79)	49 (>99)	49 (99)	<b>58</b> (>99)	<i>rac</i> - <b>8k</b>	43 (79)	49 (>99)	49 (99)	<b>58</b> (>99)
<i>rac</i> - <b>8l</b>	29 (39)	50 (>99)	47 (87)	<b>60</b> (>99)	<i>rac</i> - <b>8l</b>	29 (39)	50 (>99)	47 (87)	<b>60</b> (>99)
<i>rac</i> - <b>8m</b>	<b>18</b> (17)	50 (>99)	38 (58)	<b>53</b> (>99)	<i>rac</i> - <b>8m</b>	<b>18</b> (17)	50 (>99)	38 (58)	<b>53</b> (>99)
<i>rac</i> - <b>8n</b>	50 (>99)	49 (>99)	50 (>99)	<b>52</b> (>99)	<i>rac</i> - <b>8n</b>	50 (>99)	49 (>99)	50 (>99)	<b>52</b> (>99)
<i>rac</i> - <b>8o</b>	10 (12)	29 (45)	18 (23)	48 (>99)	<i>rac</i> - <b>8o</b>	10 (12)	29 (45)	18 (23)	48 (>99)
<i>rac</i> - <b>8p</b>	1 (94)	47 (94)	6 (7)	48 (>99)	<i>rac</i> - <b>8p</b>	1 (94)	47 (94)	6 (7)	48 (>99)
<i>rac</i> - <b>8q</b>	0 (94)	<b>7</b> (6)	0 (94)	<b>25</b> (30)	<i>rac</i> - <b>8q</b>	0 (94)	<b>7</b> (6)	0 (94)	<b>25</b> (30)
<i>rac</i> - <b>8r</b>	20 (25)	48 (>99)	35 (53)	51 (>99)	<i>rac</i> - <b>8r</b>	20 (25)	48 (>99)	35 (53)	51 (>99)
<i>rac</i> - <b>8s</b>	0 (94)	<b>22</b> (25)	0 (94)	<b>37</b> (57)	<i>rac</i> - <b>8s</b>	0 (94)	<b>22</b> (25)	0 (94)	<b>37</b> (57)

4. táblázat *Pza*PAL és *Pc*PAL enzimekkel megvalósított kinetikus rezolválás (A) és sztereoszelektív szintézis (B) nagy enantiomertisztaságú szubsztituált  $\alpha$ -fenilalanin-származékok előállítására

A *Pza*PAL és a *Pc*PAL enzimek összességében jó lehetőséget nyújtanak az aromás gyűrűn szubsztituált aminosav-származékok előállítására nagy enantiomertisztaságban. A kinetikus rezolválásban a racém fenilalanin-származékokból kiindulva az (*R*)-aminosav-származék marad vissza nagy enantiomertisztaságban. A sztereoszelektív szintézis során szubsztituált akrilát-származékból kiindulva ammóniaaddícióval lehet előállítani az (*S*)-aminosav-származékokat nagy enantiomertisztaságban.

## 5. Tézisek

- Megvalósítottam *Candida antarctica* B lipáz enzimkészítménnyel a *rac*-1-feniletilamin kinetikus rezolválását etil-2-cianoacetát acilezőszerrel. A kinetikus rezolválásban termékként keletkező (*R*)-2-ciano-*N*-1-feniletil-acetamid és a visszamaradó (*S*)-1-feniletilamin kémiai acilezésével keletkező (*S*)-2-ciano-*N*-1-feniletil-acetamidot nagy enantiomertisztasággal tudtam előállítani, melyek királis alapmolekulákként funkcionálnak további szintézisekhez. (I.)
- Ortogonalis kísérlettervezési módszert dolgoztam ki alifás és aromás ketonok liofilizált egészsejtes élesztőtörzsekkel (*Pichia carsonii*, *Lodderomyces elongisporus*, *Candida*

*norvegica*, *Candida guilliermondi*, *Debaromyces fabryi* és *Candida parapsilosis*) 2-propanol koszubsztrát felhasználásával megvalósítható, (S)-alkoholok sztereoszelektív előállítására alkalmas bioredukciójának optimalizálására. A kiválasztott (S)-alkoholokat a liofilizált egészséjtes biokatalizátorokkal magas konverzióval és kiváló enantiomertisztsággal tudtam előállítani.(IV.) A *Debaromyces fabryi* élesztővel az (S)-1-fenilpropán-2-ol és az (S)-heptán-2-ol előállítását preparatív léptékben is megvalósítottam. (IV.)

3. A *Pseudomonas fluorescens* R124 baktérium törzsben hasonlóság alapú aminosav szekvenciakereséssel azonosítottam három MIO-enzimet. Legjobb tudásunk szerint ez az első olyan organizmus, mely három MIO-enzimet is tartalmaz. (II.) Javaslatot tettem az új enzimek aromás aminosav kötőhelyén levő aminosavak előfordulása alapján a funkciójukra, ezáltal az enzimosztályba való sorolásukra. Az előállított enzimekkel kísérletesen is bizonyítottam a természetes szubsztrát elfogadásukat, így azonosítottam egy hisztidin ammónia-liázt (*PfHAL*), egy fenilalanin/tirozin/hisztidin ammónia-liázt (*PfXAL*), és egy fenilalanin 2,3-aminomutázt (*PfPAM*). (II)
4. Felfedeztem az első olyan MIO-enzimet (*PfXAL*), mely az ammóniaeliminációs reakciót három természetes aromás aminosavból (L-fenilalanin, L-tirozin és L-hisztidin) is képes katalizálni. Ezzel javaslatot tettem egy új, fenilalanin/tirozin/hisztidin ammónia-liáz enzimosztály létrehozására. (II.)
5. Bizonyítottam a *PfPAM* (S)-szelektív 2,3-aminomutáz aktivitását. Az enzim L-fenilalanin izomerizációs reakciójával lehetővé teszi enantiomertiszta (S)- $\beta$ -fenilalanin előállítását. Megmutattam, hogy a *PfPAM* alkalmazható racém  $\beta$ -fenilalanin kinetikus rezolválásával nagy enantiomertisztságú (R)- $\beta$ -fenilalanin előállításra. (II.)
6. A *Pseudozyma (Candida) antarctica* pszichrofil élesztőtörzsben hasonlóság alapú aminosav szekvencia kereséssel azonosítottam egy fenilalanin ammónia-liázt (*PzaPAL*). (III) Megmutattuk, hogy az előállított *PzaPAL* felhasználható – a *Petroselinum crispum* (*PcPAL*) enzimmal kiegészítve – számos, az aromás gyűrűn orto, meta vagy para helyzetben fluor-, klór-, bróm-, nitro-, metoxi- és metilszubsztituenszt tartalmazó racém fenilalanin-származék kinetikus rezolválására, és ezzel a D-fenilalanin-származék, mint a nem reagáló enantiomer tiszta előállítására. Emellett kimutattuk azt is, hogy a *PzaPAL* – a *PcPAL* enzimmal kiegészítve – ammónia gazdag környezetben, sztereoszelektíven katalizálja az ammóniaaddíciós reakciót az aromás gyűrűn orto, meta vagy para helyzetben fluor-, klór-, bróm-, nitro-, metoxi- és metilcsoporttal szubsztituált fenilakrilát származékokra, és így alkalmazható az L-fenilalanin-származékok nagy enantiomertisztsággal történő előállítására. (III)

## 6. Alkalmazási lehetőség

Egészsejtes élesztőkkel nagy enantiomertisztaságú alkoholokat és alkoholszármazékokat lehet előállítani hatékonyan ketonokból. Az egészsejtes élesztők könnyen megvalósítható kofaktorregenerálási technológiát tesznek lehetővé. Összességében a vad típusú élesztőtörzsekkel gazdaságosan és hatékonyan lehet megvalósítani nagy enantiomertisztaságú alkoholok előállítását.

Az aromás aminosav ammónia-liáz és 2,3-aminomutáz (MIO-enzimek) enzimekkel nagy enantiomertisztaságú aminosavak és aminosav-származékok állíthatók elő. Az enzimeket kinetikus rezolválásra, sztereoszelektív szintézisre és izomerizációs reakciók végrehajtására lehet felhasználni. Az előállított enantiomertiszta termékek értékes vegyipari alapanyagokként szolgálnak, akár hatóanyag fejlesztéshez a gyógyszeripar számára.

## 7. Közlemények

*Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:*

- I. P. Csuka, Z. Boros, L. Örfi, J. Dobos, L. Poppe, G. Hornyánszky: Chemoenzymatic route to Tyrphostins involving lipase-catalyzed kinetic resolution of 1-phenylethylamine with alkyl cyanoacetates as novel acylating agents *Tetrahedron: Asymmetry*, **2015**, 26(12-13), 644-649. DOI: 10.1016/j.tetasy.2015.04.013 (95%, IF: 2,1, idéző: 7(4/3))
- II. P. Csuka, V. Juhász, S. Kohári, A. Filip, A. Varga, P. Sátorhelyi, L.C. Bencze, H. Barton, C. Paizs, L. Poppe: *Pseudomonas fluorescens* Strain R124 Encodes Three Different MIO Enzymes *ChemBioChem*, **2018**, 19(4), 411-418. DOI: 10.1002/cbic.201700530 (75%, IF: 2,6, idéző: 5(4/1))
- III. A. Varga, P. Csuka, O. Sonesouphap, G. Bánóczi, M.I. Tosa, G. Katona, Z. Molnár, L.C. Bencze, L. Poppe, C. Paizs: A novel phenylalanine ammonia-lyase from *Pseudozyma antarctica* for stereoselective biotransformations of unnatural amino acids *Catal Today*, **2021**, 366, 185-194. DOI: 10.1016/j.cattod.2020.04.002 (80%, IF: 5,8, idéző: 2 (1/1))
- IV. P. Csuka, L. Nagy-Győr, Z. Molnár, C. Paizs, V. Bódai, L. Poppe: Characterization of yeast strains with ketoreductase activity for bioreduction of ketones *Period. Polytech. Chem. Eng.* **2021**, DOI: 10.3311/PPch.17429 Elfogadva (80%; IF: 1,6)

*Egyéb közlemények:*

- V. Varga, Z. Bata, P. Csuka, D.M. Bordea, B.G. Vértessy, A. Marcovici, D.F. Irimie, L. Poppe, L.C. Bencze: A Novel Phenylalanine Ammonia-Lyase from *Kangiella Koreensis* *Studia UBB Chemia*, **2017**, 3, 293-308. DOI: 10.24193/subbchem.2017.3.25 (10%, IF: 0,3)
- VI. L. Nagy-Győr, M. Lacatus, D. Balogh-Weiser, P. Csuka, V. Bódai, B. Erdélyi, Z. Molnár, G. Hornyánszky, C. Paizs, L. Poppe: How to Turn Yeast Cells into a Sustainable and Switchable Biocatalyst? On-Demand Catalysis of Ketone Bioreduction or Acyloin Condensation *ACS Sustainable Chem Eng*, **2019**, 7, 19375-19383. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b03367 (20%, IF:7,6)

*Előadás:*

P. Csuka, V. Juhász, A. Filip, A. Varga, S. Kohári, P. Sátorhelyi, L.C. Bencze, C. Paizs, L. Poppe: *Pseudomonas fluorescens* encodes three MIO-enzyme *Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája (FIBOK) 2018. március 28-29.* Budapest, Magyarország

*Poszterek:*

P. Csuka, L. Nagy-Győr, Z. Boros, C. Paizs, B. Erdélyi, V. Bódai, L. Poppe: Whole-cell ketoreductases for stereoselective bioreduction of ketones *Training School SysBiocat, 2016. április 27-30.* Certosa di Pontignano, Siena, Olaszország

P. Csuka, V. Juhász, A. Filip, A. Varga, S. Kohári, P. Sátorhelyi, L.C. Bencze, C. Paizs, L. Poppe: *Pseudomonas fluorescens* encodes three MIO-enzyme *BioTrans, 13th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformation 2017. július 9-13.* Budapest, Magyarország

P. Csuka, K. Gyulai, E. Sánta-Bell, D. Balogh-Weiser, L. Poppe: Immobilization studies on aromatic ammonia-lyase from *Pseudomonas fluorescens*, *BioTrans, 14th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformation 2019. július 7-11.* Gröningen, Hollandia