

Ph.D. dolgozat

**BIOKATALIZÁTOROK ÉS BIOKATALITIKUS FOLYAMATOK
VIZSGÁLATA ÉS SZINTETIKUS ALKALMAZÁSA**

BÓDAI VIKTÓRIA

TÉMAVEZETOK:

Dr. Poppe László (Szerves Kémia Tanszék)

Dr. Szakács György (Mezogazdasági Kémiai Technológia Tanszék)

BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM

SZERVES KÉMIA TANSZÉK

MEZOGAZDASÁGI KÉMIAI TECHNOLÓGIA TANSZÉK

BUDAPEST, 2003

TARTALOM JEGYZÉK

1. Bevezetés	4
2. Biokatalizátorok előállítása	6
2.1. Biokatalizátorok irodalma	7
2.1.1. Enzimek, mint biokatalizátorok	7
2.1.2. Hidrolázok, lipázok	10
2.1.3. Mikrobiális eredetű lipáz enzimek	11
2.1.4. Szilárd fázisú fermentáció	12
2.2. Anyagok és módszerek	13
2.2.1. Mikroorganizmusok eredete, törzsfenntartás	13
2.2.2. Rázott lombikos fermentáció	13
Rázott lombikos táptalajok	13
2.2.3. Szilárd fázisú fermentáció	14
Szilárd fázisú fermentációs táptalajok	14
2.2.4. Enzimaktivitás mérés	14
2.2.5. Száritott enzimmészítmény előállítása	15
2.3. Termofil fonalgombákkal végzett fermentációk eredményei	16
2.3.1. Rázott lombikos fermentáció	16
2.3.2. Szilárd fázisú fermentáció	22
2.4. Irodalom	25
3. Biokatalizátorok tesztelése szerves kémiai szintézisekben	28
3.1. Biokatalizátorok, biokatalízis	29
3.2. A biokatalízis alkalmazása sztereoselektív átalakításokra	29
3.2.1. Enantiotóp szelektív biotranszformációk általános jellemzése	31
3.2.2. Enantiomer szelektív biotranszformációk általános jellemzése	32
3.2.2.1. Az enzimműködés kinetikus rezolválás reakciókinetikája	32
3.2.3. Lipázok hatásmechanizmusa	34
3.3. Vizsgált enantiotóp szelektív biotranszformációk	36
3.3.1. A 2-aciloxi-1,3-propándiolok előállítása és enzimes acilezése	36
3.3.1.1. Eloszmények	36
3.3.1.2. A 2-es helyzetben aciloxi-szubsztituált 1,3-propándiolok előállítása és enzimes átalakítása	38
3.3.1.2.1. A 2-aciloxi-1,3-propándiolok előállítása	39
3.3.1.2.2. A 2-benzoiloxipropán-1,3-diol enzim katalizált acilezése	40
3.3.1.2.3. A 2-aciloxipropán-1,3-diolok enzimműködés katalizált acilezése	42
3.4. Vizsgált enantiomer szelektív reakciók	44
3.4.1. A <i>transz</i> -2-acetoxicikloalkán-1-ol enzimes acilezése	44
3.4.1.1. Eloszmények	44
3.4.1.2. <i>transz</i> -2-acetoxi-cikloalkán-1-olokkal végzett kísérletek	46
3.4.1.2.1. A racém <i>transz</i> -2-acetoxicikloalkán-1-olok enzimműködés katalizált acilezése	46
3.4.1.2.2. A racém <i>transz</i> -2-acetoxicikloalkán-1-olok Lipase AK-val katalizált acilezése és hidrolízise	50
3.4.1.2.3. A racém <i>transz</i> -2-acetoxiciklohexán-1-ollal végzett extrakciós kísérletek	50
3.4.2. Az 1-feniletanol enzimes acilezése	51
3.4.3. A glicerín-karbonát enzimes reakciói	54
3.4.3.1. Eloszmények	54
3.4.3.2. A glicerín-karbonát enzimes acilezése	54
3.4.3.2.1. A glicerín-karbonát enzimes acilezésének oldószerfüggése	56
3.4.3.2.2. A glicerín-karbonát enzimes acilezése szilárd fázisú fermentációval előállított készítményekkel	57
3.4.3.2.3. A glicerín-karbonát-acetát enzimes hidrolízise/alkoholízise	58
3.4.4. Heterociklusos alkoholok enzimes reakciói	58
3.4.4.1. Az 1-(benzofurán-2-il)etanol enzimes acilezése	59
3.4.4.1.1. Eloszmények	59
3.4.4.1.2. Az 1-(benzofurán-2-il)etanol enzim katalizált átalakítása	59
3.4.4.2. Az 1-(benzotiazol-2-il)etanol enzimműködés katalizált acilezése	63
3.4.4.2.1. Az 1-(benzotiazol-2-il)etanol enzimes átalakítása	63

3.4.5. A racém 3-klórpropán-1,2-diol enzimes kinetikus rezolválhatóságának vizsgálata	67
3.4.6. A BUTE-3A, BUTE-3B enzimkészítményekkel katalizált folyamatok	68
3.5. Kísérleti rész	70
3.5.1. Felhasznált eszközök	70
3.5.2. Felhasznált anyagok	70
3.5.3. Módszerek	70
3.5.4. Szintetikus eljárások	71
3.6. Irodalom	80
4. Összefoglalás	84
5. Rövidítés jegyzék	86
Nyilatkozat	
Mellékletek (I-VII)	

1. BEVEZETÉS

Napjainkban egyre több területen találkozhatunk azzal az igénnyel, hogy környezetünket kímélő anyagokat használjunk és állítsunk elő, lehetőleg környezetbarát technológia felhasználásával, vagy az egyes gyártási folyamatok melléktermékeit újrahasznosítsuk, lebontsuk. Ezen elvárások is hozzájárulnak ahhoz, hogy az enzimek szélesebb körben is elterjedjenek. Felhasználásuk számos módjával találkozhattunk már eddig is, a háztartásokban, a laboratóriumokban és az iparban.

Az utóbbi évtizedektől kezdve az egyre nagyobb kihívások előtt álló szintetikus szerves kémia is felfedezte és biokatalitikus folyamatokban alkalmazza az enzimeket, mint természetes katalizátorokat, bővítve ezáltal a hagyományos szintetikus utakat.

A szerves kémia egyik megoldandó feladata a mind nagyobb számú összetett, biológiailag aktív anyag gazdaságos szintézise, sztereoizomerek, királis molekulák optikailag aktív formában történő előállítása^{1,2,3}. Ez a kérdés azért kiemelkedő fontosságú, mert a királis vegyületek tükörképi izomerjeinek az élő szervezetre gyakorolt hatása eltérő⁴, a közöttük lévő különbség felszívódásuk, metabolizmusuk vagy kiürülésük során is megmutatkozik, így az enantiomer tisztaságú előállításuk nélkülözhetetlen a gyógyszer- és növényvédőszer-iparban. Napjainkban ezért a királis vegyületek előállítására alkalmas szelektív szintézismódszereket intenzíven kutatják.

A szerves szintetikus kémia a szelektív szintézismódszerek megoldására számos lehetőség közül válogathat, ilyenek például fémorganikus vegyületek felhasználása, a fém és nehézfém katalizált homogén és heterogén katalízis, vagy a fázistranszfer katalízis, az elektro- és fotokémiai technikák és a korszerű sztereoszelektív szintézismódszerek. A biokatalizátor-előállítás fejlődésének köszönhetően az utóbbi évtizedekben a biokatalitikus lépéseket is tartalmazó szintézisek egyre nagyobb teret hódítanak. A biokatalízis tulajdonképpen *in vivo* biokatalizátorok vagy mikroorganizmusokból preparált enzimek készítmények alkalmazása szintézislépések megoldására, illetve kulcsintermedierek előállítására. Az enzimek által katalizált folyamatok a szerves kémia számára is ígéretes lehetőségeket kínálnak, hiszen majdnem minden szintetikus reakciótípusnak megvan az enzimkatalizált megfelelője, így alkalmazásuk jól kiegészítheti a hagyományos szintetikus eljárásokat.

Az enzimek természetüknél fogva környezetbarát⁵, királis katalizátorok^{6,7}, sok esetben elkerülhető velük a mérgező, vagy a környezetet súlyosan terhelő melléktermékek képződése⁸. Szerves oldószerekben az enzim élettartama a vizes fázishoz képest sokszorosára nőhet. Ma már sokféle, egyszerűen kezelhető és felhasználható, viszonylag olcsó enzim kapható. Az ismert enzimek közül több száz –néhányuk rögzített formában is– a kereskedelemből beszerezhető. Az enzim hordozóhoz rögzítése⁹ megkönnyítheti a reakcióelegy kezelését és elválasztását, így a biokatalizátor újrafelhasználása viszonylag egyszerűen megoldható. A törzsgyűjteményekből beszerezhető mikroorganizmusok további enzimek kimeríthetetlen tárházát nyújtják jobb szelektivitást, stabilitást vagy termelést adó katalizátor előállításához. Egy adott enzim termelése molekuláris biológiai vagy géntechnikai eljárással még gazdaságosabbá tehető. Sok esetben maga a termelő mikroorganizmus, vagy a fermentációhoz felhasznált mátrix is alkalmas rögzített enzimek készítményként történő felhasználásra.

Doktori munkám elsődleges célkitűzése az volt, hogy eddig még kevésbé vizsgált termofil fonalgombákból, lipáz/karboxiészteráz aktivitással rendelkező, a szerves szintetikus gyakorlatban általános biokatalizátorként használható enzimek készítményeket állítsak elő, melyekkel a kereskedelmi forgalomban kapható készítmények által nyújtott lehetőségek palettáját bővíthetjük.

A munka során eddig még nem vizsgált termofil fonalagombák lipáz- és hidrolázaktivitását vizsgáltam rázatott lombikos és szilárd fázisú fermentációval. A vizsgált fajok egy részéről már leírták, hogy termelnek lipáz/karboxiészteráz aktivitással rendelkező enzimeket, azonban ezen gombák közül csak néhányat alkalmaztak az iparban lipáz termelésre és többségüket eddig még nem tesztelték biokatalitikus folyamatokban sem. Az irodalomban nem találtunk utalást az általunk vizsgált *Myceliophthora thermophila*, *Thielavia terrestris* és *Thermomucor indicae-seudaticae* lipáz/karboxiészter hidrolázaktivitásának publikálására. Kísérleteink során 18 nem identifikált termofil fonalagombát is teszteltünk, melyek a TUB törzsgyűjteményből származtak.

Az általunk előállított új típusú enzimkészítményeket sztereoszelektív folyamatokban (acilezés, hidrolízis, alkoholízis) teszteltük. A kiválasztott reakciók végtermékeként magas enantiomertisztaságú királis végtermékeket kaptunk, melyek felhasználhatóak mind általános szintetikus célokra, mind gyógyszerhatóanyagok köztitermékének építőköveként. Ezeket az eddig még nem vizsgált vegyületeket előállítottuk és enzimátikus átalakításukat teszteltük. A kereskedelmi forgalomban kapható enzimkészítményeket összehasonlítottuk saját készítésűekkel, ezáltal megbizonyosodhattunk az általunk előállított enzimkészítmények létjogosultságáról.

Ph.D. munkámat két tanszéken végeztem, ennek megfelelően a dolgozat is két különálló részre tagolódik, igazodva a Mikrobiológia és a Szerves kémia egymáshoz képest eltérő formai követelményeket támaztó publikációs szokásaihoz. A dolgozat első részében 45 különböző termofil fonalagombából izolált hidrolitikus enzim előállítását illetve azok lipáz, hidroláz aktivitását vizsgáltam. Néhány termofil törzs szilárd fázisú fermentációval növesztett tenyészetének enzimaktivitását is mértem. A második rész a kereskedelmi forgalomban kapható, illetve a saját izolálású hidrolitikus enzimeket vizsgálja enantiomer és enantiotóp szelektív folyamatokban (2-benzoiloxi-propán-1,3-diol előállítása és enzimátikus acilezése, heterociklusos alkoholok enzimkatalizált átalakítása, cikloalkán-1,2-diol monoacetátok, 1-feniletanol és glicerín-karbonát származékok enzimátikus acilezése).

IRODALOM

1. Poppe, L.; Novák, L.: *Magyar Kémikusok Lapja*, 43, **1988**, 237-245.
2. Poppe, L.; Novák, L.: *Biokatalízis a szintetikus kémiában*; A kémia újabb eredményei, Budapest, 73, **1991**, 11-13.
3. Faber, K.: *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4th Edn., Springer, Berlin, **2000**.
4. Coutts, R.T.; Baker, G.B.: *Chirality*, 1, **1989**, 99-120.
5. Bóday, V.: *Környezetvédelem*, 3-4, **2002**, 41.
6. Rehm, H.-J.; Reed, G.; Pühler, A.; Stadler, P.; Kelly, D. R.: *Biotechnology: Biotransformations I and II*, Vols. 8a and 8b, 2nd Edn., Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
7. Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C.: *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
8. Bull, A. T.; Bunch, A.W; Robinson, G.K: *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, **1999**, 246-251.
9. Hodgson, J.: *Biotechnology (N Y)*, 12, **1994**, 789-790.

2. FEJEZET

BIOKATALIZÁTOROK ELOÁLLÍTÁSA

2.1. BIOKATALIZÁTOROK IRODALMA	7
2.1.1. ENZIMEK, MINT BIOKATALIZÁTOROK.....	7
2.1.2. HIDROLÁZOK, LIPÁZOK	10
2.1.3. MIKROBIÁLIS EREDETU LIPÁZ ENZIMEK	11
2.1.4. SZILÁRD FÁZISÚ FERMENTÁCIÓ	12
2.2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	13
2.2.1. MIKROORGANIZMUSOK EREDETE, TÖRZSFENNTARTÁS.....	13
2.2.2. RÁZATOTT LOMBIKOS FERMENTÁCIÓ.....	13
<i>Ráztatott lombikos táptalajok</i>	13
2.2.3. SZILÁRD FÁZISÚ FERMENTÁCIÓ.....	14
<i>Szilárd fázisú fermentációs táptalajok</i>	14
2.2.4. ENZIMAKTIVITÁS MÉRÉS.....	14
2.2.5. SZÁRÍTOTT ENZIMKÉSZÍTMÉNY ELOÁLLÍTÁSA.....	15
2.3. TERMOFIL FONALA SGOMBÁKKAL VÉGZETT FERMENTÁCIÓK EREDMÉNYEI	16
2.3.1. RÁZATOTT LOMBIKOS FERMENTÁCIÓ.....	16
2.3.2. SZILÁRD FÁZISÚ FERMENTÁCIÓ.....	22
2.4. IRODALOM	25

2. BOKATALIZÁTOROK ELOÁLLÍTÁSA

2.1. BOKATALIZÁTOROK IRODALMA

Az élet mind több területén találkozunk azzal az igénnyel, hogy környezetbarát, egészségünkre nem káros anyagokkal vegyük körül magunkat^{1, 2}. Célunk, hogy a környezetbarát termékek előállítása, se legyen károsító, ennek érdekében az ipar és a kutatás területén egyre nagyobb teret hódít a biotechnológia, amely tágabb értelemben az élő szervezetek vagy ezen szervezetekből kinyerhető biológiailag aktív anyagok felhasználását jelenti. Biotechnológiával találkozhatunk a háztartásokban (kenyér kelesztése, sörfozós), a szennyvíztisztításban (eleveniszapos szennyvíztisztítók), a mosószeriparban (enzimek adagolása a mosószerekhez), a textiliparban (indigóval színezett farmerárak fakítása), a növényvédelemben (mikrobiológiai növényvédelem), a mezőgazdaságban (ipari melléktermék előkészítése takarmányozási célokra, silózás), a gyógyászatban (antibiotikumok előállítása, aktív molekulák szintézise) és természetesen a kutatásban is.

Az új igényeknek megfelelően új alkalmazási területek születtek, új kutatási irányok váltak életképesé, melyek a már meglevő területeket bővítették, illetve lehetőséget adtak egy-egy folyamat környezetbarát megvalósítására. Ilyen új irány a „*zöld kémia*” és a *biokatalízis* is.

2.1.1. ENZIMEK, MINT BOKATALIZÁTOROK

Már évtizedekkel ezelőtt felismerték, hogy a biokatalízis egyszerűsítheti és tökéletesítheti egyes többlépcsős kémiai szintézisek hatásfokát és termelékenységét^{1, 3, 4, 5}. A biokatalízis ipari alkalmazása is egyre jelentősebb, felhasználják a gyógyszerhatóanyagok, a mezőgazdasági vegyszerek, finomkémikáliák és műanyagok gyártása során⁵⁻¹¹. Előnyei közé tartozik a könnyű kezelhetőség, a királis katalízis és a környezetbarát technológia. Az első mikrobiológiai szteroid-átalakítást Mamoli 1937-ben jegyezte fel¹², de az első mikrobiológiai oxidáció 1948-ban két magyar kutató, Krámlai és Horváth^{13, 14} nevéhez fűződik. A mikrobiológiai átalakításokban az igazi áttörést Petersen és Murray iparilag is jelentős biotranszformációja jelentette, amikor progesteronból 90% feletti kitermeléssel 11 α -hidroxiprogeszteront állítottak elő^{15, 16}. Ennek az átalakításnak azért volt ilyen jelentős hatása, mert valamennyi szteroid alapú gyulladásgátló-, illetve csökkentő szer a 11-es szénatomon ilyen térállású hidroxilcsoportot tartalmaz. Ezzel az egyszerű reakcióval sok biológiailag értékes vegyület, gyógyszer részleges-, illetve teljes szintézisének bonyolult lépéseit lehetett egyszerűsíteni¹⁷. A növekvő igények kielégítéséhez mikroorganizmusokból, növényi és állati sejtekből nyerhető új biokatalizátorok kutatása vált szükségessé, melyek felhasználásával újabb lehetőségek nyílnak az enantiomer-tiszta vegyületek előállítására (1. ábra)^{16, 5, 7}.

Az enzimfehérjék genetikai kódjának meghatározása és rekombináns mikroorganizmusok előállítása¹⁸, a rögzített enzimek alkalmazása¹⁹⁻²³, új közegek alkalmazása, a „*site directed mutagenesis*”²⁴ és az irányított evolúció („*directed evolution*”)²⁵⁻²⁷ további lehetőséget nyitottak az enzimek, mint biokatalizátorok gyakorlati

alkalmazására. Mára már számos enzimet* és sejtrendszer lehet, reagensként vásárolni és szintetikus célokra felhasználni a közel 3000 ismert és több száz kereskedelembe beszerezhető enzim²⁸⁻³¹ közül. Néhány készítmény rögzített formában is hozzáférhető^{32,33}.

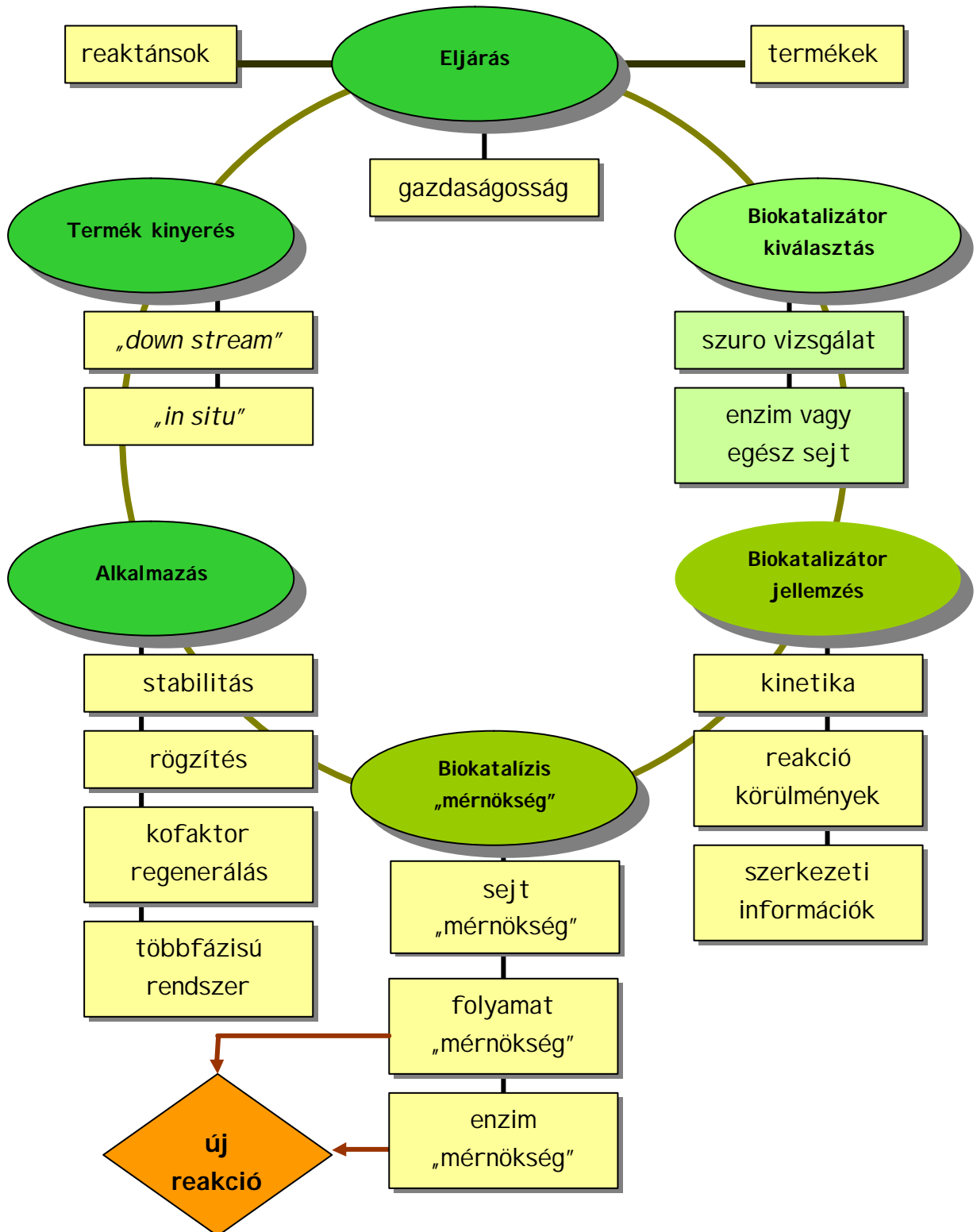
A mikroorganizmusok és vagy enzimek által katalizált folyamat akár 10-12 nagyságrenddel gyorsabb lehet, mint a nem enzimkatalizált folyamat ugyanazon körülmények között. A reakció befejeztével az enzimek sok esetben kinyerhetőek, újra felhasználhatóak⁵.

Az enzimek, mint királis makromolekulák, mind a katalizált reakció típusára, mind a szubsztrát (tér-)szerkezetére nézve igen szelektívek, aszimmetrikus átalakításokra alkalmasak. Ez a kérdés azért kiemelkedő fontosságú, mert a királis (olyan molekula, mely nem hozható fedésbe saját tükörképével, pl. az ember két keze) vegyületek enantiomerjeinek élő szervezetre gyakorolt hatása eltérő, sőt gyakran ellentétes is lehet. Ezért a hatóanyag előállításánál lényeges szempont, hogy minél nagyobb százalékban csak az aktív molekulát kapjuk meg.

A katalitikus folyamat, a katalizátor aktivitása, szelektivitása számos tényezovel – szubsztrát termék koncentráció, pH, hőmérséklet, ionerősség, oldószerek, ionok, más módosító szerek – befolyásolható. Biotranszformáció segítségével számos esetben, a szerves szubsztrát nem aktivált helyeire történő funkcionális csoport(ok) kialakítása is lehetséges^{5, 34}. Alkalmazásukat megkönnyíti, hogy nem csak vizes közegben, hanem szerves-vizes két fázisban, illetve vízmentes szerves közegben³⁵⁻⁴⁰, gázfázisban⁴¹, szuperkritikus gázfázisban⁴², fordított micellákban⁴³⁻⁴⁷ vagy folyadékkristályokkal alkotott emulzióban is működhetnek.

* Egy nemzetközi enzimegység (U), az a katalitikus aktivitás, amely a standardként meghatározott szubsztrátumból 1 μmól terméket állít elő vagy 1 μmól szubsztrátot bont le 1 perc alatt megadott reakciókörülmények esetén.

1. ábra A biokatalitikus kör¹

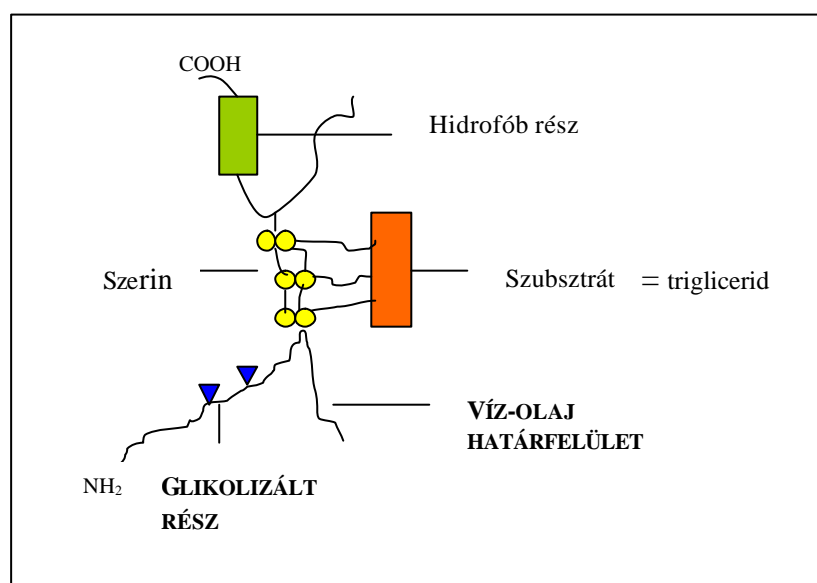


2.1.2. HIDROLÁZOK, LIPÁZOK

A kereskedelmi forgalomból beszerezhető és biokatalízisben alkalmazott enzimek közül igen fontos csoportot képeznek a hidrolitikus enzimek, ezen belül a lipázok (EC.3.1.1.3, glicerin-észter-hidrolázok) és más észterázok. Egy enzimreakció gazdaságossága több tényezőtől függ: az enzimkészítmény kinyerhetőségétől, áráról, specifikus aktivitásától, működési élettartalmától és felhasználási körülményeitől.

A hidrolitikus enzimek közül preparatív célokra legtöbbször azokat lehet gazdaságosan felhasználni, amelyek nagyobb mennyiségben elérhetők és megfelelően stabilak. Ilyen enzimek például a lipázok, proteázok, észterázok, amidázok.

2. ábra A lipázok működése víz-olaj határfelületen



A lipázok, a szerin hidrolázok csoportjába tartoznak, növényekben, állatokban és mikroorganizmusokban egyaránt fellelhetők. Természetes állapotban az észter kötés hidrolízisét katalizálják a nem oldható szubsztrát fázis és vizes fázis határfelületén. (2. ábra) Nagy elonyük, hogy működésükhöz nem igényelnek kofaktort. Mind vizes, mind látszólag vízmentes körülmények között képesek betölteni a biokatalizátor szerepét. A lipázok a természetben a trigliceridek hidrolízisével di-, monogliceridek és zsírsavak emulzióját hozzák létre. Legtöbbször extracelluláris enzimek.

A lipázok a szintetikus kémiában olyan sztereo- és regioselektív reakciókban alkalmazhatóak, mint pl. királis gyógyszerhatóanyagok előállítása. Felhasználhatóak még a növényolajiparban is a zsírok és olajok módosítására, kakaóvaj szintézisére, bioüzemanyag előállítására, ízfokozók előállítására ^{48,49}.

2.1.3. MIKROBIÁLIS EREDETŰ LIPÁZENZIMEK

Jelenleg széles körben folynak kutatások állati és mikrobiológiai, ezen belül elsődlegesen baktérium és gomba eredetű lipázok felkutatására és gyakorlati alkalmazására^{50,51}.

A bakteriális eredetű lipázokkal eddig kevesebbet foglalkoztak, mint az állati, illetve gomba eredetű lipázokkal. A bakteriális eredetű lipázok többsége glikoprotein, de néhány különleges baktérium eredetű lipáz lipoprotein. A legtöbb baktériumban⁵² az enzimtermelést az egyes poliszacharidok befolyásolják, többségük konstitutív módon termelődik nem szubsztrátspecifikus, többnyire alkális 8-11 pH-n stabil^{53, 54}. Ezt a tulajdonságukat használják ki az enzimes (bio)mosószerekben történő alkalmazásukkor. Eddig vizsgált legismertebb képviselőik^{55, 56} *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Staphylococcus* és *Pseudomonas*⁵⁷ fajok által termelt lipázok a kereskedelembe is beszerezhetők.

A gombából izolált enzimek előállítását már az 1950-es évek óta kutatják⁵⁸⁻⁶⁰. Számos gomba eredetű biokatalizátor kapható ma már kereskedelmi forgalomban, melyek újabb lehetőséget kínálnak a szintetikus szerves kémiában^{61, 62}. A *Mucor* és a *Rhizopus* lipázokból jelentős választék áll rendelkezésre, példa erre a *Mucor hiemalis*, *M. miehei*, *M. lipolyticus*, *M. pusillus*, *Rhizopus japonicus*, *R. arrhizus*, *R. delemar*, *R. nigricans*, *R. nodosus*, *R. microsporus*, és a *R. chinensis* mikroorganizmusokból nyert lipázok⁶³. Hőstabil lipáz enzimet a termofil *M. pusillus* és *M. miehei* törzsekből állítanak elő. Immobilizált formában a *M. miehei* által termelt lipázt Lipozyme TM néven a Novo-Nordisk¹⁸ (a cég újabb neve: Novozymes, Inc) forgalmaz. A termofil fonalgombák szaporodási optimuma magasabb hőmérsékleten van. A hagyományos értelemben vett termofil fonalgombák optimális tenyésztési hőmérséklete 45-55 °C, de rövidebb ideig képesek 60-62 °C-on is életben maradni^{64, 65}. Ennek megfelelően az általuk termelt extracelluláris enzimek is tolerálják a magas hőmérsékletet, a gomba optimális növekedési hőmérséklettartományában működnek, vagyis a mezofil mikroorganizmusokból nyert extracelluláris enzimekhez képest magasabb hőmérsékleten stabilabbak, így ezek a termotoleráns enzimek, mind tudományos, mind kereskedelmi értelemben érdeklődésre tarthatnak számot.

Néhány termofil gombával már előállítottak extracelluláris lipáz enzimet, közülük egyesek kereskedelmi forgalomban is kaphatóak^{18, 64, 66, 67}. Ezek a *Thermomyces lanuginosus* (korábban *Humicola lanuginosa*) és a *Rhizomucor miehei* törzsből kinyert enzimmészítmények. A termofil fonalgombák többségét azonban még nem alkalmazták lipáz és hidroláz termelésre. Az említett két termofil fonalgombából előállított kereskedelemben kapható készítmények igen jó, általános célokra alkalmazható biokatalizátornak bizonyultak⁶⁸⁻⁷⁰, így a többi termofil fonalgombából előállított lipáz és hidroláz enzimek is értékes biokatalizátorokká válhatnak a szerves kémiai, ipari stb. gyakorlatban.

2.1.4. SZILÁRD FÁZISÚ FERMENTÁCIÓ

A mikroorganizmusokból történő enzimek előállításának és kinyerésének több módja is ismert. Ezek közül laboratóriumban elsősorban a rázatott lombikos fermentációt, az iparban a fermentorban történő tömegtenyésztést alkalmazzák, de egyre népszerűbbé válik a szilárd fázisú fermentáció is. Szilárd fázisú fermentáció ⁷¹ = **SSF** (*Solid State Fermentation*) alatt mikroorganizmusok növesztését értjük vízzel oldhatatlan, vagy vízben korlátozottan oldódó anyagokon. Ezen táptalajok nedvesek vagy nyirkosak, de csak kötött vizet tartalmaznak, szabad vizet nem. A szilárd fázisú fermentáció során a szilárd mátrix részecskéin vagy a részecskék közötti térben történik a szaporodás és itt zajlanak az anyagcsere-folyamatok is. A mátrixhoz kötődő nedvességtartalom nem haladja meg a mátrix maximális vízmegkötő képességét. Ez a nedvességtartalom általában 40-80% tartományban van.

A szilárd fázisú fermentáció a természetben gyakran előforduló, spontán folyamat: ilyen az elhalt fák, növényi levelek, szárak és egyéb növényi részek mikrobiológiai lebontása.

Nem steril szilárd fázisú fermentáció a szerves anyag lebontására alkalmazott komposztálás is. A sterilizált végrehajtott szilárd fázisú fermentáció elsősorban az élelmiszeriparban terjedt el, pl. penészszerű élelt sajtok (roquefort, camembert), szójaszósz (soy sauce, shoyu) előállítása de enzimek ipari termelésére is használják. A szilárd fázisú fermentációt olyan előnyös tulajdonságai, mint a térfogatra vetített nagy termelékenység, elérhető magas végtermék koncentráció, az egyszerű és olcsó tápanyagok és eszközök teszik iparilag is vonzó technológiává (pl. lignocellulóz alapú mezogazdasági melléktermékek). A szilárd fázisú fermentáció egyszerű és olcsó feldolgozási („down stream”) műveleteket igényel, kevés szennyvíz keletkezik, hiszen sok esetben a teljes fermentált anyag felhasználható. A közeg alacsony vízaktivitásának köszönhetően a bakteriális fertőzés gyakorisága nem túl nagy. Szilárd fázisú fermentációval számos enzim előállítására nyílik lehetőség. Az eljárás egyik nagy előnye az hogy a nyers fermentációs termék akár közvetlen felhasználható enzimmészítményt szolgáltat.

A szilárd fázisú fermentációnak azonban van néhány hátrányos tulajdonsága is, mivel csak olyan mikroorganizmusokat lehet szilárd fázisú fermentációban szaporítani, amelyek kedvelik az aránylag kis vízaktivitású közeget, mint például a fonalgombák. A baktériumok és élesztők szaporítása szilárd fázisú fermentáció keretében bonyolultabb feladat. Méretnövelés esetén a képződő metabolikus hő elvonása (hűtés) nehéz feladat, mivel pl. kevertetésre általában nincs lehetőség. A levegőztetés csak nehezebben oldható meg, a gázcsere nem olyan hatékony, mint a süllyesztett fermentációban. A fermentációs paraméterek (hőmérséklet, pH, oldott oxigén, nedvességtartalom) nyomon követése nehézkes, a tenyésztési periódus a szubmerz fermentációhoz képest hosszabb. A szilárd fázisú fermentációs rendszer nem homogén, így az egységes mintavétel problémát okozhat.

Ipari célra előállított enzimek termelésére általában mezogazdasági melléktermékeket használnak táptalajként, mivel ezek könnyen hozzáférhető olcsó alapanyagok és enzimtermelés céljára nagy hatékonysággal alkalmazhatók. Szilárd fázisú fermentációval enzimeket elsősorban Japánban állítanak elő, nem túl nagy mennyiségben. Egészen kis volumenben Indiában és Franciaországban is folyik enzimgyártás szilárd fázisú fermentációval. Eddig ipari méretben főleg amilázokat, proteázokat, glükóamilázokat, pektinázt és cellulázt termeltek ezzel a módszerrel.

2.2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.2.1. MIKROORGANIZMUSOKEREDETE, TÖRZSFENNTARTÁS

Az általunk vizsgált termofil fonalagombák többsége a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem (TUB=Technical University of Budapest) törzsgyűjteményéből származik, míg a többi törzs az alábbi gyűjteményekből: ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA); CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands); NRRL (Northern Regional Research Center, Peoria, Illinois, USA); WFPL (Western Forest Products Laboratory, Vancouver, Canada); VKM (Russian Culture Collection, Moscow). Néhány TUB törzsgyűjteményből származó törzs ATCC katalógus számmal is rendelkezik, úgymint: *Chaetomium thermophilum* TUB F-69 (=ATCC 58136), *Myceliophthora thermophila* TUB F-39 (=ATCC 58152), *Paecilomyces* sp. TUB F-70 (=ATCC 58155) és *Thermoascus aurantiacus* TUB F-43 (=ATCC 58156).

A fonalagombákat liofilezett tenyészetek (ampullák) formájában raktározzuk. A vegetatív törzstenyészetet PDA (Potato-Dextrose-Agar) ferdeagaros tenyészet formájában tároljuk. Az ampulláról PDA táptalajú Petri csészékben 45 °C –on tenyésztjük a törzseket, majd felhasználásig szobahőmérsékleten tároljuk. Petri csészében néhány hetente végzett átváltással frissítjük a tenyészeteket. A kelően sporulált Petri csészés tenyészetekből 0,1 % Tween-80 tartalmú steril vízzel spóraszuszpenziót készítettünk, ezzel oltottuk be a lombikokban sterilizált táptalajokat.

2.2.2. RÁZATOTT LOMBIKOS FERMENTÁCIÓ

A nem optimalizált fermentációt 500 ml-es, vattadugózott Erlenmeyer lombikokban, 150 ml tápoldatban végeztük. A lombikokat 121 °C-on 30 percig sterilizáltuk, spóraszuszpenzióval oltottuk. Az induló spóra koncentráció: 1×10^6 /ml. A fermentáció 45 °C –ra temperált síkrázón, 300 rpm mellett 3 napig tartott. Két olívaolajjal indukált táptalajon (*LIP1*, *LIP2*) összesen 45 termofil fonalagomba izolátumot teszteltünk (ld. 1. és 2. táblázat).

Ráztatott lombikos táptalajok

LIP1 táptalaj: 150 ml táptalaj / 500 ml-es vattadugózott Erlenmeyer lombikban; 1 % kristálycukor; 1 % olívaolaj; 0,25 % szójaliszt; 0,2 % KH_2PO_4 ; 0,2 % CaCO_3 ; 0,15 % $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0,1 % Tween-80; 0,05 % $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,05 % NaCl; 0,05 % NaNO_3 ; 0,05 % nyomelem oldat-1; 0,05 % nyomelem oldat-2;

LIP2 táptalaj: 150 ml táptalaj / 500 ml-es vattadugózott Erlenmeyer lombikban; 1,5% kukoricaliszt; 1% olívaolaj; 0,2 % kukoricalkvár, 50 % szárazanyag tartalom; 0,2 % KH_2PO_4 ; 0,2 % CaCO_3 ; 0,15 % $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0,2 % Tween-80; 0,05 % $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,05 % NaCl; 0,05 % KNO_3 ; 0,05 % nyomelem oldat-1; 0,05 % nyomelem oldat-2;

Nyomelem oldat-1: MnSO_4 (1,6 g/l), $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (3,4 g/l); $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (2,0 g/l)

Nyomelem oldat-2: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (5,0 g/l);

A fermentációt követően mind a 90 tenyészetet centrifugáltuk (3000 rpm, 10 perc, 20 °C), így elválasztottuk az olajos fázist, a felülúszót és a sejtömeget, majd az így nyert sejtmentes felülúszóból lipáz és karboxiészteráz-aktivitást mértünk. A felülúszókat az enzimaktivitás méréséig 4 °C -on tároltuk.

2.2.3. SZILÁRD FÁZISÚ FERMENTÁCIÓ

A nem optimalizált szilárd fázisú fermentációt 500 ml-es vattadugózott Erlenmeyer lombikokban, kétféle táptalajon végeztük. A lombikokat 121 °C-on 30 percig sterilizáltuk, majd kihülés után spóraszuszpenzióval oltottuk be. Az induló spóra koncentráció: 1×10^6 g/ml. A fermentáció 45 °C -ra temperált termosztátban 3 napig tartott. Alapanyagként két mezogazdasági terméket választottunk ki, egész (teljes) repcemagot és búzakorpát, utóbbit olivaolajjal (Cereol Rt.-tol) egészítettük ki.

Szilárd fázisú fermentációs táptalajok

Repcemagos táptalaj: 5 g bolti repcemagot nedvesítettünk 7,5 ml sóoldattal (10 g/l KH_2PO_4 , 10 g/l NH_4NO_3 , 2 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 2 g/l NaCl) sterilizálás előtt a pH=5,7.

Búzakorpás táptalaj: 4,5 g búzakorpát egészítettünk ki 0,5 g olivaolajjal és nedvesítettük 5 ml sóoldattal (15 g/l KH_2PO_4 , 15 g/l NH_4NO_3 , 3 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 3 g/l NaCl) sterilizálás előtt a pH=5,7.

A fermentációt követően az extrakciós felülúszóból mértük az enzimaktivitást. Az extrakció során a lombikban lévő 5 g (száraz) szubsztrát kiindulási nedvességtartalmát 100 ml-re egészítettük ki 0,3% Tween-80-at tartalmazó vízzel, szobahőmérsékleten extraháltuk, majd 1 óra múlva centrifugáltuk (3000 rpm, 10 perc). A felülúszókat az enzimaktivitás méréséig 4°C-on tároltuk.

2.2.4. ENZIMAKTIVITÁS MÉRÉS

A hidrolázaktivitásokat három különböző irodalmi módszer kisebb módosításával állapítottuk meg. Az A módszer esetén automata titriméterrel, olivaolaj szubsztráton ⁷²; a B módszer esetében *p*-nirtofenil-palmitáttal ⁹⁰; míg a C módszer szerint spektrofotometriás úton *p*-nirtofenil-butiráttal ⁹⁰ mértük az enzimek aktivitását.

A módszer: A mérést automata titriméterrel a Worthington kézikönyv ⁷² leírása alapján végeztük. Az összemérés szigorúan a következő sorrend szerint történt: 25 ml desztillált vízhez 5 ml szubsztrát-gumiarábikum emulziót (6,6 g gumiarábikumot 26 ml desztillált vízzel alaposan, csomómentesre elkevertük, majd desztillált vízzel felöntöttük 66 ml-re és 8 ml olivaolajat kevertünk el benne, jéggel hutóttuk); 2 ml 3,0 M NaCl-oldatot; 1 ml 0,075 M CaCl_2 oldatot és 2 ml 0,5 %-os albumin-oldatot adtunk. Végül ehhez mértünk 10 ml sejtmentes felülúszót és 0,1M NaOH oldattal a pH-t 7,5-re állítottuk. A mérés során 10-20 percig ezt a pH értéket tartottunk fenn. A felszabaduló zsírsavakat 0,01 M NaOH

oldattal titráljuk. A 0,01M NaOH oldatot mindig frissen készítjük. A lúg fogyásából számítottuk az enzimaktivitást [†].

B módszer: *p*-nitrofenil-palmitátot (*p*NPP) alkalmaztunk szubsztrátként. Két oldatot készítettünk (Sol1 és Sol2)⁹⁰ és az oldatok összekeverésével kaptuk a méréshez felhasznált emulziókat. A Sol1 oldat összetétele: 30 ml propán-2-ol-ban oldottunk *p*NPP-ot (Sigma, 90 mg); Sol2 oldat összetétele: 450 ml pufferben (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0) elkevertünk Triton X-100 (2 g) és gumiarábikumot (Merck, 0,5 g). Az emulzióképzés során 1 ml Sol1-hez 9 ml Sol2-t adtunk. Ez az emulzió 2 óra hosszan stabil maradt. Aktivitásméréskor az így elkészült oldathoz (2000 µl) 500 µl felülúszót adtunk. Kettős vakot használtunk. Egyikben háttérként a sima emulzió mellett desztillált vízzel helyettesítettük az enzim-felülúszót, a másikban pedig *p*NPP helyett *p*-nitrofenolt (*p*NP, Sigma, 1,66 mg) adtunk. A mintákból felszabaduló *p*-nitrofenol (*p*NP) mennyiségét 45 °C-on 30 perc inkubálás után 410 nm-en mértük. A *p*-nitrofenollal kalibrációs (standard) görbét készítettünk.

C módszer: A mérést a B módszer szerint végeztük, azzal a különbséggel, hogy *p*NPP helyett *p*-nitrofenil-butirátot (*p*NPB) (Sigma, 49,5 mg) alkalmaztunk szubsztrátként.

2.2.5. SZÁRÍTOTT ENZIMKÉSZÍTMÉNY ELOÁLLÍTÁSA

A fermentációt követően 1 térfogatnyi felülúszót, vagy 1 térfogatnyi szilárd fázisú fermentációs szárazanyagot 2-3 térfogatnyi acetonnal kezeltük, majd a kicsapott fehérjéket vagy az így vízmentesített anyagot G4-es üvegszuron szurtuk. A csapadékot további acetonnal mostuk (összesen 6 térfogatnyi acetont használtunk fel a szárításhoz). A száraz fehérjéből, illetve a maradék szilárd fázisú fermentációs szubsztrátot és gomba micéliumot tartalmazó enzimek készítményből az oldószeranyagokat rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottuk el. A mintákat légmentesen záródó edényben, hűtőben + 4 °C -on tároltuk. Az így előállított minta akár évekig is képes megőrizni aktivitását.

[†] 1 egység [U] az az enzim mennyiség, amely 1 perc alatt 1 µmol zs írsavat szabadít fel.

2.3. TERMOFIL FONALASGOMBÁKKAL VÉGZETT FERMENTÁCIÓK EREDMÉNYEI

2.3.1. RÁZATOTT LOMBIKOS FERMENTÁCIÓ

Rázatotott lombikos kísérleteink során termofil fonalaszgombák lipáz- és hidrolázaktivitását kétféle táptalajon vizsgáltuk⁷³. A tesztelt gomba törzsek egy részéről, már leírták, hogy termelnek lipáz / karboxiészteráz-aktivitással rendelkező enzimeket *Chaetomium thermophilum*^{74, 75}, *Humicola grisea*⁷⁶, *Humicola insolens*^{22, 23, 74}, *Malbranchea pulchella var sulfurea*^{77, 78}, *Paecilomyces sp.*⁷⁹⁻⁸¹, *Rhizomucor pusillus*, *Sporotrichum thermophile*⁸²⁻⁸⁴, *Talaromyces emersonii*⁸⁵⁻⁸⁷, *Talaromyces thermophilus*^{76, 85}, *Thermoascus aurantiacus*^{74, 75}, *Thermoascus thermophilus*^{74-76, 88, 89}, *Thielavia terrestris* és *Thermomyces lanuginosus*^{22, 23, 75, 85}. Ezen gombák közül azonban csak néhányat alkalmaztak az iparban lipáz termelésre és többségüket eddig még nem tesztelték biokatalitikus folyamatokban. Legjobb tudomásunk szerint a *Myceliophthora thermophila*, *Thielavia terrestris* és *Thermomucor indicae-seudaticae* lipáz/ karboxiészter- hidroláz-aktivitását eddig még nem publikálták. Kísérleteink során 18 nem identifikált termofil fonalaszgombát is teszteltünk, melyek a TUB törzsgyűjteményből származtak.

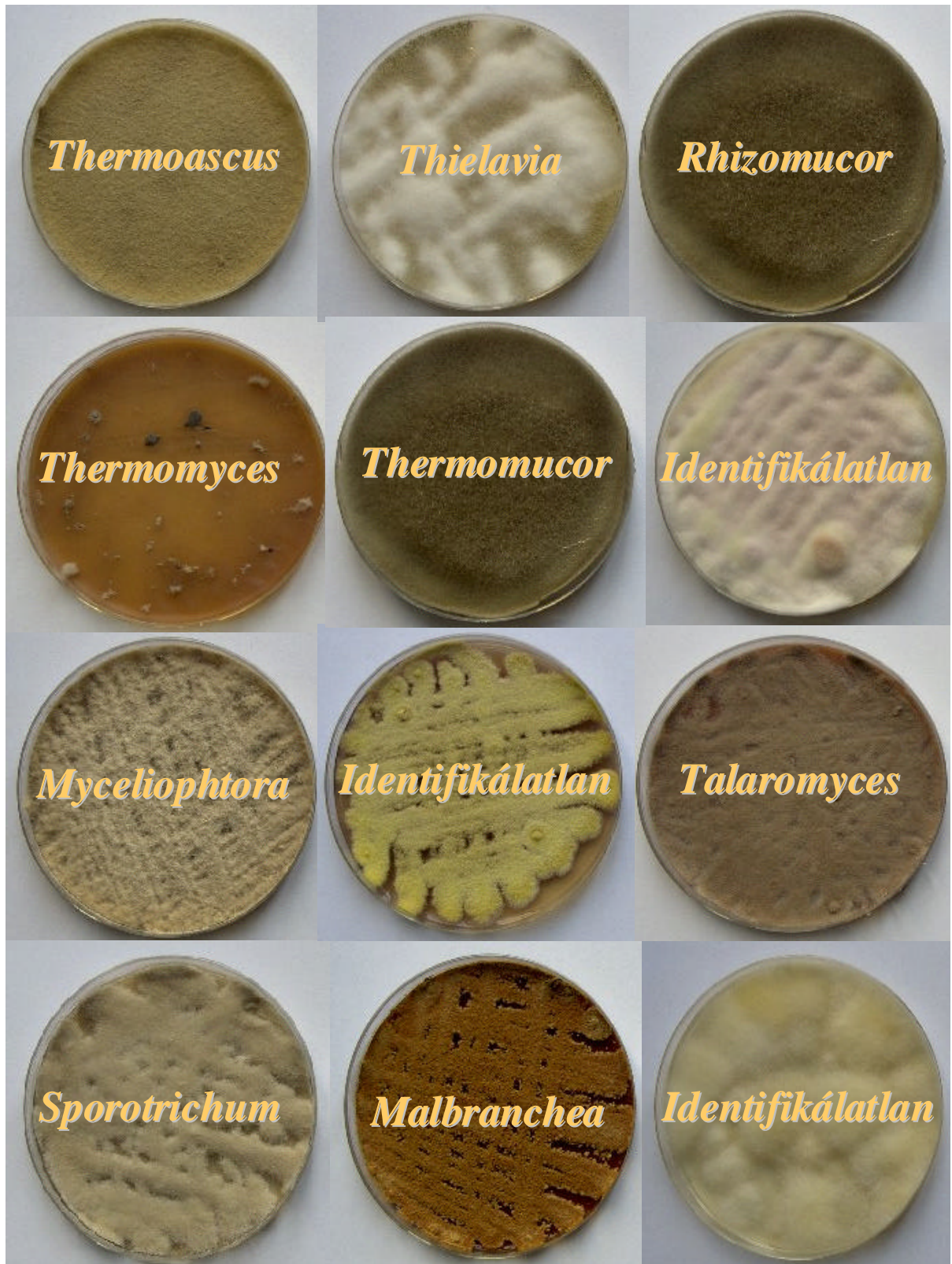
Figyelemre méltó továbbá, hogy *Talaromyces emersonii* és *Emericella nidulans* törzsekből extrém stabil, észterázaktivitással rendelkező, mikroenzimeket (1.6 kDa-tól 4.1 kDa-ig) izoláltak⁸⁷.

3. ábra Rázatotott lombikos fermentáció lombikjai



Összesen 45 termofil fonalaszgomba izolátumot növesztettünk kétféle rázatott lombikos táptalajon (3. ábra, 4. ábra, 1. táblázat, 2. táblázat), 72 órán át, 45°C-on, majd centrifugálást követően a felülúszóból mértük a lipáz- és karboxiészteráz-aktivitást. Az enzim termelés indukálására a táptalajok 1% olívaolajat tartalmaztak. A lipázaktivitást titriméterrel, olívaolaj (oliva), illetve spektrofotométerrel *p*-nitrofenil-palmitát (*p*NPP) szubsztrátokkal mértük.

4. ábra Néhány tesztelt termofil fonalásgomba törzs (Petri csészés tenyészet)



Az általános karboxiészteráz-aktivitást spektrofotometriás módszerrel *p*-nitrofenil-butirát (*p*NPB) szubsztráttal határoztuk meg. Néhány esetben a lipázaktivitás mérésére felhasznált olivaolaj szubsztráttal nem mértünk aktivitást⁹⁰, de más szubsztráttal tapasztalható volt enzimaktivitás. Ennek oka a hidrolázok változatos szubsztrátspecifitásával magyarázható. Ezt támasztja alá a karboxiészteráz-aktivitás mérés is, ahol jól látható, hogy a gombák egynél több extracelluláris enzimet termelnek. Ezen enzimek mennyisége és aránya nagyban függ a felhasznált táptalaj összetételétől. Jó példa erre a *Talaromyces emersonii* (NRRL-3221) vagy *Talaromyces thermophilus* (NRRL-2155) törzsekkel mért enzimaktivitás, ahol méréseink szerint a LIP1 táptalaj az észteráz, míg a LIP2 táptalaj a lipáz enzimek termelésének kedvezett (1. táblázat).

1. táblázat: Termofil fonalagombák lipáz- és karboxiészteráz-aktivitása

Gombatörzs (táptalaj)	Kinyert enzimpor [mg/ml] ^[a]	Hidrolázaktivitás ^[b] [mU/ml]		
		Oliva	<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -NPB
<i>Chaetomium thermophilum</i> TUB-F-69 (LIP1)	4,5	0	97,3	109,6
<i>Chaetomium thermophilum</i> TUB-F-69 (LIP2)	1,0	0	15,3	73,3
<i>Humicola grisea var thermoidea</i> CBS-183.64 (LIP1)	2,8	0	429,0	210,0
<i>Humicola grisea var thermoidea</i> CBS-183.64 (LIP2)	5,0	0	188,0	526,0
<i>Humicola insolens</i> CBS-147.64 (LIP1)	1,4	0	55,2	96,3
<i>Humicola insolens</i> CBS-147.64 (LIP2)	3,4	0	22,4	309,0
<i>Malbranchea pulchella var sulfurea</i> TUB F-4 (LIP1)	2,0	0	101,6	141,2
<i>Malbranchea pulchella var sulfurea</i> TUB F-4 (LIP2)	3,0	10,6	63,0	116,6
<i>Malbranchea pulchella var sulfurea</i> TUB F-25 (LIP1)	3,2	0	88,6	105,0
<i>Malbranchea pulchella var sulfurea</i> TUB F-25 (LIP2)	5,6	0	120,0	130,3
<i>Malbranchea pulchella var sulfurea</i> TUB T-2 (LIP1)	1,9	2,6	181,5	58,0
<i>Malbranchea pulchella var sulfurea</i> TUB T-2 (LIP2)	2,2	34,8	37,6	256,5
<i>Myceliophthora thermophila</i> TUB-F-39 (LIP1)	7,8	0	84,5	191,3
<i>Myceliophthora thermophila</i> TUB-F-39 (LIP2)	3,9	0	100,2	320,4
<i>Paecilomyces sp.</i> TUB-F-70 (LIP1)	16,0	0	0,35	1,4
<i>Paecilomyces sp.</i> TUB-F-70 (LIP2)	13,5	0	9,5	6,4
<i>Rhizomucor pusillus</i> WFPL 267 B (LIP1)	3,5	0	4,0	3,4
<i>Rhizomucor pusillus</i> WFPL 267 B (LIP2)	3,8	0	4,0	2,0
<i>Rhizomucor pusillus</i> VKM F-1626 (LIP1)	5,3	0	38,8	6,6
<i>Rhizomucor pusillus</i> VKM F-1626 (LIP2)	1,4	0	54,0	13,5
<i>Sporotrichum thermophile</i> ATCC-36,347 (LIP1)	1,3	0	30,0	13,8
<i>Sporotrichum thermophile</i> ATCC-36,347 (LIP2)	2,3	9,3	94,7	63,5
<i>Sporotrichum thermophile</i> WFPL-264 A (LIP1)	0,3	0,2	80,1	68,4
<i>Sporotrichum thermophile</i> WFPL-264 A (LIP2)	0,2	0	76,4	66,8
<i>Talaromyces emersonii</i> NRRL-3221 (LIP1)	3,3	0	5,1	15,3
<i>Talaromyces emersonii</i> NRRL-3221 (LIP2)	2,4	2,7	4,9	5,8

Gombatörzs (táptalaj)	Kinyert enzimpor [mg/ml] ^[a]	Hidrolázaktivitás ^[b] [mU/ml]		
		Oliva	p-NPP	p-NPB
<i>Talaromyces emersonii</i> EFPL C-463 (LIP1)	2,4	0	5,2	4,5
<i>Talaromyces emersonii</i> EFPL C-463 (LIP2)	5,0	0	8,1	5,1
<i>Talaromyces thermophilus</i> NRRL-2155 (LIP1)	1,6	0	7,3	6,7
<i>Talaromyces thermophilus</i> NRRL-2155 (LIP2)	13,5	0	28,8	6,0
<i>Thermoascus aurantiacus</i> TUB-F-43 (LIP1)	1,3	0	5,9	23,5
<i>Thermoascus aurantiacus</i> TUB-F-43 (LIP2)	1,0	0	7,8	18,0
<i>Thermoascus thermophilus</i> NRRL-5208 (LIP1)	2,3	1,8	34,5	30,0
<i>Thermoascus thermophilus</i> NRRL-5208 (LIP2)	1,9	3,1	3,9	0
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> NRRL-6429 (LIP1)	1,1	0	104,0	42,5
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> NRRL-6429 (LIP2)	4,6	0	1,7	0,6
<i>Thielavia terrestris</i> NRRL 8126 (LIP1)	3,6	0	14,5	223,6
<i>Thielavia terrestris</i> NRRL 8126 (LIP2)	2,6	31,9	22,0	65,9
<i>Thermomyces lanuginosus</i> ATCC 36,350 (LIP1)	4,0	0	33,5	9,6
<i>Thermomyces lanuginosus</i> ATCC 36,350 (LIP2)	6,2	0	35,0	11,8
<i>Thermomyces lanuginosus</i> ATCC-38,905 (LIP1)	2,4	20,3	4,6	20,7
<i>Thermomyces lanuginosus</i> ATCC-38,905 (LIP2)	1,1	17,9	26,0	3,1
<i>Thermomyces lanuginosus</i> ATCC 46,882 (LIP1)	3,7	0	5,6	3,5
<i>Thermomyces lanuginosus</i> ATCC 46,882 (LIP2)	1,8	0	7,0	4,2
<i>Thermomyces lanuginosus</i> CBS-224,63 (LIP1)	1,6	0	0	16,9
<i>Thermomyces lanuginosus</i> CBS-224,63 (LIP2)	2,6	12,8	31,5	16,9
<i>Thermomyces lanuginosus</i> TUB F-31 (LIP1)	2,0	45,7	30,1	0
<i>Thermomyces lanuginosus</i> TUB F-31 (LIP2)	0,2	2,2	0,8	0
<i>Thermomyces lanuginosus</i> TUB F-48 (LIP1)	3,9	0	23,0	40,2
<i>Thermomyces lanuginosus</i> TUB F-48 (LIP2)	2,4	0	23,5	42,2
<i>Thermomyces lanuginosus</i> TUB F-80 (LIP1)	3,3	0	8,6	13,0
<i>Thermomyces lanuginosus</i> TUB F-80 (LIP2)	7,8	0	5,9	8,7

^a 1 ml felülúszóból nyert szárított enzimpor tömege; ^b A 0,1 mU/ml-nél kisebb aktivitásokat 0-nak vettük;

A nem identifikált törzsek közül a TUB F-982; TUB F-985; TUB F-986; TUB F-987; TUB F-1060 törzsek mutattak kimagasló aktivitás értékeket (2. táblázat). A TUB F-985 és TUB F-986 törzsek növekedése, telepmorfológiája alapján feltehetően *Malbranchea pulchella* var *sulfurea* izolátumok. A TUB F-982 törzs olajmentesített kókuszdió szubsztráton tenyésztve szilárd fázisú fermentációban makroszkópikus gomba növekedést mutatott, így valószínűleg egy termofil bazidiomicetes. A TUB F-987; TUB F-1060; TUB F-914 és TUB F-1003 jelu izolátumok makroszkópikus telepmorfológiája az ismert fajokhoz viszonyítva jelentősen eltér, így nem elképzelhetetlen, hogy új termofil gomba fajokat/ törzseket képviselnek.

2. táblázat Nem identifikált termofil fonalagombák lipáz és karboxiészteráz-aktivitása

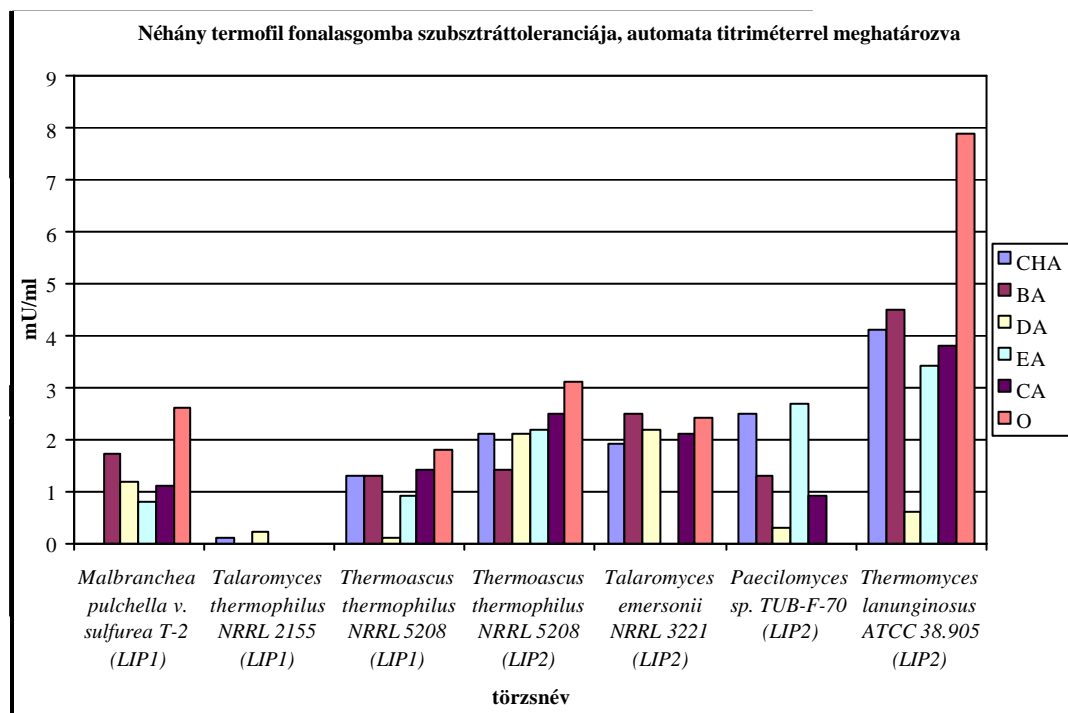
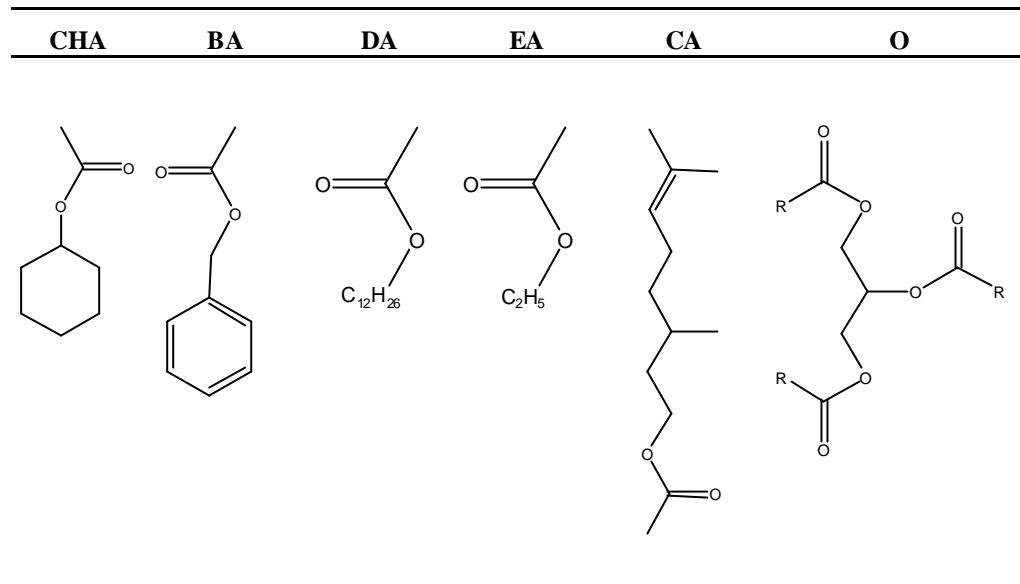
Gombatorzs (táptalaj)	Kinyert enzimpor [mg/ml] ^[a]	Hidrolázaktivitás ^[b] [mU/ml]		
		Oliva	<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -NPB
F-982 (LIP1)	1,9	0	18,5	218,2
F-982 (LIP2)	4,3	30,2	54,1	232,5
F-983 (LIP1)	0,8	0	6,8	68,0
F-983 (LIP2)	2,1	0	19,6	111,2
F-985 (LIP1)	3,1	0	77,9	199,2
F-985 (LIP2)	3,9	71,3	84,0	174,6
F-986 (LIP1)	2,2	0	8,1	3,3
F-986 (LIP2)	5,4	143,6	217,5	39,3
F-987 (LIP1)	2,5	71,3	0	11,0
F-987 (LIP2)	0,0	0	0	0
F-989 (LIP1)	0,6	0	31,7	237,3
F-989 (LIP2)	2,7	0	30,3	109,1
F-914 (LIP1)	0,9	0	11,5	8,4
F-914 (LIP2)	2,9	0	2,1	5,3
F-992 (LIP1)	1,4	0	8,4	7,6
F-992 (LIP2)	2,5	0	5,5	2,6
F-994 (LIP1)	2,5	0	11,4	14,0
F-994 (LIP2)	1,0	0	5,6	0
F-996 (LIP1)	0,5	0	9,5	8,6
F-996 (LIP2)	6,2	0	3,2	4,0
F-1003 (LIP1)	1,0	0	2,2	0
F-1003 (LIP2)	2,6	0	3,7	1,4
F-1054 (LIP1)	0,8	0	8,9	12,7
F-1054 (LIP2)	5,7	0	34,5	14,8
F-1060 (LIP1)	0,8	0	128,3	44,6
F-1060 (LIP2)	7,8	0	50,0	36,5
F-980 (LIP1)	4,0	0	3,8	11,1
F-980 (LIP2)	3,8	0	35,3	14,3
F-14 (LIP1)	2,9	0	19,7	124,2
F-14 (LIP2)	5,7	0	3,0	193,1
F-59 (LIP1)	4,4	0	8,8	92,9
F-59 (LIP2)	1,0	0	83,5	62,0
F-1117 (LIP1)	1,8	0	17,0	102,4
F-1117 (LIP2)	1,8	0	1,3	242,4
F-1118 (LIP1)	1,9	0	4,3	6,0
F-1118 (LIP2)	2,4	0	4,0	105,3

^a 1 ml felülúszóból kapott szárított enzimpor tömege; ^b A 0,1 mU/ml-nél kisebb aktivitásokat 0-nak vettük;

A rázatott lombikos fermentációval előállított és az előzetes mérések alapján jó biokatalizátornak bizonyult legjobb öt törzs különböző szubsztrátokkal adott aktivitását

(szubsztrátprofilját) is vizsgáltuk ⁹¹. A titriméteres aktivitásmérésnél az olivaoajat (O), mint szubsztrátot azonos mólnyi citronellil-acetáttal (CA), dodecil-acetáttal (DA), etil-acetáttal (EA), benzil-acetáttal (BA), ciklohexil-acetáttal (CHA) helyettesítettük és azonos körülmények között mértük a felszabaduló sav mennyiségét (5. ábra).

5. ábra: Néhány termofil fonalaszgomba szubsztrát profilja



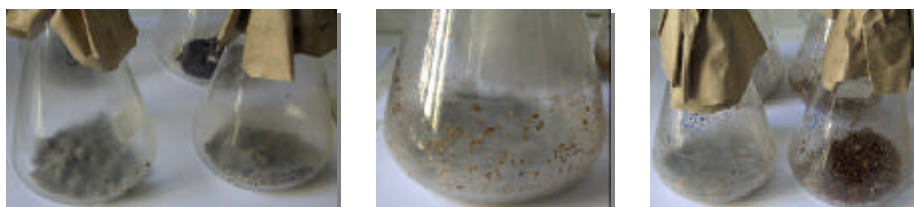
A lipázok aktivitásmérésére legelterjedtebben használt olivaoaj a méréseink során is jó szubsztrátnak bizonyult. Az általános hidrolázaktivitást etil-acetáttal lehet mérni, mely aktivitás érték *Thermomyces lanuginosus* (ATCC 38.905) és *Paecilomyces* sp. (TUB F-70) esetén volt a legnagyobb. A *Talaromyces thermophilus* (NRRL 2155) egyik szubsztráton sem mutatott jellemző aktivitást, de a biokatalitikus folyamatokban jól

működő biokatalizátornak ígérkezett. Ezért a lipáz és hidrolázaktivitás adatok alapján nem lehetséges minden esetben egyértelműen eldönteni, hogy különböző biokatalitikus folyamatokban, melyik enzimmészítmény lesz a leghatékonyabb.

2.3.2. SZILÁRD FÁZISÚ FERMENTÁCIÓ

Egyes termofil fonalagomba törzsekkel szilárd fázisú fermentációt is indítottunk (6. ábra, 3. táblázat, 4. táblázat). A gombamicéliumokat tartalmazó fermentációs mátrixot szárítottuk, majd az így előállított készítményeket biokatalízisben is teszteltük.

6. ábra: Szilárd fázisú fermentáció lombikban



Szubsztrátként nagy olajtartalmú kókusz olajpogácsát, 10 % olívaolajjal kiegészített búzakorpát, napraforgó maghéjat és egész repcemagot használtunk. Három fonalagombával (*Talaromyces thermophilus*, *Talaromyces emersonii*, és *Thermoascus thermophilus*) szubsztrát kiválasztásra, a tenyésztő szubsztrát nedvességtartalomra és az alkalmazott nedvesítő sóoldatra elokísérleteket végeztünk, majd az így kiválasztott paraméterek alkalmazása mellett teszteltünk néhány termofil fonalagomba törzset.

A rázatott lombikos és szilárd fázisú fermentációval növesztett tenyészetek enzimaktivitásait összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a *Malbranchea pulchella* var *sulfurea* (TUB T-2) és a *Myceliophthora thermophila* (TUB F-39) törzsek esetében mind rázatott lombikos, mind szilárd fázisú fermentációval növesztve nagy lipáz aktivitásokat mértünk. Szilárd fázisú fermentáció során a *Thermomyces lanuginosus* (TUB F-31) *Talaromyces thermophilus* (NRRL 2155) és *Thermomyces lanuginosus* (CBS 224.63) törzsek is jó aktivitást mutattak, míg rázatott lombikos fermentációval elsődlegesen a *Malbranchea* és *Myceliophthora* törzsek adtak jó eredményeket.

3. táblázat: Termofil fonalalgombák hidrolázaktivitása, szilárd fázisú fermentációval nyert mintákban

Gombatörzs (táptalaj) ^a	Hidrolázaktivitás ^b					
	[mU/ml felülúszó]			[mU/g szárazanyag]		
	Oliva	p-NPP	p-NPB	Oliva	p-NPP	p-NPB
<i>Malbranchea pulchella</i> v. <i>sulfurea</i> T-2 (R)	37	62	94	740	1240	1880
<i>Malbranchea pulchella</i> v. <i>sulfurea</i> T-2 (BK)	53	13	17	1193	289	377
<i>Malbranchea pulchella</i> v. <i>sulfurea</i> TUB F-4 (BK)	0	11	18	0	228	356
<i>Malbranchea pulchella</i> v. <i>sulfurea</i> TUB F-4 (R)	6	11	38	60	213	748
<i>Malbranchea pulchella</i> v. <i>sulfurea</i> TUB F-25 (BK)	14	5	9	280	97	187
<i>Malbranchea pulchella</i> v. <i>sulfurea</i> TUB F-25 (R)	22	2	25	440	34	504
<i>Myceliophthora thermophila</i> TUB F-39 (BK)	0	17	82	0	337	1645
<i>Myceliophthora thermophila</i> TUB F-39 (R)	0	29	25	0	575	491
<i>Rhizomucor pusillus</i> WFPL 267B (R)	0	27	5	0	540	106
<i>Rhizomucor pusillus</i> WFPL 267B (BK)	0	68	7	0	1510	149
<i>Rhizomucor pusillus</i> VKM F-1626 (R)	0	47	7	0	940	146
<i>Rhizomucor pusillus</i> VKM F-1626 (BK)	0	76	25	0	1687	555
<i>Sporotrichum thermophile</i> ATCC 36.347 (R)	40	2	17	800	46	340
<i>Sporotrichum thermophile</i> ATCC 36.347 (BK)	0	5	22	0	109	488
<i>Talaromyces emersonii</i> NRRL 3221 (R)	42	1	26	840	20	520
<i>Talaromyces emersonii</i> NRRL 3221 (BK)	0	1	32	0	38	533
<i>Talaromyces thermophilus</i> NRRL 2155 (R)	27	40	97	540	800	1940
<i>Talaromyces thermophilus</i> NRRL 2155 (BK)	45	1	2	1013	29	44
<i>Talaromyces emersonii</i> EFPL C-463 (R)	0	0	4	0	3	82
<i>Talaromyces emersonii</i> E FPL C-463 (BK)	0	2	55	0	49	1221
<i>Thermoascus thermophilus</i> NRRL 5208 (R)	0	0	17	0	9	340
<i>Thermoascus thermophilus</i> NRRL 5208 (BK)	77	4	19	1733	84	422
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> NRRL 6429 (R)	0	10	22	0	200	440
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> NRRL 6429 BK)	0	3	6	0	58	129
<i>Thermomyces lanuginosus</i> TUB F-31 (BK)	20	0	75	400	9	1503
<i>Thermomyces lanuginosus</i> TUB F-31 (R)	0	34	28	0	688	565
<i>Thermoascus aurantiacus</i> TUB F-43 (BK)	2	2	33	40	47	661
<i>Thermoascus aurantiacus</i> TUB F-43 (R)	2	1	18	36	18	354
<i>Thermomyces lanuginosus</i> TUB F-48 (BK)	0	5	35	0	93	708
<i>Thermomyces lanuginosus</i> TUB F-48 (R)	0	5	35	0	93	699
<i>Thermomyces lanuginosus</i> ATCC 38.905 (BK)	0	3	42	0	42	839
<i>Thermomyces lanuginosus</i> ATCC 38.905 (R)	0	1	11	0	18	220
<i>Thermomyces lanuginosus</i> CBS 224.63 (BK)	6	5	25	120	106	491
<i>Thermomyces lanuginosus</i> CBS 224.63 (R)	4	4	74	80	73	1486
<i>Thielavia terrestris</i> NRRL 8126 (BK)	14	2	20	280	34	397
<i>Thielavia terrestris</i> NRRL 8126 (R)	5	2	28	100	32	553

^a Rövidítések: BK: búzakorpa (10 % olivaolajjal kiegészített), R: repcemag; ^b Az 1 mU/ml-nél kisebb aktivitásokat 0-nak vettük;

4. táblázat: Nem identifikált termofil fonalgombák hidrolázaktivitása, szilárd fázisú fermentációval nyert mintákban

Gombatorzs (táptalaj) ^a	Hidrolázaktivitás ^b					
	[mU/ml felülúszó]			[mU/g szárazanyag]		
	Oliva	<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -NPB	Oliva	<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -NPB
TUB F-982 (BK)	8	4	43	80	80	856
TUB F-982 (R)	0	3	22	0	58	439
TUB F-983 (BK)	0	1	9	0	27	171
TUB F-983 (R)	0	2	22	0	31	439
TUB F-985 (BK)	0	12	15	0	248	310
TUB F-985 (R)	0	35	50	0	699	997
TUB F-986 (BK)	0	6	0	0	115	0
TUB F-986 (R)	0	34	50	0	693	1008
TUB F-987 (BK)	0	1	0	0	12	0
TUB F-987 (R)	0	0	0	0	0	0
TUB F-914 (BK)	0	2	17	0	37	337
TUB F-914 (R)	0	3	48	0	51	955
TUB F-1003 (BK)	0	3	38	0	61	777

^a Rövidítések: BK: búzakorpa (10 % olivaolajjal kiegészített), R: repcemag; ^b Az 1 mU/ml-nél kisebb aktivitásokat 0-nak vettük;

2.4. IRODALOM

1. Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M; Witholt, B.: *Nature*, **409**, **2001**, 258-268.
2. Bóda, V.: *Környezetvédelem*, 3-4, **2002**, 41.
3. Nyeste, L.: *Magyar Kémikusok Lapja*, **6**, **1970**, 280-286.
4. Nyeste, L.: *Magyar Kémikusok Lapja*, **7**, **1970**, 362-367.
5. Poppe, L.; Novák, L.: *Selective Biocatalysis: A Synthetic Approach*, VCH: Weinheim-New York, **1992**.
6. Rehm, H.-J.; Reed, G.; Pühler, A.; Stadler, P.; Kelly, D. R.: *Biotechnology: Biotransformations I and II*, Vols. 8a and 8b, 2nd Edn., Wiley-VCH: Weinheim, **1998**.
7. Faber, K.: *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4th Ed., Springer: Berlin, **2000**.
8. Kirk, O.; Borchert, T. V.; Fuglsang, C. C.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, **2002**, 345–351.
9. Ogawa, J.; Shimizu, S.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, **2002**, 367–375.
10. Schmid, A.; Hollmann, F.; Park, J. B.; Bühler, B.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, **2002**, 359–366.
11. Straathof, A. J. J.; Panke, S.; Schmid, A.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, **2002**, 548–556.
12. Mamoli, L.; Vercellone, A.: *Berichte 70B*, **1937**, 470-471.
13. Kráml, A.; Horváth, J.: *Nature*, **162**, **1948**, 619.
14. Horváth, J.; Kráml, A.: *Arch. Biol. Hung.*, **18**, **1948**, 19-24.
15. Peterson, D.H.; Murray, H. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, **1952**, 1871-1875.
16. Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C.: *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH: Weinheim, **1**, **2000**, 6-106.
17. Sevel, B.: *Biomérnöki muveletek és folyamatok*, Muegyetemi kiadó: Budapest, **1998**.
18. Hüge-Jensen, B.: *Ind. Biotechnol.*, (Eds.: Malik, V. S.; Sridhar, P.), Oxford & IBH: New Delhi, **1992**, 273-284, [*Chem. Abstr.* **120**, **1994**, 157142].
19. Grote, M. R.; Geurtsen, J. P. T.; Van Putte K. P. A. M.: (Unilever N.V., Netherlands), PCT Int. Appl. WO 9701632 A1, **1997** [*Chem. Abstr.*, **126**, **1997**, 154447];
20. Christensen, M. W.; Kirk, O.; Pedersen C.: (Novo Nordisk A/S, Denmark), PCT Int. Appl. WO 9933964 A1, **1999** [*Chem. Abstr.*, **131**, **1999**, 99275];
21. Pedersen, S.; Larsen, A. M.; Aasmul P.: (Novo Nordisk A/S, Denmark), PCT Int. Appl. WO 9522606 A1, **1995** [*Chem. Abstr.*, **123**, **1995**, 50119]
22. Fuglsang, C. C.; Okkels, J. S.; Pertersen, D. A.; Patkar, S. A.; Thellersen, M.; J. Vind, J.; Halkier, T.; Joergensen, S. T.: (Novo Nordisk A/S, Denmark), PCT Int. Appl. WO 9704078 A1, **1997** [*Chem. Abstr.*, **126**, **1997**, 208956]
23. Eigtved, P.: (Novo Industri, Denmark), PCT Int. Appl. WO 8906278 A1, **1989** [*Chem. Abstr.*, **111**, **1989**, 170089];
24. Oh, S. W.; Gaskin, D. J. H.; Kwon, D. Z.; Vulfson, E. N.: *Biotechnol. Lett.*, **23**, **2001**, 563-568.
25. Arnold, F. H.; Moore, J. C.: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **58**, **1997**, 1-14.
26. Marrs, B.; Delagrave, S.; Murphy, D.: *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**, **1999**, 241-245.
27. Gaskin, D. J. H.; Bovagnet, A. H.; Turner, N. A.: *Biochem. Soc. Trans.*, **25**, **1997**, 15S.
28. International Union of Biochemistry, *Enzyme Nomenclature 1984*, Academic Press: New York, **1984**.
29. Dixon, M.; Webb, E. C.: *Enzymes*, 3rd Ed., Academic Press: Orlando, **1979**.
30. Barman, T. E.: *Enzyme Handbook*, Springer Verlag: Berlin, **1985**.
31. <http://www.nationalenzyme.com/terms.htm>
32. Hodgson, J.: *Biotechnology*, **12**(8), **1994**, 789-790.

33. Scheper, T.; Makryaleas, K.; Nowotny, C.; Likidis, Z.; Tsikas, D.; Schugerl, K.: *Ann N Y Acad Sci.* 501, **1987**, 165-170.
34. Poppe, L.: *Biokatalitikus folyamatok szintetikus alkalmazása és mechanizmusvizsgálata*; MTA doktori értekezés; Budapest, **2000**, 18-25; 91-96.
35. Klibanov, A. M.: *CHEMTECH*, 16, **1986**, 354-359.
36. Zaks, A.; Klibanov, A. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82, **1985**, 3192-3196.
37. Nikolova, P.; Ward, O.P.: *J. Ind. Microbiol.*, 12, **1993**, 76-80.
38. Tramper, J.: *Biocatalysis in non-conventional media*, Elsevier: Amsterdam, New York, **1992**.
39. Cabral, J. M.; Aires-Barros, M. R.; Pinheiro, H.; Prazeres, D. M.: *J. Biotechnol.*, 59, **1997**, 133-143.
40. Khmelnitsky, Y. L.; Rich, J. O.: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3, **1999**, 47-53.
41. Lamare, S.; Legoy, M. D.: *Trens. Biotechnol.*, 11, **1993**, 413-148.
42. Pasta, P.; Mazzola, G.; Carrea, G.; Riva, S.: *Biotechnol Lett.*, 11, **1989**, 643-645.
43. Haring, G.; Luisi, P. L.; Meussdoerffer, F.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 127(3), **1985**, 910-915.
44. Martinek, K.; Lerashov, A. V.; Khmelnitsky, Y. L.; Klyachko, N.; Berezin, I. V.: *Science.* 218(4575), **1982**, 889-891.
45. Shield, J. W.; Ferguson, H. D.; Bommarius, A. S.; Hatton, T. A.: *Ind. Eng. Chem. Fundam.* 25(4), **1986**, 603-612.
46. Sheper, T.; Likidis, Z.; Makryales, K.; Nowotny, C.; Schuegerl, K.: *Enzyme Microb. Technol.*, 9, **1987**, 625-631.
47. Sanchez-Ferrer, A.; Gracia-Camona, F.: *Enzyme. Microb. Technol.* 16, **1994**, 409.
48. Gerhartz, W.: *Enzymes in Industry: Production and Application*, VCH, Weinheim, **1990**
49. Priest, F. G.: *Encyclopedia of Microbiology*, Academic Press, New York, 2, **1992**.
50. Jakucs, E.; Vajna, L.: *Mikológia*, Agroinform Kiadó: Budapest, **2003**.
51. Pandey, A.; Benjamin, S.; Soccol, C., R.; Nigam, P.; Krieger, N.; Soccol, V. T.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29, **1999**, 119-131.
52. Winkler, K. W.; Ulrich, K.; Stuckmann, M.: *J. Bacteriol.*, 138, **1979**, 663-670.
53. Iwai, M.; Okumura, S.; Tsujisaka, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 44, **1980**, 2731-2732.
54. Nishio, T.; Takanashi, K.; Yoshimoto, T.; Kodess, Y.; Satio, Y.; Inada, Y.: *Biotechnol. Lett.*, 9, **1987**, 187-190.
55. Godfredson, S. E.: *Microbial Enzymes and Biotechnology* (ed.: Fogarty, W. M. and Kelly, E. T.), Elsevier, **1990**, 255-273.
56. Brune, A. K.; Gotz, F.: *Microbial Degradation of Natural Products* (ed.: Winkelmann, G.), VCH: Weinheim, **1992**, 243-263.
57. Nishio, T.; Chikano, T.; Kamimura, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 51, **1987**, 181-187.
58. Brockerhoff, H.; Jensen, R.: *Lipolytic Enzymes*, Academic Press: New York, **1974**, 1-340.
59. Watkinson, S. C.; Carlile, M. J.; Gooday, G. W.: *The Fungi*, 2nd ed., Academic: San Diego - London, **2001**.
60. Arora, D. K.; Elander, R. P.; Mukerji, K. G.: *Fungal Biotechnology*, Marcel Dekker: New York, **1992**.
61. Lalithakumari, D.: *Fungal Protoplast: A Biotechnological Tool*, Science Pub.: Enfield, **2000**.
62. *Enzyme Technologies for Pharmaceutical and Biotechnological Applications*, (Eds.: H. A. Kirst, W.-K. Yeh, M. J. Zmijewski), Marcel Dekker: New York, **2001**.
63. Bradoo, S.; Rathi, P.; Saxena, R. K.; Gupta, R.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 51, **2002**, 115-20.

64. Maheshwari, R.; Bharadwaj, G.; Bihat, M. K.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, **2000**, 461-488.
65. *Thermophilic Moulds in Biotechnology* (Eds.: B. N. Johri, T. Satyanarayana, J. Olsen), Kluwer Academic: Dordrecht, **1999**.
66. *Lipolytic Enzymes*, (Eds.: H. Brockerhoff, R. Jensen), Academic Press: New York, **1974**.
67. Jaeger, K.-E.; Eggert, T.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, **2002**, 390–397.
68. Johri, B. N.; Jain, S.; Chouhan, S.: *Proc. Ind. Acad. Sci., Plant Sci.*, **94**, **1985**, 175-196.
69. Johri, B. N.; Ahmad S.: *Thermophilic Moulds in Biotechnology* (Eds.: Johri, B. N. ; Satyanarayana, T.; Olsen, J.), Kluwer Academic: Dordrecht, **1999**, 219-243,
70. Alcantara, A. R.; Fuentes, I. E.; Sinisterra, J. V.: *Chem. Phys. Lipids*, **93**, **1998**, 169-184.
71. Pandey, A.; Selvakumar, P: *Curr. Sci.*, **77**, **1999**, 149-162.
72. *Worthington Enzyme Manual*. Worthington Biochemical Corporation, Freehold: New Jersey, USA, **1993**.
73. Bódai, V.; Peredi, R.; Bálint, J.; Egri, G.; Novák, L.; Szakács, Gy.; Poppe, L.: *Adv. Synth. Catal.*, **345**, **2003**, No.6+7, 811-818. (II. Melléklet)
74. Satyanarayana, T.; Chavant, L.; Montant, C.: *Fr. Trans. British Mycol. Soc.*, **85**, **1985**, 727-730.
75. Satyanarayana, T.; Johri, B.: *Curr. Sci.*, **50**, **1981**, 680-682.
76. Ogundero, V. W.: *Mycologia*, **72**, **1980**, 118-126.
77. Satyanarayana, T.; Chavant, L.; Montant, C.: *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **85**(4), **1985**, 727-730.
78. Wu, W.; Schulein, M.; Kauppinen, M. S.; Stringer, M. A.: (Novo Nordisk A/S, Den.). PCT Int. Appl. WO 2000-DK450 20000811., **2001**, 89. [*Chem. Abstr.*, **134**, **2003**, 204347.].
79. Okkels, J. S. (Novo Nordisk, Denmark), PCT Int. Appl. WO 9707205 A1, **1997** [*Chem. Abstr.*, **126**, **1997**, 234419.].
80. Kalvis, T.; Sanzhimitupova, R. D.: *Izv. Sibirsk. Otdel. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol. Nauk*, **1979**, 130-135. [*Chem. Abstr.*, **93**, **1980**, 22508.].
81. Soru, E.; Savulescu, A.; Instrati, M.; Lazar, V.: *Rev. Roumaine Biol., Ser. Botan.*, **10**, **1965**, 419-427. [*Chem. Abstr.*, **64**, **1966**, 86549.].
82. Johri, B. N.; Alurralde, J. L.; Klein, J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, **1990**, 367-371.
83. Johri, B. N.; Alurralde, J. L.; Kressdorf, B.; Klein, J.: *J. Microb. Biotechnol.*, **6**, **1991**, 44-57.
84. Johri, B. N.; Alurralde, J. L.; Kressdorf, B.; Klein, J.: *GBF Monographs*, **16**, **1991**, 353-359.
85. Tsutsumi, N.; Vind, J.; Patkar, S. A.: (Novozymes A/S, Denmark), PCT Int. Appl. WO 0266622 A2, **2002** [*Chem. Abstr.*, **137**, **2002**, 197529.].
86. Oso, B. A.: *Can. J. Botany*, **56**, **1978**, 1840-1843.
87. Fan, X.; Matthey, M.: *Biotechnol. Lett.*, **21**, **1999**, 1071-1076.
88. Meki, M. A.; Shabeb, M. S. A.; Ammar, M. S. A.: *Egypt. J. Microbiol.*, **29**, **1995**, 261-270.
89. El-Zayat, S. A.: *Al-Azhar J. Microbiol.*, **43**, **1999**, 7-15. [*Chem. Abstr.*, **133**, **2000**, 319328.].
90. Vorderwülbecke, T.; Kieslich, K.; Erdmann, H.: *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, **1992**, 631-639.
91. Bódai, V.; Peredi, R.; Bálint, J.; Novák, L.; Poppe, L.; Szakács, Gy.: *XXIII. Kémiai Eloadói Napok*, Szeged, **2000**. November 20-22.

3. FEJEZET

BIOKATALIZÁTOROK TESZTELÉSE SZERVES KÉMIAI SZINTÉZISEKBEN

3.1. BOKATALIZÁTOROK, BOKATALÍZIS	29
3.2. A BOKATALÍZIS ALKALMAZÁSA SZTEREOSZELEKTÍV ÁTALAKÍTÁSOKRA	29
3.2.1. ENANTIOTÓP SZELEKTÍV BIOTRANSZFORMÁCIÓK ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE	31
3.2.2. ENANTIOMER SZELEKTÍV BIOTRANSZFORMÁCIÓK ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE	32
3.2.2.1. Az enzimkatalizált kinetikus rezolválás reakciókinetikája	32
3.2.3. LIPÁZOK MUKÖDÉSI MECHANIZMUSA	34
3.3. VIZSGÁLT ENANTIOTÓP SZELEKTÍV BIOTRANSZFORMÁCIÓK	36
3.3.1. A 2-ACILOXI-1,3-PROPÁNDIOLOK ELOÁLLÍTÁSA ÉS ENZIMES ACILEZÉSE	36
3.3.1.1. Elozmények	36
3.3.1.2. A 2-es helyzetben aciloxi-szubsztituált 1,3-propándiolok eloállítása és enzimes átalakítása	38
3.3.1.2.1. A 2-aciloxi-1,3-propándiolok eloállítása	39
3.3.1.2.2. A 2-benzoiloxipropán-1,3-diol enzim katalizált acilezése	40
3.3.1.2.3. A 2-aciloxipropán-1,3-diolok enzimkatalizált acilezése	42
3.4. VIZSGÁLT ENANTIOMER SZELEKTÍV REAKCIÓK	44
3.4.1. A TRANSZ-2-ACETOXICIKLOALKÁN-1-OL ENZIMES ACILEZÉSE	44
3.4.1.1. Elozmények	44
3.4.1.2. transz-2-Acetoxi-cikloalkán-1-olokkal végzett kísérletek	46
3.4.1.2.1. A racém transz-2-acetoxicikloalkán-1-olok enzimkatalizált acilezése	46
3.4.1.2.2. A racém transz-2-acetoxicikloalkán-1-olok Lipase AK-val katalizált acilezése és hidrolízise	50
3.4.1.2.3. A racém transz-2-acetoxiciklohexán-1-ollal végzett extrakciós kísérletek	50
3.4.2. AZ 1-FENILETANOL ENZIMES ACILEZÉSE	51
3.4.3. A GLICERIN-KARBONÁT ENZIMES REAKCIÓI	54
3.4.3.1. Elozmények	54
3.4.3.2. A glicerín-karbonát enzimes acilezése	54
3.4.3.2.1. A glicerín-karbonát enzimes acilezésének oldószerfüggése	56
3.4.3.2.2. A glicerín-karbonát enzimes acilezése szilárd fázisú fermentációval eloállított készítményekkel	57
3.4.3.2.3. A glicerín-karbonát-acetát enzimes hidrolízise/alkoholízise	58
3.4.4. HETEROCIKLUSOS ALKOHOLOK ENZIMES REAKCIÓI	58
3.4.4.1. Az 1-(benzofurán-2-il)etanol enzimes acilezése	59
3.4.4.1.1. Elozmények	59
3.4.4.1.2. Az 1-(benzofurán-2-il)etanol enzimikus átalakítása	59
3.4.4.2. Az 1-(benzotiazol-2-il)etanol enzimkatalizált acilezése	63
3.4.4.2.1. Az 1-(benzotiazol-2-il)etanol enzimes átalakítása	63
3.4.5. A RACÉM 3-KLÓRPROPÁN-1,2-DIOL ENZIMES KINETIKUS REZOLVÁLHATÓSÁGÁNAK VIZSGÁLATA	67
3.4.6. A BUTE-3A, BUTE-3B ENZIMKÉSZÍTMÉNYEKSEL KATALIZÁLT FOLYAMATOK	68
3.5. KISÉRLETI RÉSZ	70
3.5.1. FELHASZNÁLT ESZKÖZÖK	70
3.5.2. FELHASZNÁLT ANYAGOK	70
3.5.3. MÓDSZEREK	70
3.5.4. SZINTETIKUS ELJÁRÁSOK	71
3.6. IRODALOM	80

3. BOKATALIZÁTOROK TESZTELÉSE SZERVES KÉMIAI SZINTÉZISEKBEN

Bár számos termofil fonalagomba hidroláz (lipáz/észteráz) aktivitását leírták már, eddig kevés publikáció született biokatalitikus folyamatokban történő felhasználásukról^{1,2,3}. Doktori munkám során ezt a hiányt próbáltuk pótolni, az általunk előállított biokatalizátorok enantiotóp és enantiomer szelektív folyamatokban történő tesztelésével.

3.1. BOKATALIZÁTOROK, BOKATALÍZIS

A vegyiparban és élelmiszeriparban már régóta alkalmaznak biokatalitikus eljárásokat¹¹, mint amilyen az etanol és ecetsav gyártása, a C-vitamin előállítása, a szteroid vegyületek átalakítása, a keményítő hidrolízise, stb.


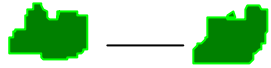

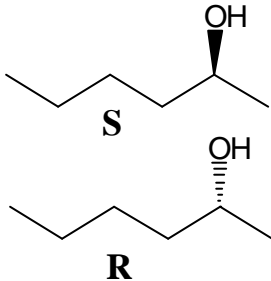
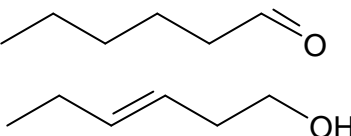
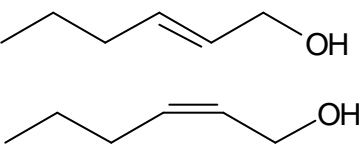
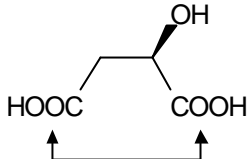
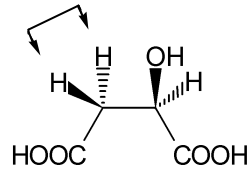
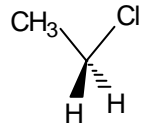
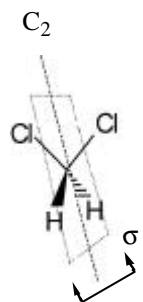
A biokatalizátorok feldolgozottságuk szerint két nagy csoportba sorolhatók úgymint egész sejtek, főként mikroorganizmusok illetve állati-, növényi- vagy mikrobiális eredetű enzimek⁸. A mikrobiális *in vivo* és mikrobiális eredetű enzimkészítmények alkalmazása és további kutatása mellett számos érv szól, úgymint széles faj és enzimspektrum és a változatos szubsztrátspecifitás lehetősége (ld. 2.1.1 fejezetet is).

A természetben az enzimek jelentős része a sejtben belül fejti ki hatását, számos esetben egyéb sejtalkotókkal integrált módon, úgy mint a membránba ágyazott enzimek, melyek inaktívak a membránkomponensek nélkül. Ezek az enzimek környezetükből kiszakítva teljesen elveszíthetik aktivitásukat (enzimpreparátum nem készíthető belőlük). Az enzimek, hasonlóan más katalizátorokhoz, a reakciókat az aktiválási energia csökkentésével gyorsítják.

3.2. A BOKATALÍZIS ALKALMAZÁSA SZTEREOSZELEKTÍV ÁTALAKÍTÁSOKRA

Természetes szubsztrátjaik átalakítása során az enzimek nagyfokú szelektivitást mutatnak, de mesterséges szubsztrátokkal szemben is igen szelektívek lehetnek^{4,5,11}. A szerves molekulák (és általában a molekulák) viselkedése más rendszerekkel kölcsönhatásba lépve nagymértékben függ szimmetriaviszonyaiktól. Az enzim másodlagos és harmadlagos szerkezetét tekintve is aszimmetrikus, melynek oka az, hogy a fehérjelánc felépítésében az önmagukban is királis aminosavaknak is csak a természetes enantiomerjei vesznek részt. Ennek természetes következménye a biokatalizátorok sztereoszelektivitása, pl. hogy egy enzim királis molekulák enantiomerjeivel nem egyformán lép kölcsönhatásba (*enantiomer szelektivitás*), vagy hogy az enzimmatalizált reakcióban prokirális csoportok, illetve oldalak is különbözőek (*enantiotóp szelektivitás*). Az enzimeket ezen sajátosságuk teszi felhasználhatóvá optikailag aktív anyagok szintetikus előállítására. Természetesen a biokatalizátorok alkalmasak diasztereomerek eltérő sebességgel történő átalakítására (*diasztereomer szelektivitás*), vagy diasztereotóp csoportok, illetve oldalak közti különbségtételre is (*diasztereotóp szelektivitás*). A sztereoszelektív átalakítások lehetőségén túl az enzimekre jellemző lehet még az azonos szerkezetű, de eltérő konstitúciójú helyekhez kapcsolódó csoportok megkülönböztetése (*regioszelektivitás*) vagy a kémiailag hasonló viselkedésű, de szerkezetükben különböző csoportok szelektív átalakítása (*kemoszelektivitás*).

1. táblázat: Sztereokémiai fogalmak és definíciók

		
Egy objektumra vonatkozó fogalmak	Két objektum viszonyára vonatkozó fogalmak	Egy objektumon belüli részek viszonya
<p><u>Konstitúció:</u></p> <p>A molekulán belüli atomok száma, minősége, egymáshoz való kapcsolódásuk \Rightarrow 2D-ban: maga a kötési mátrix.</p> <p><u>Konfiguráció:</u></p> <p>A molekula egy részének csak sztereodeszkriptorokkal leírható 3D, szerkezete</p> <p><u>Sztereodeszkriptorok:</u></p> <p>Molekula részegységének térbeli elrendeződését írja le. pl.: E/Z; R/S....</p> <p><u>Királis:</u></p> <p>Olyan objektum, amelyik nem hozható fedésbe saját tükörképével. pl.:</p> <div style="text-align: center;">  <p>S</p> <p>R</p> </div> <p><u>Konformáció:</u></p> <p>Az összes lehetséges 3D szerkezet, pl. megengedi az egyszeres kötés körüli elfordulást is.</p>	<p><u>Izomerek:</u></p> <p>Olyan molekulák, melyek összegképlete azonos, mégis szerkezetiileg különböznek egymástól.</p> <p><u>Konstitúciós izomerek:</u></p> <p>Olyan molekulák, melyek konstitúciójukban különböznek. pl.:</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p><u>Sztereoizomerek:</u></p> <p>Konfigurációjukban különböznek, konstitúciójukban nem. pl.:</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p><u>Diasztereomerek:</u></p> <p>Azon sztereoizomerek, amelyek nem enantiomerek</p> <p><u>Enantiomerek:</u></p> <p>Azon sztereoizomerek, amelyek saját tükörképükkel sem rotációval, sem translációval nem hozhatók fedésbe.</p>	<p><u>Konstitúciójukban különböző csoportok:</u></p> <p>Ha eltérő konstitúciójú helyhez csatlakoznak a molekulán belül. pl.:</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p><u>Diasztereotóp csoportok:</u></p> <p>Közöttük semmiféle szimmetriaviszony nincs pl.:</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p><u>Enantiotóp csoportok:</u></p> <p>σ-szimmetriasík köti őket össze. A molekula akirális, de ha az egyik csoport megváltozik, királissá válik \Rightarrow prokirális molekula. pl.:</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p><u>Homotóp csoportok:</u> σ-szimmetriasík és C_n szimmetriatengely köti őket össze. Akirális és királis környezetben is megkülönböztethetetlenek.</p> <div style="text-align: center;">  </div>

Ha a biokatalizátorokat sztereoszelektív átalakításokra használjuk fel, a reakciókat két csoportba sorolhatjuk⁶. Az első csoportban **egyetlen szubsztrát** sztereoheterotóp csoportjainak vagy oldalainak átalakítása során nyilvánul meg a biokatalízis szelektivitása (a szubsztrátum szimetriaviszonyaitól függően diasztereotóp szelektív vagy enantiotóp szelektív folyamatok). A második csoportba azok az átalakítások tartoznak, ahol **két vagy több sztereoizomer szubsztrátum** szelektív átalakítása játszódik le, oly módon, hogy az egyik sztereoizomer átalakulása dominál. Ilyen folyamatok például a diasztereomer, illetve enantiomer szelektív reakciók.

A sztereokémiai fogalmak összefoglalását az 1. táblázat szemlélteti.

3.2.1. ENANTIOTÓP SZELEKTÍV BIOTRANSZFORMÁCIÓK ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE

Amint az az előző fejezetekből már kiderült, az enzimek nagyfokú szelektivitással rendelkeznek. Ha a biokatalizátorokat sztereoszelektív átalakításokra használjuk fel, a szubsztrát szerkezete alapján lehetőségünk van egyetlen szubsztrát sztereoheterotóp csoportjainak vagy oldalainak szelektív átalakítására (enantiotóp vagy diasztereotóp átalakítás).

Enantiotóp szelektív folyamatokban egy prokirális vegyület enantiotóp oldalainak vagy enantiotóp csoportjainak szelektív átalakítása történik. A folyamat szintetikus szempontból igen kedvező, mivel a prokirális vegyületekből kiindulva enantiotópszzelektív átalakítással a teljes anyagmennyiség a termék kívánt enantiomerjévé alakítható. Lehetőségünk van egy fejlettebb termék egy vagy akár mindkét enantiomerjének előállítására, a reakciók sorrendjének megfelelő megválasztásával²².

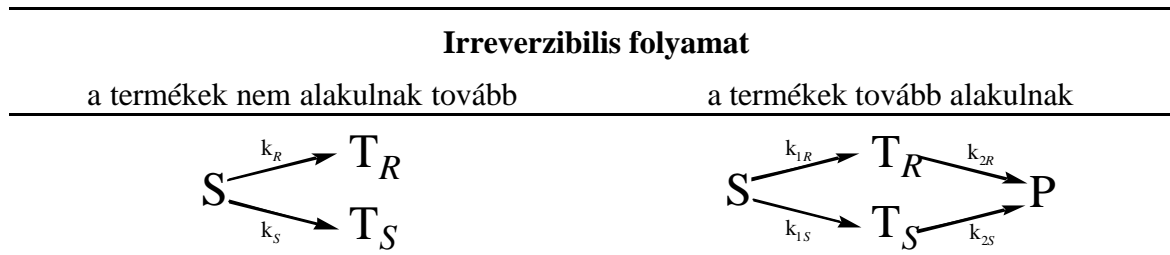
Az enantiotóp szelektív reakciók esetében a szelektivitás (E') - az irreverzibilitás feltételének teljesülése esetén - az enantiomer szelektív folyamatok E mértékéhez igen hasonlóan adható meg (ahol k_{kat} : katalitikus állandó, turnover number és K_m : Michaelis-Menten állandó)¹¹:

$$E = (k_{kat} / K_m)_1 / (k_{kat} / K_m)_2$$

Az enantiotóp folyamatok esetén legegyszerűbben értelmezhető az az eset, amikor a folyamat irreverzibilis és a termékek (T_R , T_S) nem alakulnak tovább. Ekkor a folyamat szelektivitását és így a termék enantiomer tisztaságát a két folyamat sebességi állandóinak aránya (k_R/k_S) szabja meg. Ebben az esetben a termék enantiomer összetétele független a konverziótól.

Másik, összetettebb esetben az irreverzibilis folyamatban képződött termékek képesek tovább alakulni (ld. 2. táblázat). Ilyenkor az első reakciólépésben az enantiotóp csoportok közül az egyik gyorsabban alakul át (pl. $k_{1R} > k_{1S}$). A második lépésben ekkor a termékek közül az alakul át gyorsabban, ahol a biokatalizátor a kedvezőbb térbeli helyzetű csoportot alakíthatja át (pl. $k_{2R} < k_{2S}$). Ebből következik, hogy az ilyen folyamatok esetén a köztes termék enantiomertisztasága a konverzió növelésével a termék rovására javítható²².

2. táblázat: Enantiotóp szelektív reakciók



3.2.2. ENANTIOMER SZELEKTÍVBIOTRANSZFORMÁCIÓKÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE

A biokatalízis tiszta enantiomereket eredményező egyik leggyakoribb alkalmazásánál azt használják ki, hogy a biokatalizátor képes lehet csak az egyik enantiomer szelektív átalakítására. Ha a folyamat szelektivitása teljes, akkor a reakció a racém szubsztrátra vonatkoztatott 50 %-os konverzió elérésekor (ami a reagálni képes enantiomer teljes felhasználását jelenti) leáll. Ekkor mind a termék, mind a visszamaradó szubsztrát enantiomertiszta^{7, 8}. Ennek megfelelően ebben a folyamatban egy adott tiszta enantiomer racém szubsztrátra vonatkoztatott legmagasabb elméleti termelése 50 %.

Általában a szintetikus reakciók során az egyik enantiomer előállítása kívánatos. Ha a kívánt enantiomerforma keletkezett a reakció során, akkor további lépéssel nem szükségesek. Ha a nem kívánt enantiomer, akkor ezen termék racemizációjával, visszaforgatással az 50 %-os termelési határ és a kívánt enantiomer akár 100 % termeléssel előállítható. Megoldást jelenthet továbbá, ha a nem kívánt enantiomer inverzióval a kívánt enantiomerré alakítható. Ennek a folyamatnak a biokatalitikus megoldása igen ritka, általában az enantiomer szelektív biokatalitikus lépést az inverzióra szolgáló kémiai lépésekkel együtt alkalmazzák.

Amennyiben az enantiomer szelektivitás mértéke nem teljes, a termékek enantiomertisztasága az alkalmazott biokatalizátor tulajdonságain túl jelentős mértékben függ a reakciókörülményektől és attól, hogy a folyamat reverzibilisnek, illetve irreverzibilisnek tekinthető-e²².

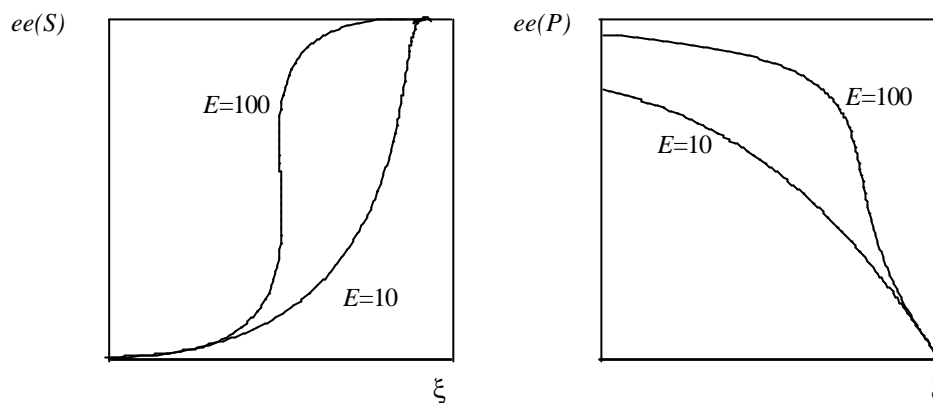
3.2.2.1. Az enzimekatalizált kinetikus rezolválás reakciókinetikája

Az enzimes rezolválások jellemzésére az E dimenzió nélküli méroszám használatos, melyet a Michaelis-Menten enzimkinetika két kompetitív enzimreakciójának (a kétféle enantiomer átalakítása; R és S) k_{kat} (turnover number) és K_m (Michaelis-Menten állandó) értékeiből az alábbi módon lehet kifejezni (irreverzibilis reakciókat feltételezve):

$$E = (k_{\text{kat}} / K_m)_R / (k_{\text{kat}} / K_m)_S = \ln(1-\xi)(1-ee(S)) / \ln(1-\xi)(1+ee(S))$$

$ee(S)$: a szubsztrát enantiomertisztasága; ξ : a konverzió

1. ábra: Irreverzibilis kinetikus enzimikus reakció



Az enantiomer szelektivitás (E) értéke több mért paraméter függvényében kifejezhető:

1. A konverzió ξ és a termék enantiomer összetételéből $ee(P)$ ⁹:

$$E_{\xi, ee(P)} = \ln[1 - \xi(1 + ee(P))] / \ln[1 - \xi(1 - ee(P))]$$

2. A konverzió ξ és a szubsztrát enantiomer összetételéből $ee(S)$ ⁹:

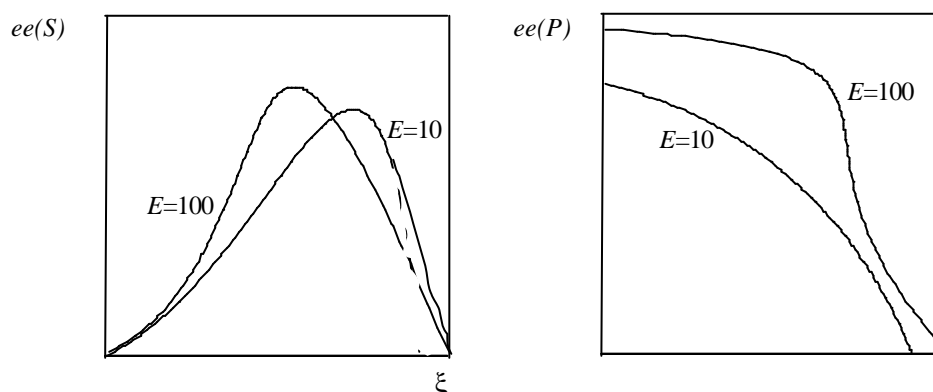
$$E_{\xi, ee(S)} = \ln[1 - \xi(1 - ee(S))] / \ln[(1 - \xi)(1 + ee(S))]$$

3. A termék enantiomer összetételéből $ee(P)$ és a szubsztrát enantiomer összetételéből $ee(S)$ ¹⁰:

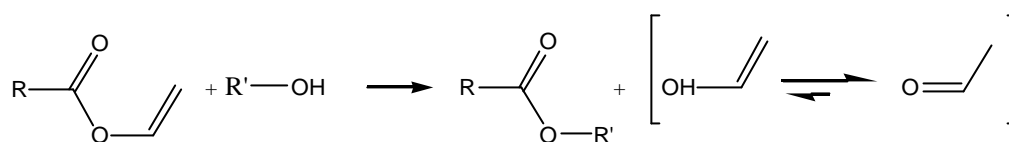
$$E_{ee(P), ee(S)} = \ln[(1 - ee(S))/(1 + ee(S)/ee(P))] / \ln[(1 + ee(S))/(1 + ee(S)/ee(P))]$$

A kezdetben racém szubsztrát enantiomertisztasága a reakció előrehaladtával növekszik. A kívánt enantiomertisztaság elérésekor célszerű a reakciót leállítani, ellenkező esetben a szubsztrát mennyisége túlságosan lecsökken. A termék oldalát tekintve sokkal kedvezőtlenebb a helyzet, mivel csak igen magas E érték esetén állítható elő megfelelő enantiomertisztaságú anyag. 40-50 %-os konverzió után a termék enantiomertisztasága gyorsan csökken, majd 100 %-nál racémmá válik.

2. ábra: Reverzibilis kinetikus enzimikus rezolválás



Amennyiben a reakció reverzibilis, az ellenkező irányú folyamat – általában azonos enantiomer preferenciát mutat – a rezolválás hatékonyságát rontja. Az 2. ábra ezt az esetet mutatja be, vagyis amennyiben lehetőség van a reakció irreverzibilissé tételére, az enantiomertisztaságok nagymértékben növelhetőek. Ennek gyakorlati megvalósítása acilezési reakciók esetén például enolészterekkel történő átészterezés.



3.2.3. LIPÁZOK MUKÖDÉSI MECHANIZMUSA

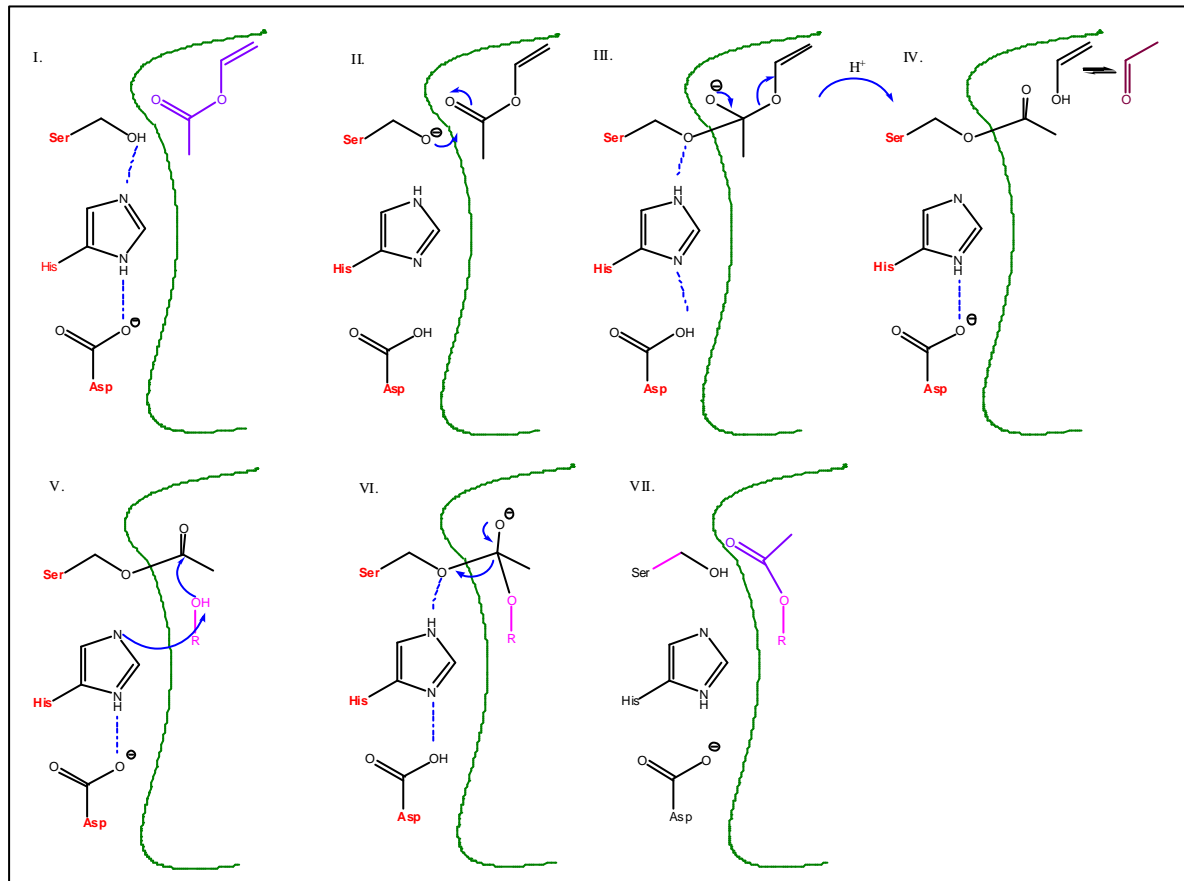
Királis alkoholok előállításának elterjedt módja a hidrolitikus enzimek, lipázok alkalmazása biokatalitikus folyamatokban^{11, 12}. A természetben a különböző eredetű lipázok változó reakcióspecifitással rendelkeznek, mely az enzimfehérje szerkezetbeli eltéréseivel, ezáltal specifikusságával magyarázható. Vannak olyan enzimek, melyek a rövidláncú zsírsavakat (ecetsav, vajsav, kaprilsav, kapronsav, stb.), mások a telítetlen zsírsavakat (olajsav, linolsav, linolénsav stb.) részesítik előnyben. Az enzimek egy része nem szubsztrát specifikus, véletlenszerűen hasítja le a zsírsavat a trigliceridről. Ezt a tulajdonságukat felhasználva a lipázok jól alkalmazhatóak egyes biotranszformációs lépések megvalósítására.

Az aminosavak oldalláncaiban jelen lévő csoportok (amino-, karboxil-, hidroxil-, tio-, stb.) a fehérjéket potenciálisan savas, bázikus, nukleofil vagy akár elektrofil katalízisre is képessé teszik. A szubsztrátok kötődhetnek kémiai, hidrogénhidás kötésekkel, elektrosztatikus és egyéb erőkkel a polipeptid lánc(ok) egy meghatározott helyére. Az enzimfehérje ilyen kitüntetett szakaszát aktív centrumnak nevezzük. Az enzim aktív centrumához kötött szubsztrát átalakítását a megfelelő térbeli közelségben elhelyezkedő funkcionális csoportok végzik. Ezek a funkcionális csoportok lehetnek a fehérjét alkotó aminosavak oldalláncaiban, de tartozhatnak a katalízist segítő, nem fehérjetermészetű kofaktorokhoz is. Az enzim egyik természetes funkciója tehát, hogy a szubsztrátot és katalízist végző funkcionális csoportokat megfelelő térbeli elrendezésbe és közelségbe hozza. A fehérjéknek azonban nem csak ez a szerepe, hanem az aktív centrumot körülvevő polipeptid védő funkciót is ellát, a nem kívánt – pl. a vizes oldattal lejátszódó – mellékreakciókat kizárva ún. „negatív katalízist”¹³ is kifejt²².

A lipázok nagy családjából ma már jónéhány szerin hidroláz jellegű lipáz enzim háromdimenziós kristályszerkezete ismert. Ezek felhasználásával értelmezhetővé vált az enzim működési mechanizmusa. A szerin hidrolázokban általában a következő aminosav-hármas felelős a katalitikus hatásért: szerin, hisztidin, aszparaginsav. Ilyen enzim például a *Pseudomonas sp.* lipáz (katalitikus triádjában résztvevő aminosavak és helyük: 87 Ser, 286 His, 264 Asp), míg egy másik lipázban, hidrolázban aszparaginsav helyett glutaminsavat tartalmaz (*Candida cylindracea* lipáz: 209 Ser, 449 His, 341 Glu).

A 3. ábra egy alkohol vinilacetáttal történő átészterezésének lipáz katalizált folyamatát mutatja be.

3. ábra: A lipázok katalitikus triádja és alkoholok vinilacetáttal történő átészterezésének reakciómechanizmusa



3.3. VIZSGÁLT ENANTIOTÓP SZELEKTÍV BIOTRANSZFORMÁCIÓK

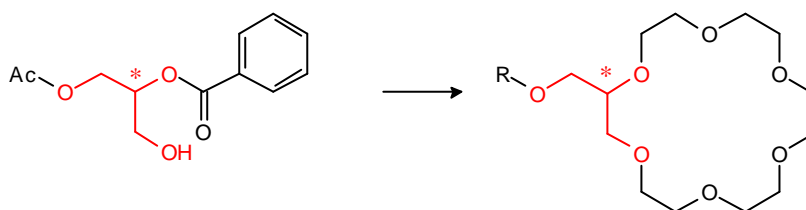
Az általunk előállított termofil fonalagombákból nyert enzimek készítményeinket enantiotóp szelektív folyamatban teszteltük. Ezen típusú reakciók közül legalaposabban a diolok vagy 1-acetilszármazékának enzimikus acilezését tanulmányozták¹⁴⁻¹⁶, de ezen kívül több közleményben szerepel a diacetátok hidrolízise, illetve alkoholízise¹⁷ is. Az enantiotóp reakciók közül a 2-szubstituált-1,3-propándiol család enzimikus acilezését vizsgáltuk

3.3.1. A 2-ACILOXI-1,3-PROPÁNDIOLOK ELOÁLLÍTÁSA ÉS ENZIMES ACILEZÉSE

3.3.1.1. Elozmények

A 2-es szénatomon aciloxicsoporttal szubsztituált prokirális propán-1,3-diolok fontos C₃ kulcsintermedierek, melyek számos biológiailag aktív molekula, mint például a foszfolipidek¹⁸, foszfolipáz A₂ inhibitorok¹⁹, PAF²⁰ (vérlemezke-aktiváló faktor) és más anyagok²¹ építőkövei. Általános szintetikus célokra is alkalmazhatóak²², segítségükkel olyan optikailag aktív vegyületeket nyerhetünk, melyek például felhasználhatóak átmeneti fém-komplexek királis ligandumjaiként, királis koronaéterek köztitermékeként (ld. 4. ábra), valamint **b**-blokkolók előállításában^{23, 24}. A **b**-blokkolókkal való szerkezeti rokonságot szemlélteti néhány példával a 5. ábra²⁵.

4. ábra: Az 1,3-propándiolok felhasználhatósága királis koronaéterek köztitermékeként

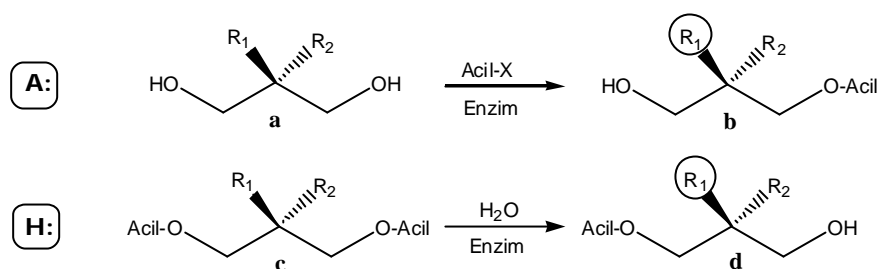


Bár az irodalomban számos 1,3-propándiol 2-es helyzetben különféleképpen szubsztituált származékával található hasonló enzimikus acilezési reakció, de legjobb tudásunk szerint a 2-es helyzetben aciloxi-szubstituált 1,3-propándiolok (tk. 2-*O*-acil-glicerinnel származékok) enzimikus átalakításait mielőttünk még senki sem tanulmányozta, holott az így nyerhető királis származékok szintetikus célokra általánosan felhasználható vegyületeknek ígérkeznek²⁶.

A 2-*O*-alkil-glicerinnel származékok (3. táblázat, R₁, R₂ = *O*-alkil, H), mint pl. a 2-*O*-metil^{29, 34}, 2-*O*-etil^{29, 34}, vagy 2-*O*-benzil-glicerinnel^{27, 29, 32, 34} enzimkatalizált acilezése optikailag aktív monoacetátokat (**2**) eredményezett. Látható, hogy mind a diacil származékok hidrolízise (**H**), mind a megfelelő diolok acilezése (**A**) elvégezhető ugyanazon enzimmal. Mivel egyazon enzim általában mindkét reakcióban ugyanazon prokirális oldalt alakítja át, ennek következményeként e két folyamat ugyanazon monoacil származék ellentétes enantiomerjeit szolgáltatja. A 3. táblázatból kitunik, hogy a monoacetát frakció enantiomertisztasága még ugyanazon enzim esetén sem azonos, melynek oka a

reakciókörülmények eltérése, a szubsztrát hozzáférése az enzim aktív centrumához, enzimmtisztaság stb. Kisebb enantiotóp szelektivitások esetén e folyamatokban az is előfordulhat, hogy ugyanazon vegyület, ugyanazon enzimmel, közel azonos reakciókörülmények között sem ad azonos enantiomertisztaságot. Ennek oka az lehet, hogy ilyenkor a hidrolízis nem áll meg a monoacetát szakaszban és így az enantiomertisztaság erosen konverziófüggővé válik.

3. táblázat: A 2-es szénatomon szubsztituált 1,3-propándiolok enzimes átalakításai



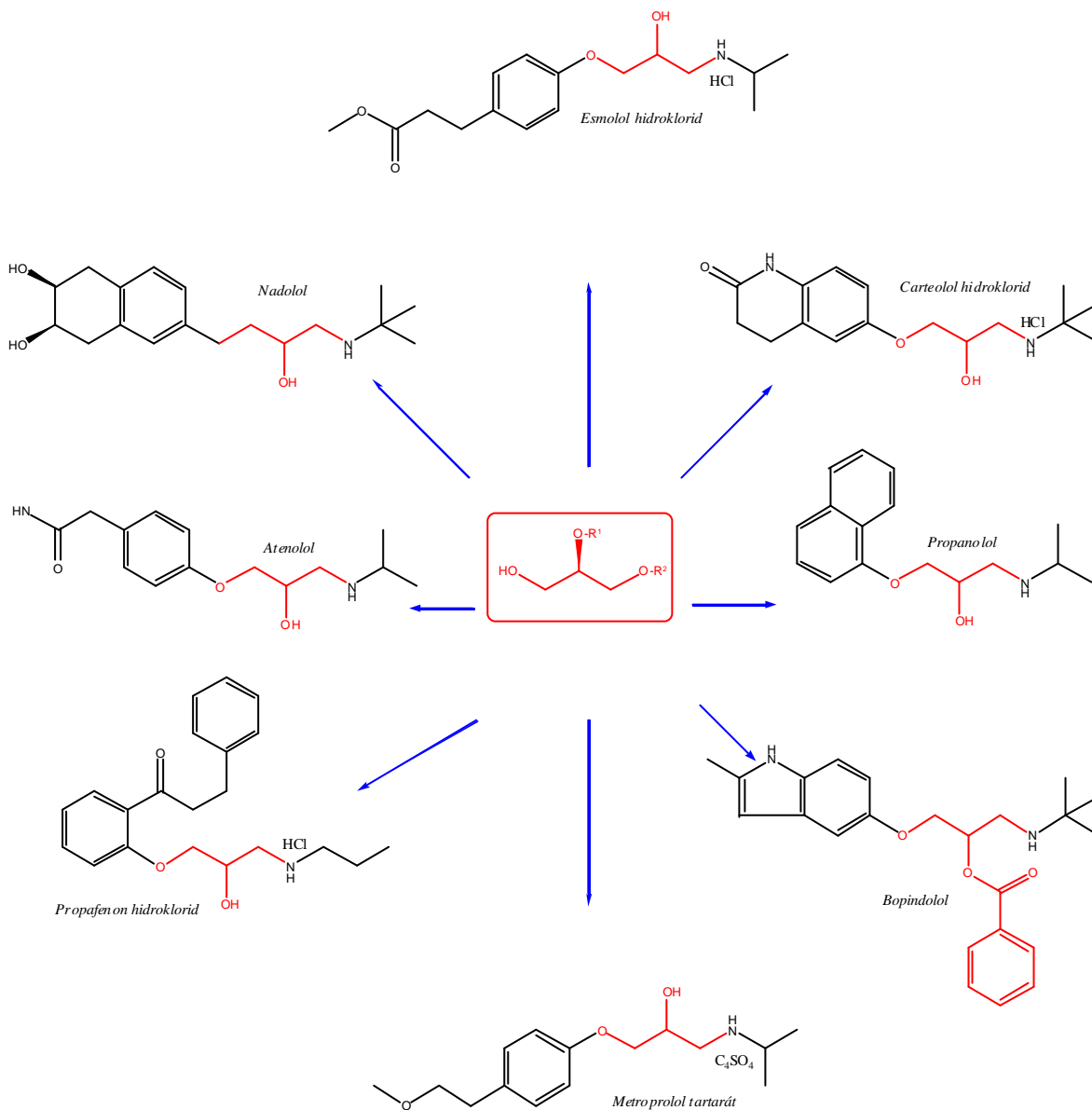
R ₁	R ₂	Enzim	Folyamat, acilezo szer	Termék	T%	ee%	Irod.
H	Ph	PPL	H	b Ac	91	>95	28
		PPL	A, MeOAc	d Ac	98	92	28
OCH	H	CvL	A, CH ₂ =CHOAc	d Ac	88	92	29
OC ₂ H ₂	H	CvL	A, CH ₂ =CHOAc	d Ac	87	89	29
		PfL	A, CH ₂ =CHOAc	d Ac	90	90	29
		PfL	A, PhOAc	d Ac	90	90	29
OCH ₂ Ph	H	PPL	H	b Ac	40	60	30
		PPL	H, 15% THF	b Ac	40	80	30
		PPL	H, <i>i</i> -Pr ₂ O	b Ac	45	88	31
		PsL	H	b Ac	75	91	30
		PsL	A, CH ₂ =CHOAc	d Ac	53	96	32, 33
		PfL	A, CH ₂ =CHOAc	d Ac	92	94	29, 34

Lipázok és hidrofób szubsztituensek esetén leírták azt, hogy a transzformációk általában *pro-R* szelektívek. Amikor a szubsztituens heteroatommal (*O*, *N*) kapcsolódik a folánhoz geometriai értelemben az enantiotóp szelektivitás invertálódik, bár a szubsztituensek rangsorolási szabályai miatt a tárgyalt csoportot még mindig *pro-R*-ként jelölik.

Az optikailag aktív monoacetátokat több szintézisben alapanyagként^{30, 31} használták fel. Enzimes úton nyert benziloxi szubsztituált monoacil származékokból megfelelő frakcionálás és kristályosítás után tiszta enantiomereket lehetett előállítani.

A 2-metil-1,3-propándiol optikailag aktív monoészterét felhasználták makrociklusos (*R*)-muscone³⁵ és az antibiotikum aktivitással rendelkező (-)-malingolid^{36, 37} szintézisére.

Az általunk tervezett reakciókhoz legközelebbi analógiaként a nagy térkitöltésű alkiloxi és ariloxi csoportokkal rendelkező diolok átalakításai lehetnek a legérdekesebbek, így a 3. táblázatban az ezekre vonatkozó példákat gyűjtöttük össze.

5. ábra Az 1,3-propándiolok *b*-blokkolókkal való szerkezeti rokonsága

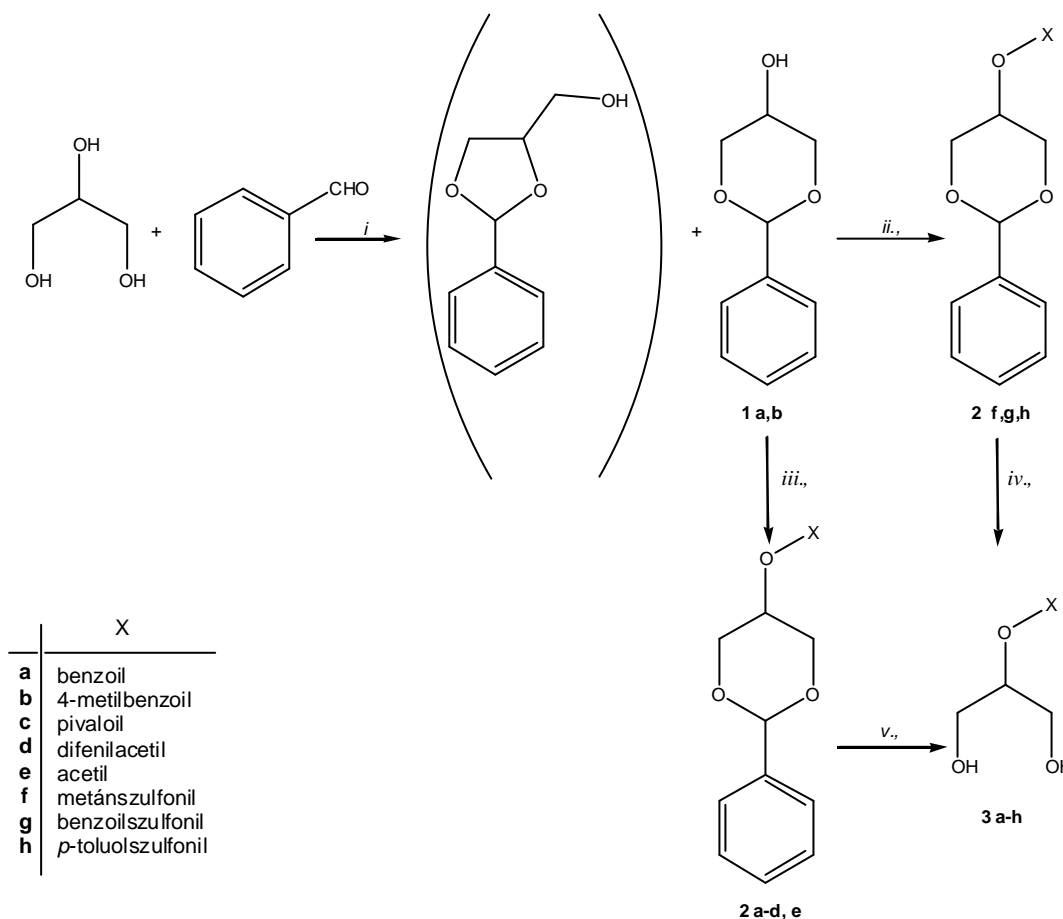
3.3.1.2. A 2-es helyzetben aciloxi-szubsztituált 1,3-propándiolok előállítása és enzimés átalakítása

A 2-es helyzetben aciloxi-szubsztituált 1,3-propándiolok előállítását és enzimés átalakításait a 2-benzoiloxipropán-1,3-diol (**3a**) példáján keresztül vizsgáltuk ³⁸. A kísérletek folytatásaként *Egri* és munkatársai a család több képviselőjét is előállították és tanulmányozták kereskedelmi enzimekkel katalizált acilezési reakcióikat ⁴¹.

3.3.1.2.1. A 2-aciloxi-1,3-propándiolok előállítása

A 2-aciloxi-1,3-propándiolokat (**3a-h**) az 6. ábra szerint nyerhetjük^{22, 26, 39}. Doktori munkám során a 2-benzoiloxi-1,3-propándiolt állítottam elő³⁸, majd Egri⁴¹ és munkatársai előállították a család több képviselőjét is. Kiindulási vegyületként minden esetben glicerint és benzaldehidet használtunk, melyekből kénsav katalizátor jelenlétében kristályos formában nyerhető a *cis*-2-fenil-5-hidroxi-1,3-dioxán (**1a,b**)⁴⁰, melynek acilezésével acilezett benzilidén származékokat (**2f,g,h**; **2a-d,e**), majd ezekből a benzilidén csoport eltávolításával prokirális diolokat (**3a-h**) állíthatunk elő. Az acilezés/védocsoport eltávolítás kissé eltérő volt a vizsgált két acilcsoport-típusnál. A szulfonsav észterek (**2f,g,h**) esetében az acilezéshez acil kloridot és porított kálium-hidroxidot éterben, a védocsoport eltávolításához savas hidrolízist (cc. HCl, MeOH, reflux); míg a karbonsav észterek (**2a-d,e**) esetében az acilezéshez acil-kloridot és piridint alkalmaztak diklórmetánban, a védocsoport eltávolításához pedig izopropanolban 10 % Pd/C segítségével végzett katalitikus hidrogénezést használtak^{11, 38, 41}.

6. ábra A 2-aciloxi-1,3-propándiolok (**3a-h**) előállítása



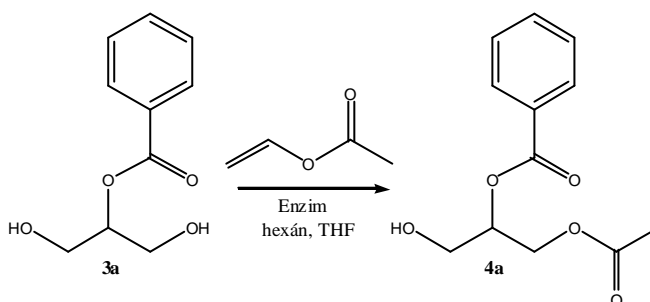
Reakció körülmények: *i.*) kat. H₂SO₄, RT, 5h, 35%; *ii.*) Acil-SO₂-Cl, KOH, Et₂O, -5°C, 40 min, RT, 15 min, 43-92%; *iii.*) Acil-Cl, piridine, kat. DMAP, CH₂Cl₂, RT, 1-12 h, 80-86%; *iv.*) cc.HCl, MeOH, reflux, 1 min, 69-76%; *v.*) H₂, 10% Pd/C, *i*-PrOH, RT, 67-77%.

3.3.1.2.2. A 2-benzoiloxipropán-1,3-diol enzim katalizált acilezése

Az enzim acilezési folyamatot először a benzoil vegyület **3a** esetén vizsgáltuk³⁸. Több kereskedelmi enzimet is kipróbáltunk, valamennyivel *R* konfigurációjú terméket nyertünk, de eltérő kitermeléssel és enantiomertisztasággal (3. táblázat és 4. táblázat). A legmagasabb szelektivitást a sertés-hasnyálmirigy lipáz (PPL) enzimmel hexán-THF 1:1 oldószerben tapasztaltuk, amivel 95 % feletti enantiomertisztaságú monoacetátot nyertünk. Diacetát képződését VRK-val (vékonyréteg kromatográfia) nem tudtuk kimutatni, mivel a magas szelektivitás következtében a másik prokirális oldalt az enzim nem alakította át. A Novozyme 435 nem tett különbséget a két enantiotóp hidroxilcsoport között, ezért első lépésben racém terméket adott, hosszabb reakcióido mellett, pedig a reakció eltolódott a diacetát képződés felé. A többi enzim közepes szelektivitással - a Lipase Ps, Lipase AK (**4.5**, **4.6**, **4.4**) kis tisztaságban, viszonylag gyorsan, míg a CcL, Lipase N, Lipase G (**4.8**, **4.7**, **4.3**) lipázokkal nagyon lassan - lejátszódó reakciókban *R*-monoacetátot illetve esetenként diacetátot eredményezett. Az enzimek által katalizált reakció feltételezett mechanizmusát a 3. ábra mutatja be.

A kezdeti eredmények kiterjesztéseként Egri és munkatársai további 2-aciloxipropán-1,3-diolok PPL-katalizált reakcióit tanulmányozták⁴¹ (5. táblázat), mivel a 2-benzoiloxipropán-1,3-diol esetében ez az enzim szolgáltatta a legjobb enantiomertisztaságot (4. táblázat)^{25, 26, 38-45}.

4. táblázat A 2-benzoiloxipropán-1,3-diol (**3a**) enzim acilezése kereskedelemben kapható enzimekkel



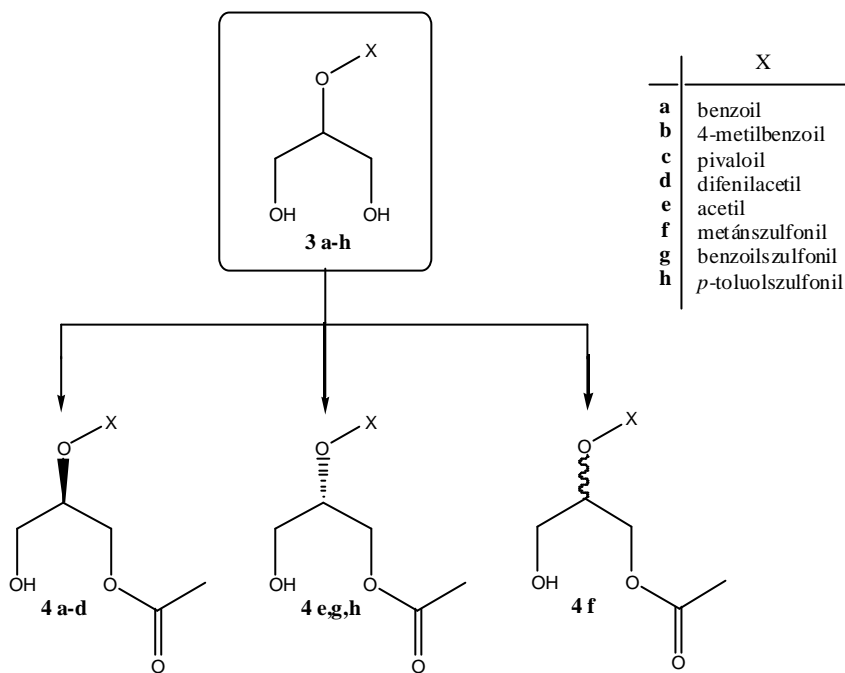
Enzim (mg)	Ido (óra) ^a	Monoacetát (4)		Diacetát ^b		
		Term (%)	konf. [α] _D ^c	ee ^d (%)	Term.% ^e	
Novozyme 435 (20)	1,5	3	<i>R</i>	-0,2	1	90
Novozyme 435 (250)	0,5	5	<i>R</i>	-0,2	1	80
Lipase G (100)	72	5	<i>R</i>	-0,9	3	
Lipase AK (100)	1	32	<i>R</i>	-2,0	7	
Lipase Ps (100)	2	32	<i>R</i>	-5,2	16	
Lipase Ps (100)	2,5	30	<i>R</i>	-5,5	19	
Lipase N (100)	72	13	<i>R</i>	-5,9	20	
CcL (50)	72	10	<i>R</i>	-9,2	33	
PPL (100)	4	62	<i>R</i>	-23,8	83	
PPL (300)	1	63	<i>R</i>	-27,4	≥95	

^a **3a** (300 mg; 1,5 mmol), 1 ml vinilacetát és a táblázat szerinti enzim-mennyiség 3 ml tetrahydrofuran és 3 ml hexán elegyében szobahőmérsékleten kevertetve; ^b Izolálás csak azokban az esetekben történt, mikor a diacetát fotermekeként képződött; ^c c=1, etanol; ^d Enantiomer tisztaság meghatározása a diolból (*R*)-MTPA-kloriddal képzett di-MTPA-észter; ^e ¹H-NMR spektruma alapján (4.10 eset), a többi esetben a 100%-os enantiomer tisztasághoz extrapolált optikai forgatóképességhez hasonlítva; ^e A reakciókat vékonyrétegen követtük. Ahol nem adunk meg kitermelés értéket, ott a diacetátot melléktermékként nem izoláltuk.

A kísérletek alapján megállapítható volt, hogy a PPL enzim a 2-aciloxi-1,3-propándiol családot a következőképpen alakította át a 2-es szénatomon *levo* szubsztituens térkitöltésétől függően. A kezdetben vizsgált 2-benzoiloxi csoportot tartalmazó vegyülethez képest (**3a**, 96%ee) a 2-aciloxi csoport térigényének enyhe növelése szelektivásnövekedést (**3b**, >98%), míg a további növelése (**3c,d**, *pro-R*) vagy csökkentése (**3e,g,h**, *pro-S*) szelektivásromlást eredményezett (5. táblázat).

A korábban nem ismert 2-aciloxipropán-1,3-dioloknak (**3a-h**) és az ugyancsak új acilszarmazékainak (**4a-h**) meg kellett határozni az abszolút konfigurációját is. Ezt a 3-benziloxipropán-1,3-diol enzimes acilezésével előállított, ismert abszolút konfigurációjú termékekkel történő kémiai korreláció segítségével oldották meg.^{26, 41}

5. táblázat: PPL (Sertés hasnyálmirigy lipáz) katalizált enzimes acilezés az 2-aciloxipropán-1,3-diolokon(**3 a-h**)^{38,41}



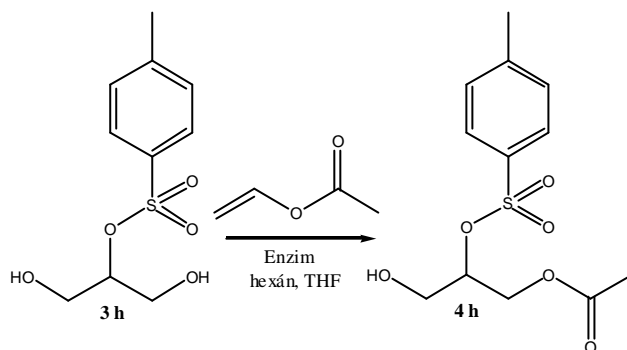
Vegyület	Ido(óra)	Term.%	e.e % ^b	Konf.	[α] _D (c=1, metanol)
4 a	1	63	96	<i>R</i>	-27,4
4 b	11	77	>98	<i>R</i>	-27,5
4 c	6	82	67	<i>R</i>	-8,0
4 d	48	80	16	<i>R</i>	-2,3
4 e	6	79	40	<i>S</i>	+1,8
4 f	11	67	0	-	0
4 g	3	71	31	<i>S</i>	+6,2
4 h	168	74	31	<i>S</i>	+9,2

^aReakció körülmények: 0,25 g szubsztrát (**3 a-h**), 200 mg PPL, 0,8 ml vinil acetát, 2,5 ml THF és 2,5 ml hexán, RT; ^bazonosítása ¹H-NMR spektrumból a **4 a-h**-ből képzett MTPA észterekkel történt.

3.3.1.2.3. A 2-aciloxipropán-1,3-diolok enzimkatalizált acilezése

Mivel az eddigi saját³⁸ és Egriék⁴¹ által publikált eredmények alapján a kereskedelmi enzimekkel katalizált enantiotóp szelektív reakciók során ezt a családot legjobban a 2-benzoiloxipropán-1,3-diol (**3a**), illetve a 2-(*p*-toluolszulfonil)oxipropán-1,3-diol (**3h**) jellemezte. A katalizátorként használt kereskedelmi enzimek a 2-aciloxi-1,3-propándiol család e két képviselőjénél ellentétes szelektivitást adtak. Míg a benzoiloxi-1,3-propándiol (**3a**, PPL, *R*, >95 % ee) esetén csak pro-*R* szelektivitást tapasztaltunk³⁸, a 2-(*p*-toluolszulfonil)oxipropán-1,3-diol (**3h**, Lipozyme IM, *S*, 42 % ee) származéknál, kisebb szelektivitás mellett csak *S* konfigurációjú terméket kaptak⁴¹ (6. táblázat). A szelektivitás oldószerfüggésének vizsgálatát követően az enzim acilezés oldószerének THF (tetrahydrofuran): hexán = 1:1 arányú elegyét használták⁴¹. A vizsgált kereskedelmi enzimek egyike sem ért el megfelelő enantiomer tisztaságot (max. 42 % ee, Lipozyme IM)⁴¹.

6. táblázat: A 2-(*p*-toluolszulfonil)oxipropán-1,3-diol (**3h**) enzim acilezése a kereskedelemben kapható készítményekkel⁴¹



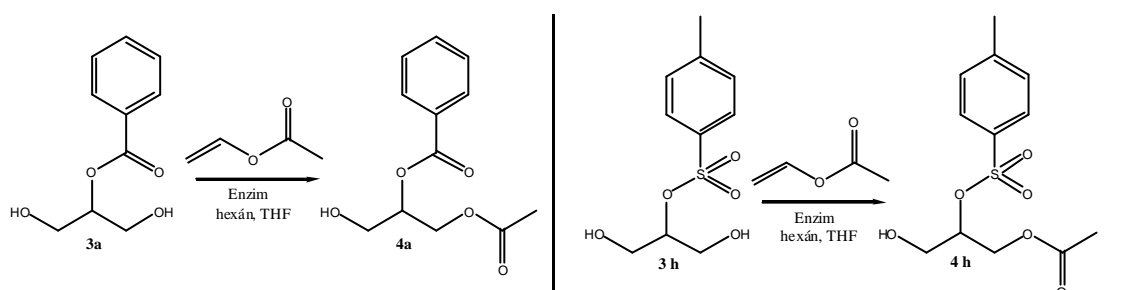
Enzim (mg)	Ido (óra)	4h		
		Term %	ee %	[α] _D (c=1, metanol)
Novozym 435 (50) ^b	24	0		
Papain (200) ^b	144	0		
PfL (20) ^b	24	0		
CcL (100) ^b	24	64	1	-0,2
Lipase G (100) ^c	168	51	1	+0,4
Lipase A (100) ^c	168	47	2	+0,6
Lipase AK (50) ^b	48	77	2	+0,7
Lipase PS (50) ^b	3	72	3	+0,9
Lipase N (100) ^c	168	47	4	+1,2
PPL (200) ^c	168	74	31	+9,2
Lipase M (50) ^c	2	75	34	+10,1
Lipozyme IM (50) ^c	0,5	82	42	+12,5

^a Reakció körülmények: 0.25 g szubsztrát oldószerben, RT; ^b Oldószer: vinilacetát (2 ml); ^c Oldószer: THF (2.5 ml), hexán (2.5 ml), vinilacetát (0.8 ml).

Ezen elozmények alapján a 2-aciloxi-1,3-propándiolok enzim acilezési reakcióit, az ellentétes konfigurációjú termékek és *p*-toluolszulfonil származék (**4h**) esetén a jobb szelektivitás reményében teszteltük saját izolálású, termofil fonalgombákból származó sejtmentes enzimkészítményeinkkel³⁹.

A termofil fonalagombákból nyert enzimekészítmények nagy része a kereskedelmi enzimek által katalizált reakciókhoz hasonló eredményt adott, vagyis hasonló termeléssel/szelektivitással működött. Ezeket az értékeket a 7. táblázatban szürke háttérrel emeltük ki. Általánosságban azonban elmondható, hogy a termofil fonalagombákból nyert sejtmentes enzimek a kereskedelmi forgalomban kapható enzimekkel végzett acilezéshez képest szélesebb szelektivitás tartományban működtek. Egyes enzimek készítményekkel ellentétes konfigurációjú termékeket is kaptunk, mind a benzoil (**4a**, BUTE-7b, *R*, 94 % ee — BUTE-4a, *S*, 71 % ee), mind a *p*-toluolszulfonil (**4h**, BUTE-7b, *R*, 4 % ee — BUTE-4a, *S*, 52 % ee) származék esetén. Ezek az eredmények is igazolják az új enzimek előállításának fontosságát, életképességét, illetve az általunk előállított enzimek más típusú biokatalitikus folyamatokra történő kiterjesztésének potenciális lehetőségét.

7. táblázat A 2-benzoiloxipropán-1,3-diol (**3a**) és a 2-(*p*-toluolszulfonil)oxipropán-1,3-diol (**3h**) lipázkatalizált acilezése termofil fonalagombákból nyert enzimekkel



Enzim	Ido(óra)	T (%) ^a	Konf	ee (%) ^b	Enzim	Ido(óra)	T (%) ^a	Konf	ee (%) ^b
BUTE-7b	48	87	<i>R</i>	94	BUTE-7b	168	44	<i>R</i>	4
BUTE-7a	168	27	<i>R</i>	92	BUTE-10	51	71	-	0
BUTE-7a	120	86	<i>R</i>	67	BUTE-2a	168	61	<i>S</i>	2
BUTE-3b	216	78	<i>R</i>	44	BUTE-13b	168	76	<i>S</i>	8
BUTE-3a	168	24	<i>R</i>	27	BUTE-2b	168	29	<i>S</i>	13
BUTE-2a	168	14	<i>R</i>	23	BUTE-7a	72	52	<i>S</i>	16
BUTE-8b	168	12	<i>R</i>	15	BUTE-3b	168	30	<i>S</i>	17
BUTE-2a	168	27	-	0	BUTE-8a	168	12	<i>S</i>	17
BUTE-15b	168	12	<i>S</i>	5	BUTE-13a	168	8	<i>S</i>	21
BUTE-12b	168	14	<i>S</i>	12	BUTE-4b	168	45	<i>S</i>	23
BUTE-6b	168	12	<i>S</i>	16	BUTE-3a	52	64	<i>S</i>	25
BUTE-13a	168	12	<i>S</i>	29	BUTE-12b	168	16	<i>S</i>	32
BUTE-10	168	55	<i>S</i>	48	BUTE-1a	4	23	<i>S</i>	41
BUTE-16b	72	47	<i>S</i>	53	BUTE-5a	168	5	<i>S</i>	45
BUTE-5b	168	30	<i>S</i>	53	BUTE-17b	9,5	24	<i>S</i>	50
BUTE-10	29,5	57	<i>S</i>	57	BUTE-5b	168	31	<i>S</i>	51
BUTE-17b	14,5	51	<i>S</i>	59	BUTE-16b	20,5	28	<i>S</i>	52
BUTE-4a	21	47	<i>S</i>	71	BUTE-4a	10	45	<i>S</i>	52

^a T%: termelés %; ^b Enantiomer tisztaság meghatározása a 100%-os enantiomer tisztasághoz extrapolált optikai forgatóképességhez hasonlítva; a szürkével kiemelt cellákban kapott eredmények megközelítően azonosak a kereskedelmi forgalomban kapható enzimekkel nyert enantiomer tisztaság adatokkal.

3.4. VIZSGÁLT ENANTIOMER SZELEKTÍV REAKCIÓK

A termofil fonalagombákból nyert enzimek készítményeinket enantiomer szelektív reakciókban is teszteltük. Olyan reakciókat választottunk ki, melyek katalízisével reményeink szerint jól jellemezhetőek az enzimek készítmények. A választott szintézisek egy része (*racém* 1-feniletanol, *racém* glicerín-karbonát enzimátikus acilezése) irodalomból már jól ismert, így eredményeink összevethetőek ezen adatokkal, míg a fejezetben feltüntetett reakciók többsége általunk újonnan előállított vegyületeket vagy reakciókat jelent.

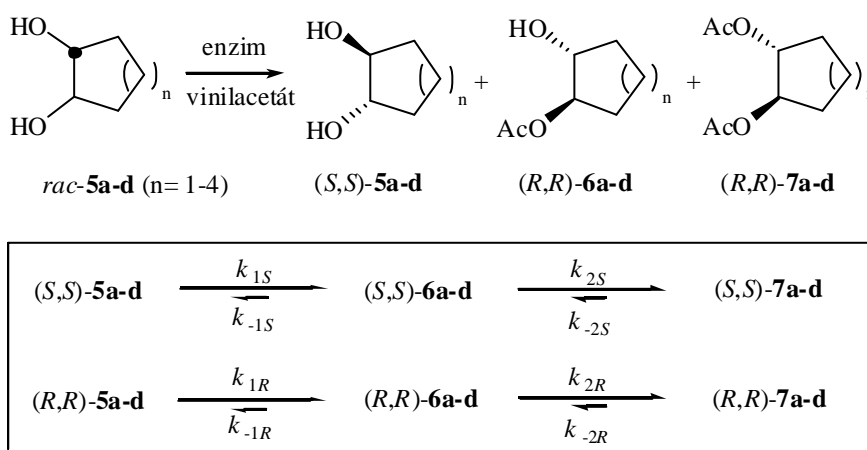
3.4.1. A TRANSZ-2-ACETOXICIKLOALKÁN-1-OL ENZIMES ACILEZÉSE

3.4.1.1. Elozmények

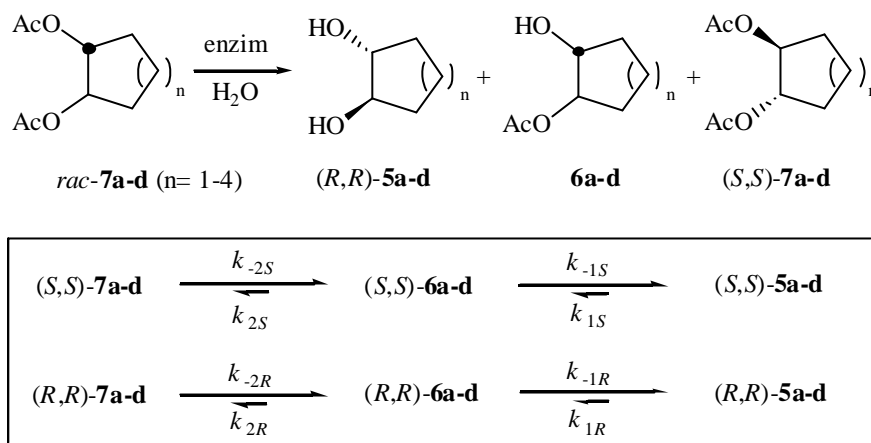
Az optikailag aktív *transz*-2-cikloalkán-1,2-diolok (**5a-d**) felhasználhatóak koronaéterek építőköveiként⁴⁶ (ld. 2-aciloxi-1,3-propándiolok), vagy aszimmetrikus szintézisek királis komponenseként^{47, 48}. Az (*S,S*)-ciklohexán-1,2-diolt ((*S,S*)-**5b**) optikailag aktív formában átrendeződési reakciók mechanizmus vizsgálatában is felhasználták⁴⁹.

Racém-transz-2-acetoxicikloalkán-1,2-diolok (*rac*-**5a-d**) enzimkatalizált acilezésével optikailag aktív *transz*-2-cikloalkán-1,2-diolok (**5a-d**) állíthatók elő, *Pseudomonas* törzssel (SAM II)⁵⁰, vagy *Pseudomonas cepacia* törzsből (Lipase PS)⁵¹ nyert lipázzal a 7. ábra alapján.

7. ábra *transz*-2-cikloalkán-1,2-diolok (*rac*-**5a-d**) enzim katalizált acilezése



Hasonló módon a *racém transz*-2-cikloalkán-1,2-diol-diacetátok (*rac*-**7a-d**) enzim katalizált hidrolízisével is magas tisztaságú enantiomereket kaphatunk *Pseudomonas* törzssel (SAM II)⁵⁰, vagy sertésmáj észteráz (PLE)⁵² felhasználásával (8. ábra).

8. ábra *transz*-2-cikloalkán-1,2-diol-diacetátok (*rac*-7a-d) enzimkatalizált hidrolízise

Pseudomonas fluorescens lipázokkal (Lipase P, Amano) nagy enantiomertisztaságot sikerült elérni a *rac*-7a-c enzimes hidrolízise során is⁵³⁻⁵⁶.

E két enzimes reakcióban, akármelyik irányba megy is a reakció, a keletkező elegyek mindegyike három komponensű volt, diolt **5a-d**, monoacetátot **6a-d** és diacetátot **7a-d** is tartalmazott, különböző arányokban és különböző enantiomertisztasággal.

Még ha feltételezzük is, hogy a reakciók kvázi irreverzibilisek – a vissza reakció nem befolyásolja a végeredményt – a folyamat szelektivitásának/lefutásának értelmezéséhez négy független sebességi állandót kell figyelembe vennünk (k_{1S} , k_{1R} , k_{2S} , k_{2R} az acilezésnél, k_{-1S} , k_{-1R} , k_{-2S} , k_{-2R} a hidrolízisnél). Az acilezési reakcióra vonatkozó adatok analízise azt jelezte, hogy a k_{2S} ^{50, 51} az acilezési reakció leglassabb lépése (7. ábra).

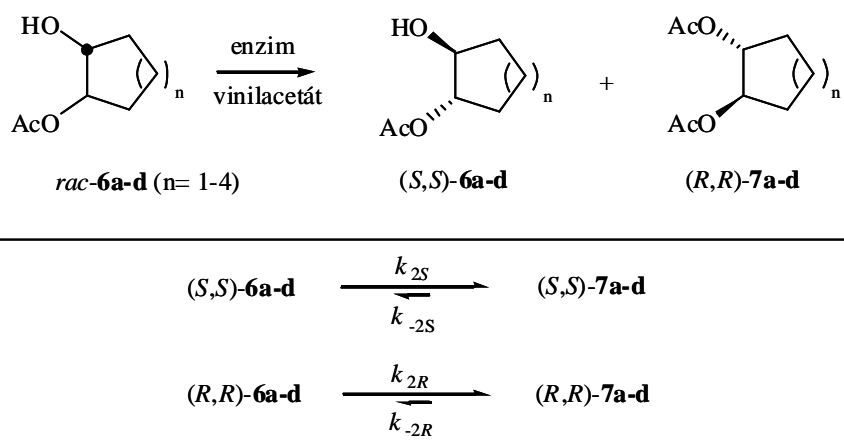
A *rac*-7b hidrolitikus reakció sebességi állandóinak szisztematikus analízise alapján kiderült, hogy k_{-2S} ⁵⁷ a hidrolízis leglassabb lépése. Ebből kifolyólag a (S,S)-7b, mint reagálatlan diacetát maradt vissza a rendszerben (8. ábra).

Az optikailag aktív 1,2-dioloik előállítására hat lehetséges enzimátikus módszer használható fel (az 1,2-diol-, 1-acetát-, 2-acetát acilezése, 1,2-diacetát-, 1-acetát-, 2-acetát hidrolízise). Ezen reakciók összehasonlítása⁵⁸ azt mutatta, hogy a reakciók közül, a 2-acetoxi-1-ol vegyületek enzimes acilezése a leggyorsabb és legszelektívebb folyamat, így a reakció végtermékeként kapott aktív diacetátok hidrolízisével, könnyen előállítható a kívánt aktív alkohol.

3.4.1.2. *transz*-2-Acetoxi-cikloalkán-1-ollokkal végzett kísérletek

Az egyensúlyi állandók és az aciklusos 1,2-diol származékok vizsgálatának megfelelően várható volt, hogy a *transz*-2-acetoxicikloalkán-1-ol (*rac*-**6a-d**) enzimkatalizált acilezése – mely során optikailag aktív diacetát [(*R,R*)-**7a-d**] és monoacetát [(*S,S*)-**6a-d**] képződik – nagy szelektivitással játszódik le (9. ábra). A folyamatot több kereskedelemben kapható és saját, termofil fonalgombákból előállított enzimmal teszteltük⁵⁹.

9. ábra *transz*-2-acetoxicikloalkán-1-olok (*rac*-**6a-d**) enzimkatalizált acilezése



A rendelkezésünkre álló *transz*-2-acetoxicikloalkán-1-olok (*rac*-**6a-d**) és a belőlük képzett diacetátok (*rac*-**7a-d**) enantiomerjeit királis állófázison végzett GC segítségével határoztuk meg. A hat és héttagú vegyületek esetében, mind a monoacetát (**6b,c**) mind a diacetát (**7b,c**) enantiomerjeit sikerült különválasztanunk, míg az öttagú (**6a, 7a**) és nyolctagú (**6d, 7d**) vegyületeknél csak a diacetátok **7a** és **7d** enantiomerjei váltak szét. Ezen mérési körülmények alkalmazásával az enzimek szelektivitását analitikai léptéku reakciókban teszteltük. Az enzimikus reakciók eredményeit a következő táblázatokban foglaltuk össze. (8. táblázat, 9. táblázat, 10. táblázat, 11. táblázat)

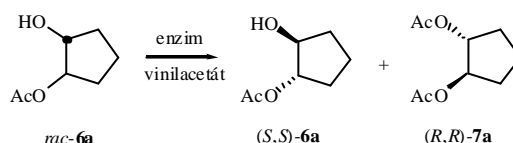
3.4.1.2.1. A *racém transz*-2-acetoxicikloalkán-1-olok enzimkatalizált acilezése

Elso lépésként 73 enzimmal (kereskedelmi és termofil fonalgombákból izolált enzimmal) vizsgáltuk *racém transz*-2-acetoxi-ciklohexán-1-ol (*rac*-**6b**) enzimikus acilezését melyek közül számos enzim magas enantiomerszelektivitással katalizálta a folyamatot. Az átalakítást jól katalizáló enzimeket és eredményeiket tüntettük fel a 9. táblázatban.

A *Pseudomonas* eredetű lipázok (Lipase Ps, *P. fluorescens*, Lipase AK) a korábbi eredmények alapján a vártnak megfelelően nagy szelektivitást mutattak, $E > 500$, de hasonlóan jól működött néhány gomba eredetű lipáz is (Lipozyme IM, Lipozyme IM 20, Lipozyme TL IM) és néhány termofil fonalgombából előállított enzimmészítmény is, mint amilyen a BUTE 3b.

A hattagú vegyületen (*rac-6b*) legjobb szelektivitást mutató 30 enzimmal vizsgáltuk az öttagú (*rac-6a*) és a héttagú (*rac-6c*) monoacetátok enzimes acilezését (8. táblázat, 10. táblázat). A vártnak megfelelően a hattagú monoacetáton (*rac-6b*) jól működő enzimek szelektívnek bizonyultak a ciklopentán (*rac-6a*) és cikloheptán (*rac-6c*) származékon is, így meglehetősen nagy enantiomertisztaságú (*R,R*)-**7a,c** diacetátot és (*S,S*)-**6a,c** monoacetátot kaptunk. A hattagú gyurum (*rac-6b*) legjobban működő BUTE 3b az öttagú vegyületen (*rac-6a*) is a legjobb enzimnek bizonyult, míg a héttagú (*rac-6c*) monoacetát enzimátikus acilezésénél a legjobb kereskedelmi enzimekhez hasonló eredményeket adott. A kereskedelmi enzimek közül, mindhárom szubsztráton a Lipase Ps, Lipozyme IM és a Lipase Ak működött legjobb enantiomerszelektivitással.

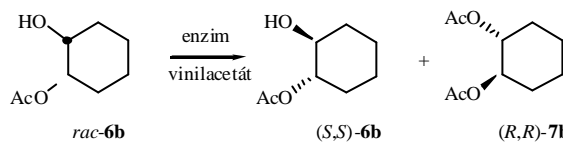
8. táblázat A racém *transz*-2-acetoxi-ciklopentán-1-ol (*rac-6a*) lipázkatalizált acilezése ^a



Enzim ^b	Ido(óra)	Konv(%)	ee (%) ^c (S,S)-6a	ee (%) ^d (S,S)-7a
BUTE 3b	24	50	>99	>99
Lipase PS	168	50	>99	>99
Lipozyme IM	168	43	76	>99
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	168	49	>99	>99
Lipase A	72	47	93	>99
PPL	168	26	36	>99
Lipozyme IM 20	168	40	67	99
BUTE 11b	168	31	44	99
Lipase AK	24	51	98	94
Novozyme 435	72	54	>99	85
BUTE 25b	168	47	80	90
Lipozyme TL IM	168	49	89	93
BUTE 7b	168	26	37	90
Lipase M	168	10	9	84
<i>Candida antarctica</i> A	24	92	57	5
<i>Candida rugosa</i>	168	26	9 ^e	25 ^f
Lipase AY	168	28	18 ^e	46 ^f

^a Csak a 168 óra alatt, ? > 10 % felett működő enzimek adatait tüntettük fel; ^b A *transz*-2-acetoxi-ciklohexán-1-ol (*rac-6b*)-vel jó szelektivitást adó enzimeket teszteltük; ^c Az ee_{6a} és a ? értékeit GC-vel, HP-Chiral oszlopon határoztuk meg; ^d Az ee_{7a} értékét a ? és az ee_{6a} értékeiből számítottuk; ^e (*R,R*)-**6a**; ^f (*S,S*)-**7a**;

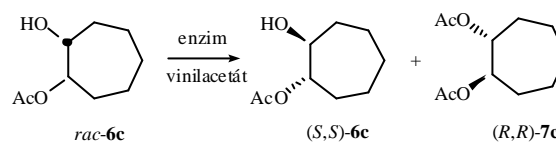
A *Candida* eredetű lipázok (*C. rugosa*, *C. cylindracea*, *C. antarctica* A, Lipase A, Lipase AY) csak mérsékelten bizonyultak *R*-szelektívnek a hat és héttagú vegyületeken. Érdekes módon azt találtuk, hogy a *C. rugosa* lipáz és a Lipase AY a többi enzim *R*-szelektivitásával szemben az öttagú monoacetátot (*rac-6a*) *S*-diacetáttá (*S,S*)-**7a** alakította.

9. táblázat A racém *transz*-2-acetoxi-ciklohexán-1-ol (*rac*-**6b**)^a lipázkatalizált acilezése

Enzim	Ido (óra)	Konv(%)	ee % ^b (<i>S,S</i>)- 6b	ee % ^b (<i>R,R</i>)- 7b	<i>E</i> ^c
BUTE 3b	48	50	>99,5	>99,8	>500
Lipase PS	48	49	98,3	>99,8	>500
Lipozyme IM	48	42	68,0	>99,8	>500
BUTE 30b	48	44	77,2	>99,8	>500
Lipozyme IM 20	48	37	56,3	>99,8	>500
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	48	27	33,5	>99,9	>500
BUTE 6b	48	7	4,9	>99,8	>500
Lipozyme TL IM	24	34	43,3	>99,8	>500
Lipase AK	48	49	99,3	99,6	>100
PPL	48	10	4,3	>99,8	>100
Lipase M	48	8	2,9	>99,8	>100
Novozyme 435	48	48	89,4	99,7	>100
BUTE 31b	72	46	83,2	99,7	>100
Lipase R	48	7	1,5	96,1	54
BUTE 25b	48	24	25,6	94,8	50
BUTE 7b	48	17	18,5	92,5	31
<i>Candida antarctica</i> A	48	38	33,6	64,6	6,8
<i>Candida cylindracea</i>	48	10	2,1	64,8	5,0
BUTE 10a	48	10	2,0	60,6	4,3
Lipase AY	48	7	1,3	54,0	3,5
<i>Candida rugosa</i>	48	8	1,1	46,7	2,9

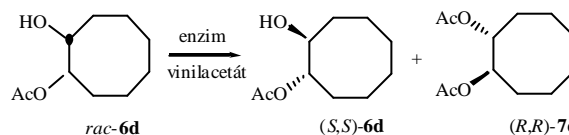
^a A táblázatban csak a 48 óra alatt, ? > 5 % felett működő enzimeket tüntettük fel; ^b Az (*S,S*)-**6b** és (*R,R*)-**7b** ee értékeit és a ? értékeit GC-vel, HP-Chiral oszlopon mértük; ^c Az *E* enantiomerszelektivitás értékét ee_{7b}⁹ valamint a ? között fennálló összefüggés alapján számítottuk és az eredményeink megerősítéséhez összevetettük az ee_{6b} és ee_{7b}¹⁰ adatokból számított enantiomerszelektivitás értékekkel; (Az *E* érték számításakor az 500 - 5000 közötti értékeket >100 - nak, és 5000 körüli *E* értékeket >500-nak vettük).

Az öt (*rac*-**6a**), hat (*rac*-**6b**) és héttagú (*rac*-**6c**) monoacetátok acilezését jó szelektivitással és konverzióval katalizáló hat enzimet teszteltük a nyolctagú alkohol (*rac*-**6d**) enzim acilezésénél is (11. táblázat). Ezen a szubsztráton az enzimek kisebb szelektivitással és termeléssel adták az optikailag aktív (*S,S*)-**6d** monoacetátot és (*R,R*)-**7d** diacetátot.

10. táblázat A racém *transz*-2-acetoxi-cikloheptán-1-ol (*rac*-**6c**)^a lipázkatalizált acilezése

Enzim	Ido (óra)	Konv(%)	ee % ^b (S,S)-6c	ee % ^b (R,R)-7c	E ^c
Novozyme 435	48	50	>98	>99	>500
Lipase AK	48	49	>98	>99	>500
BUTE 3b	168	50	>98	>99	>500
Lipase PS	168	48	>98	>99	>500
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	168	44	63	>99	>500
Lipozyme TL IM	168	43	57	>99	>500
Lipozyme IM	168	39	46	>99	>100
Lipozyme IM 20	168	34	31	>99	>100
BUTE 11b	168	19	7	>99	>100
Lipase M	168	13	3	99	>100
<i>Candida cylindracea</i>	168	13	4	70	6,4
<i>Candida rugosa</i>	168	11	2	53	3,5
<i>Candida antarctica</i> A	48	42	9	38	2,8
Lipase AY	168	10	1	33	2,0

^a 168 óra alatt, ? > 10 % felett működő enzimek adatait tüntettük fel; ^b Az (S,S)-**6c** és (R,R)-**7c** ee-t valamint a reakció ?-t GC-vel, HP-Chiral oszlopon mértük; ^c Az E enantiomerszelektivitás értékét ee_{7c} valamint a ? között fennálló összefüggés alapján számítottuk⁹ és az eredményeink megerősítéséhez összevetettük az ee_{6c} és ee_{7c}¹⁰ adatokból számított enantiomerszelektivitás értékekkel; (Az E érték számításakor az 500 - 5000 közötti értékeket >100 -nak, és 5000 körüli E értékeket >500-nak vettük).

11. táblázat A racém *transz*-2-acetoxi-ciklooktán-1-ol (*rac*-**6d**) lipázkatalizált acilezése^a

Enzim ^b	Ido (óra)	Konv(%)	ee (%) ^c (S,S)-6d	ee (%) ^d (S,S)-7d
Novozyme 435	24	97	99	4
Lipase PS	168	80	77	21
Lipase AK	24	71	67	30
Lipozyme TL IM	24	78	58	19
BUTE 3b	24	72	58	25
Lipozyme IM	168	60	19	14

^a Csak a 168 óra alatt, ? > 10 % felett működő enzimek adatait tüntettük fel; ^b A **6a-c** szubsztrátokon legjobb szelektivitást adó enzimeket teszteltük; ^c ee_{6d}-t és a ? GC-vel, Beta-DEX 225 oszlopon mértük; ^d Az ee_{7d} értékét a ? és az ee_{6d} értékeiből számítottuk;

A négy kiválasztott cikloalkán származék (*rac*-**6a-d**) enzimátikus acilezésénél három jól működő enzimet találtunk: Lipase Ps, Lipase AK és a termofil fonalgombából általunk előállított BUTE- 3b-t. Mindhárom enzim jó termeléssel, kimagaslóan jó szelektivitással katalizálta a reakciókat.

3.4.1.2.2. A racém transz-2-acetoxicikloalkán-1-olok Lipase AK-val katalizált acilezése és hidrolízise

A szintetikus alkalmazhatóság és a tényleges konfiguráció és forgatóképesség megállapításához mind a négy racém monoacetáttal (*rac-6a-d*) vizsgáltuk a kereskedelmi forgalomból beszerezhető és a Lipase Ps-nél gyorsabban működő Lipase AK-val katalizált enzimes acilezést és hidrolízist (12. táblázat).

A mono- és diacetátok konfigurációját optikailag aktív diolokból nyert származékok optikai forgatásából állapítottuk meg. A preparatív léptéku reakció az öt, hat és héttagú vegyületeknél meglehetősen nagy szelektivitással, magas enantiomertisztaságú (*S,S*)-**6a-c** monoacetátot és (*R,R*)-**7a-c** diacetátot eredményezett, de a nyolctagú alkohol acilezésénél ugyanilyen körülmények között kisebb szelektivitást tapasztaltunk (12. táblázat).

12. táblázat Racém transz-2-acetoxicikloalkán-1-olok (*rac-6a-d*) Lipase AK által katalizált enzimes acilezése; transz-1,2-diacetoxicikloalkánok (*rac-7a-d*) Lipase AK-val katalizált hidrolízise.

Acilezés					Hidrolízis					
Szubsztrát	Ido (óra)	T (%) (<i>S,S</i>)-6	ee (%) ^b (<i>S,S</i>)-6	T (%) (<i>R,R</i>)-7	ee (%) ^b (<i>R,R</i>)-7	Szubsztrát	Ido (óra)	T (%) (<i>R,R</i>)-6	ee (%) ^b (<i>R,R</i>)-6	[α] _D ²² (<i>R,R</i>)-7
<i>rac-6a</i>	12	33	>99	43	>98	<i>rac-7a</i>	30	28	96	-28,2 ^c
<i>rac-6b</i>	10	36	97	37	>99	<i>rac-7b</i>	24	21	99	-43,8 ^d
<i>rac-6c</i>	18	36	>99	40	>98	<i>rac-7c</i>	24	37	>98	-21,9 ^c
<i>rac-6d</i>	52	43	94	44	n.d. ^a	<i>rac-7d</i>	30	25	9	-0,9 ^c

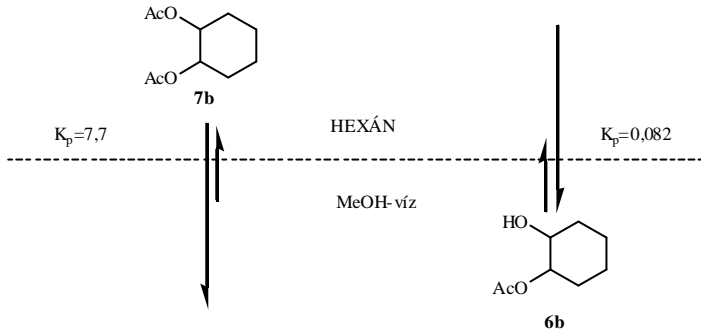
^a Nem detektálható; ^b Meghatározása GC-vel HP-Chiral vagy Beta-DEX 225 oszlopon történt; ^c c 1,0 acetonitrilben; ^d c 1,0 kloroformban;

3.4.1.2.3. A racém transz-2-acetoxiciklohexán-1-ollal végzett extrakciós kísérletek

A hidrolízishez a ciklohexán származékon (*rac-6b*) elokísérleteket végeztünk, hogy eldöntsük milyen közegben zajlik nagyobb szelektivitással és gyorsabban a hidrolízis. Összehasonlítottuk a nem pufferolt vizet, a 0,2 M foszfát puffert pH= 7,0; 7,5; 8,0. A kísérletekkel párhuzamosan 50 % vizes acetont tartalmazó mintákat is készítettünk. Azt tapasztaltuk, hogy a hidrolízis nem a foszfátpufferban, hanem vízben zajlott leggyorsabban és legmagasabb szelektivitással, ezért a hidrolízist is ebben a közegben végeztük (12. táblázat). A hidrolízis ugyan lassabban és kisebb szelektivitással játszódott le, mint az acilezések, de ezzel a módszerrel sikerült az optikailag aktív, enantiomertiszta (*R,R*)-**6a-c** monoacetátokat és (*S,S*)-**7a-c** diacetátokat is előállítani. A transz-2-acetoxicikloalkán-1-ol (*S,S*)-**6b** és (*R,R*)-**6b** enantiomerjei az irodalomban 28 °C olvadásponttal⁶⁰ vagy olajokként⁵⁵ szerepeltek, de méréseink alapján az enantiomertiszta monoacetátok kristályosak, 59,5-61 °C, illetve 57-59 °C olvadásponttal.

A preparatív léptéku reakciók könnyebb feldolgozása és a tiszta enantiomerek előállítása céljából extrakciós kísérleteket végeztünk, ezzel helyettesítve a végso kromatográfiás lépést. Azt az oldószerarányt kerestük, mellyel a monoacetát (*rac*-**6b**) és diacetát (*rac*-**7b**) megoszlási hányadosa a hexán-vizes:metanolos elegyben a legnagyobb eltérést mutatja. A kísérletekhez a hattagú racém monoacetát (*rac*-**6b**) és racém diacetát (*rac*-**7b**) egy-egy arányú keverékét használtuk (13. táblázat).

13. táblázat *transz*-2-acetoxiciklohexán-1-ol **6b** és a *transz*-1,2-diacetoxiciklohexán **7b** extraktív elválasztása^a



MeOH (%) vizes fázis ^a	7b (%) hexános fázis ^b	6b (%)	K_{7b}/K_{6b} ^c
0	8,1	88,0	83
10	8,5	92,8	138
20	7,6	92,5	149
30	6,3	88,6	115
40	6,1	80,6	64
50	3,5	68,4	59
60	2,9	50,9	34
70	1,8	35,7	30
80	1,8	24,3	17
90	2,6	21,0	10

^a Hexánban (1 ml) oldottunk **6b**-t (0,1 mmol) és **7b**-t (0,1 mmol), majd víz - MeOH különböző arányú keverékével (1 ml) kiráztuk; ^b A **6b** és **7b** (%) relatív megoszlása extrakció után a kiindulási hexános fázishoz képest, az eredményeket GC-vel HP-Chiral oszlopon mértük, belső standardnak undekánt használtunk; ^c A megoszlási hányadosok K_{7b} és K_{6b} aránya.

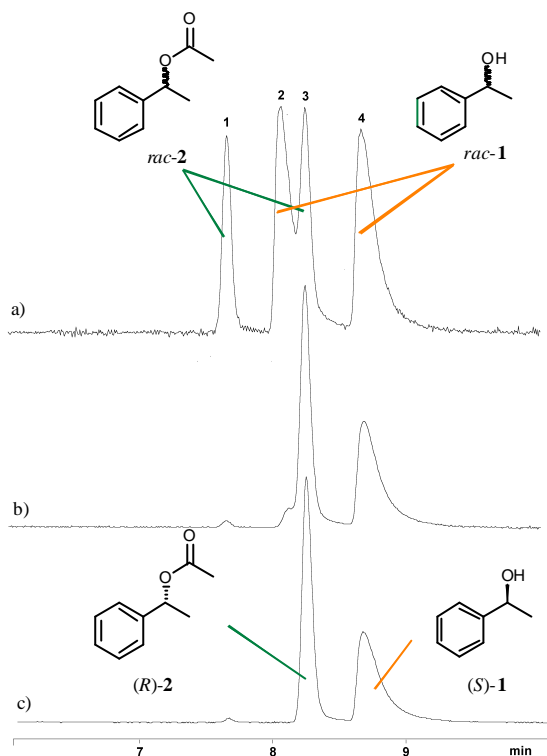
A 13. táblázatból jól látszik, hogy a 20% MeOH-víz eleggyel történő extrakció során kaptuk a legmagasabb megoszlási hányados, a K_{7b}/K_{6b} arányt. Ezzel az eljárással, a képződött optikailag aktív diacetát és monoacetát, kromatográfiás lépés nélkül elválasztható egymástól.

3.4.2. AZ 1-FENILETANOL ENZIMES ACILEZÉSE

Az 1-feniletanol (*rac*-**8**) enantiomerjei jól felhasználhatóak királis reagensekként enantiomertisztaság meghatározásához⁶¹, vagy gyurus anhidridek és epoxidok aszimmetrikus felnyitására⁶². A racém 1-feniletanol (*rac*-**8**) és észtereinek enzimés átalakítása kereskedelmi enzimekkel már jól ismert^{11, 63, 64}, ezért kézenfekvő volt, hogy az általunk előállított enzimeket ebben az enantiomer szelektív enzimreakcióban is teszteljük.

Mivel mind a kiindulási 1-feniletanol (*rac*-**8**) enantiomerjei, mind az acilezési reakcióban keletkező acetátok (**9**) enantiomerjeit sikerült királis állófázison végzett GC mérésel elválasztani, a reakció konverzióját és enantiomertisztaságát a reakció során nyomon követtük (10. ábra). Az enantiomer szelektivitás értékét (*E*), a bevezetoben leírt módon a konverzióból és a termék enantiomer összetételéből számítottuk⁹.

10. ábra A racém-1-feniletanol (**8**) és acetátjának (**9**) enantiomertisztaság meghatározása GC-vel



Az 1-feniletanol (**8**) és acetátjának (**9**) enantiomer tisztaság meghatározása GC-vel, HP-Chiral oszlopon^a *rac*-**8**: *rac*-**9** (55 : 45 w/w) keveréke; ^b A *rac*-**8** Lipozyme TL IM katalizált acilezése, 20 óra alatt; ^c A *rac*-**8** enzimes acilezése BUTE-15b lipázzal, 72 óra alatt

A GC mérés lehetővé tette, hogy az enzimes acilezési reakciókat analitikai méretben vizsgáljuk kereskedelmi enzimekkel és termofil fonalgombákból nyert enzimekkel (14. táblázat).

Az általunk tesztelt kereskedelmi enzimek között találtunk magas szelektivitással működőket (*E*>200), mint a Lipase Ps; Lipase AK; Novozyme 435 valamint a termofil fonalgomba eredetű Lipozyme IM. Az alkohol és az acetát abszolút konfigurációjának meghatározásához elvégeztük a racém 1-feniletanol (**8**) Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus* szilikagélre immobilizált lipáz) enzimmel végzett preparatív és analitikai léptéku enzimes acilezését.

Hasonló, nem optimalizált körülmények között (vinilacetáttal, hexánban) teszteltük az enantiotóp reakciókban (7. táblázat) jól működő enzimeinket is. Eredményeinket a 14. táblázatban foglaltuk össze. A táblázatból kitunik, hogy az enzimek mindegyike (*R*)-feniletanol-acetátot (*R*-**9**) szolgáltatott. Néhány enzim a kereskedelmi forgalomban kapható enzimekhez igen hasonló eredményeket adott (pl. BUTE-8b; BUTE-11b; BUTE-15b). A BUTE-3a enzim, optimalizálás nélküli körülmények között 48 óra alatt 50 % konverzióval,

kiemelkedően jó szelektivitással ($E \sim 2457$, $E > 1000$) katalizálta az enzim acilezést. A reakció időbeli előrehaladásával a konverzió nem változott, ami szintén az enzim nagyfokú szelektivitására utal. Ezt az eredményt a kereskedelmi enzimekkel összevetve is kiemelkedőnek mondható, így a preparatív léptéku enzimkatalízist ezzel a készítménnyel is elvégeztük, és az analitikai eredményekhez hasonlóan jó eredményt kaptunk.

14. táblázat Az 1-feniletanol (*rac*-8) enzim acilezése kereskedelmi és termofil fonalasgombából izolált enzimekkel

Enzim ^a	Ido (óra)	Konv(%) ^b	ee(%) ^b	E ^c
BUTE-3a	72	49,7	>99	>1000
BUTE-3b	96	12,3	>99	>200
Lipase Ps	48	49	>98	>200
Lipase AK	24	49	>98	>200
Novozyme 435	48	48	>98	>200
Lipase Ps	24	45	>98	>200
Lipozyme IM 20	48	42	>98	>200
Papain	48	40	>98	>200
BUTE-15b	72	50	>95	>200
BUTE-11b	24	11	>98	>100
BUTE- 8b	96	5	>98	>100
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	48	28	>95	>100
BUTE-12b	96	14	>95	>100
Lipozyme TL IM	20	47	>90	>100
BUTE-15a	72	50	>90	>100
BUTE-13a	168	6	>95	>50
BUTE-13b	168	10	>95	>50
PPL	48	10	>90	>50
Lipase M	48	8	>90	>50
Lipase A	48	7	>90	>50
Lipase R	48	6	>90	>50
BUTE-17a	168	5	>90	25
BUTE-7b	168	14	>50	12
BUTE-2b	72	24	>50	7,5
<i>Candida antarctica</i>	48	38	0,6	7
<i>Candida cylindracea</i>	48	10	0,6	5
Lipase AY	48	7	0,5	3,5
BUTE-1a	72	26	41,7	2,8
<i>Candida rugosa</i>	48	8	0,5	2,8
BUTE-14b	168	5	10,3	1,3
BUTE-1b	72	31	0,9	1,0

^a Csak a 168 óra alatt, ^b $> 5\%$ felett működő enzimek adatait tüntettük fel; ^b Az ee₉ és a α értékét GC-vel, HP-Chiral oszlopon határoztuk meg; ^c Az enantiomer szelektivitást (E), a ee₉ és a α közötti összefüggésből számítottuk: $E = \ln[1 - \alpha(1 + ee(P))]/\ln[1 - \alpha(1 - ee(P))]$ (ld 3.2.2.1 fejezet).;

3.4.3. A GLICERIN-KARBONÁT ENZIMES REAKCIÓI

Mint a bevezetőben már leírtuk, a királis C₃ egységek - mint amilyen a glicerinkarbonát (*rac*-**10**) is - fontos építőegységek lehetnek biológiailag aktív vegyületek előállításában⁶⁵.

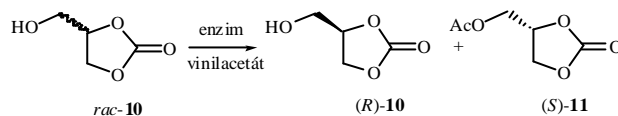
3.4.3.1. Elozmények

Az optikailag aktív glicerinkarbonát enzimkatalizált acilezéséről és hidrolíziséről már született publikáció^{65, 66}, melyben *Pseudomonas fluorescens* enzimmal mind az optikailag aktív (*R*)- glicerinkarbonátot (termelés: 40%, *E*=5,8, 71.6 %ee), mind az (*S*)- glicerinkarbonátot (termelés: 60%, *E*=19, 62,4%ee) sikerült előállítaniuk. Ezen eredmények alapján a magasabb enantiomertisztaságok elérése céljából teszteltük a rendelkezésünkre álló enzim preparátumokat.

3.4.3.2. A glicerinkarbonát enzimes acilezése

A glicerinkarbonát (*rac*-**10**) enzimes acilezését mind kereskedelmi forgalomban kapható enzimekkel, mind saját izolálású, termofil fonalgombákból nyert enzimkészítményekkel vizsgáltuk. Ezen eredményeinket a 15. táblázatban foglaltuk össze. A kereskedelmi forgalomban kapható enzimek mindegyike az (*S*)-alkoholt alakította át, így az (*R*)-alkoholt szolgáltatva. A legjobban működő Lipase Ps reakciójában 2 óra alatt 50% konverzióval képződött az (*S*)-glicerinkarbonát-acetátja ((*S*)-**11**, 52 %ee). Jó szelektivitással működtek a *Rhizopus javanicus*, Lipase F, Lipase N, Lipase AY enzim készítmények is. A Lipase AK, a Lipozyme TL IM és a Novozyme 435 rövid reakcióidővel, kis szelektivitással katalizálta a folyamatot.

A termofil fonalgombákból izolált enzimkészítményekkel történő acilezése során a tesztelt enzimek közül a BUTE-6a és 6b enzimkészítmény bizonyult legszelektívebbnek, (24 óra alatt 34 %-os konverzió mellett 74 % ee-t adott: *E*=10), ami a legszelektívebben működő kereskedelmi enzimmal (Lipase Ps, *E*= 5.1) valamivel magasabb enantiomer szelektivitási érték. Ez a szelektivitás (*E* ~ 10) a konverzió változtatásával a visszamaradó (*S*)-glicerinkarbonát (*S*-**10**) legfeljebb 70-75 % ee enantiomer tisztasággal történő előállítását teszi lehetővé. A BUTE-22a izolátum kevésbé szelektíven 3 óra alatt közel 50 %-os konverzióval, 39 % ee-vel szolgáltatva az (*S*)-acetátot ((*S*)-**11**). Az általában jó katalizátornak minősülő BUTE-3b enzimkészítmény 3 óra alatt 18%-os konverzióig (47% ee), míg ugyanez izolátum a másik rázatott lombikos táptalajon növesztett készítménye BUTE- 3a, 1 óra alatt 34 %-os konverzióig (20% ee) jutott. Tehát ennek a törzsnek az aktív enzime(i) - hasonlóan a Novozyme 435-höz - közel racém elegyet szolgáltatottak. Néhány saját izolálású enzim (BUTE-14b. 48 óra, 8% konv., *R*, 31%ee; BUTE-20b, 48 óra, 42% konv., *R*, 12% ee) ellentétes enantiomereket is (*R*-**11**) szolgáltatott. (ld. 15. táblázat)

15. táblázat A racém glicerín-karbonát (*rac*-**10**) enzimés acilezése kereskedelmi forgalomban kapható és termofil fonalagombákból izolált enzimekkel


Enzim ^a	Ido (óra)	Konv (%)	K	ee (%) ^b	E ^c
BUTE-6a	24	34	S	74	10
BUTE-6b	24	30	S	74	8,9
Lipase Ps	2	50	S	52	5,1
<i>Rhizopus javanicus</i>	48	6	S	67	5,2
Lipase F	48	6	S	58	3,8
Lipase N	24	22	S	50	3,5
BUTE-22b	24	59	S	37	3,5
Lipase AY	24	34	S	46	3,4
BUTE-23b	24	53	S	39	3,4
Lipase AK	1	87	S	14	3,4
BUTE-5b	24	58	S	36	3,3
BUTE-22a	3	49	S	39	3,2
<i>Mucor javanicus</i>	24	18	S	47	3,1
BUTE-3b	1	18	S	47	3,0
BUTE-4a	3	18	S	47	3,0
Lipozyme IM 20	1	48	S	37	3,0
BUTE-17b	3	20	S	43	2,8
Lipase G	48	10	S	44	2,7
BUTE-26a	24	10	S	42	2,6
Lipase M	48	25	S	40	2,6
Lipase R	24	40	S	36	2,6
Lipozyme IM	1	38	S	34	2,5
BUTE-2a	24	18	S	38	2,4
PLE	48	64	S	25	2,4
BUTE-21b	24	12	S	37	2,3
PPL	1	45	S	29	2,3
Lipozyme TL IM	1	86	S	11	2,2
Ccl	24	30	S	23	1,7
<i>Candida rugosa</i>	48	57	S	14	1,6
Lipase A	24	40	S	11	1,3
<i>Candida antarctica</i>	1	69	S	4	1,2
Novozyme 435	24	100	-	0	-
BUTE-7b	24	99	R	4	1
BUTE-10	48	21	R	1	1,2
BUTE-25b	3	50	R	1	1,3
BUTE-25a	24	6	R	1	1,3
BUTE-20b	48	42	R	12	1,3
BUTE-14b	48	8	R	31	2

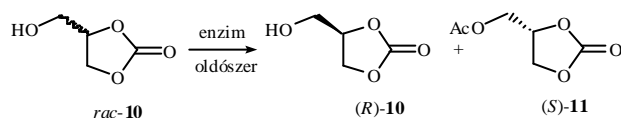
^aA táblázatban csak a 48 óra alatt, ? > 5 % felett működő enzimeket tüntettük fel; ^bAz (*S*)-**11** és (*R*)-**10** ee értékeit és a ? értékeit GC-vel, HP-Chiral oszlopon mértük; ^cAz *E* enantiomer szelektivitás értékét ee₁₀/ee₁₁ valamint a ? között fennálló összefüggés alapján számítottuk;

3.4.3.2.1. A glicerín-karbonát enzimés acilezésének oldószerfüggése

Az elokísérletek során a legjobb szelektivitást adó enzimekkel (Lipase Ps és BUTE 6a) vizsgáltunk az enzimreakció oldószerfüggését, mivel az enzimés reakcióknál az oldószer jelentősen befolyásolhatja a reakció sebességét és szelektivitását. Eredményeinket a 16. táblázatban foglaltuk össze. A reakciók során néhány oldószerrel oldhatósági problémák merültek fel (a glicerín-karbonát nem teljes oldódása – toluolban, *m*-xilolban, *p*-xilolban) – ami a szelektivitás felülbecslését eredményezi, így ezek esetében a GC-vel meghatározott konverziók nem tekinthetők pontosnak (ezeket a 16. táblázatban * -al jelöltük).

Az eredményekből látszik, hogy mind Lipase Ps, mind BUTE 6a esetén a vinilacetátban végzett acilezés (az elokísérleteket is ebben végeztük, ld. 15. táblázat) igen jó szelektivitást biztosított, míg Lipase Ps enzimnél a toluol jobb oldószernek bizonyult.

16. táblázat Racém glicerín-karbonát (*rac*-10) acilezése a legjobb kereskedelmi (Lipase Ps) és a legjobb termofil fonalgomba eredetű (BUTE 6a) enzimkészítményekkel, különböző oldószerben



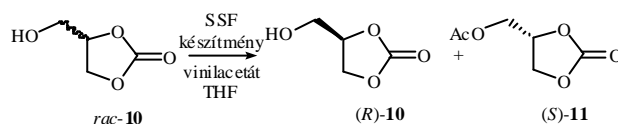
Lipase PS ^a					BUTE 6a ^a				
Oldószer	Ido(óra)	Konv(%)	ee(%)	E ^b	Oldószer	Ido(óra)	Konv(%)	ee(%)	E ^b
toluol*	0,5	36	80	13,6	vinilacetát	20	57	61	9,9
vinilacetát	1	48	71	11,3	toluol*	8,5	54	64	9,8
etilacetát	2	56	62	9,9	THF	20	19	77	9,3
acetonitril	5	18	77	8,9	THF:hexán	20	43	69	8,9
<i>t</i> -butanol	2	45	65	8,0	metil-etil-ke-ton	24	40	68	8,2
dioxán	20	18	73	7,4	diklórmétán	24	38	68	7,8
tetralin	20	62	50	7,2	EtAc	20	28	71	7,5
aceton	5	39	65	7,0	toluol:vinilacetát	5	35	68	7,4
THF:hexán	2	54	57	7,0	aceton	20	16	73	7,2
THF	5	49	55	5,7	<i>p</i> -xilene*	24	62	50	7,2
anizol	20	3	55	3,6	kloroform	24	45	63	7,1
					dioxán	24	5	74	6,8
					BuOH	20	32	66	6,6
					acetonitril:vinilacetát	3,5	8	70	5,9
					acetonitril	5	3	67	5,1
					metil-tert-butil-éter	24	75	30	4,8
					<i>m</i> -xilene*	24	70	43	-

Reakció körülmények: 30 mg glicerín-karbonát, 2 ml oldószer, 0,5 ml vinilacetát, 50 mg Lipase Ps vagy BUTE 6a; ^aA táblázatban csak az értékelhető méréseket soroltuk fel, voltak oldószer, melyek oldhatósági probléma miatt részben csak az acetátot vagy alkoholt oldották, ezáltal nem adtak megbízható eredményt, vagy az enzim teljes szelektivitás veszteségét eredményezték. Így a táblázatból kimaradt a mezitilén, bróm-benzol, klór-benzol, metil-tert-butil-éter, ciklohexán, ciklohexanon, dekalin oldószerrel kapott eredmények; ^b Az *E* enantiomer szelektivitás értékét ee₁₀/ ee₁₁ valamint a ? között fennálló összefüggés alapján számítottuk;

3.4.3.2.2. A glicerín-karbonát enzimés acilezése szilárd fázisú fermentációval előállított készítményekkel

A termofil gombákkal kapott biztató eredmények után úgy gondoltuk, hogy a szilárd fázisú fermentációval előállított szárított enzimekészítmények egy részét is teszteltük a glicerín-karbonát acilezési reakciójában (17. táblázat). Legjobb készítménynek a BUTE 34R bizonyult, ami 24 óra alatt, 22%-os konverzióval, $E=4,2$ szolgáltatta (*S*-**11**) acetátot. Ez az E érték alulmaradt az elokísérletek során kapott eredményekhez képest, de figyelembe véve, hogy a szilárd fázisú fermentációs készítmények jóval kisebb fajlagos aktivitással rendelkeznek, mint a rázatott lombikos fermentációban kapott szárított enzimekészítmények, így a továbbiakban a szilárd fázisú fermentációval, ezek az értékek növelhetőek.

17. táblázat A racém glicerín-karbonát (*rac*-**10**) enzimés acilezése szilárd fázisú fermentációval (SSF) előállított enzimekészítményekkel



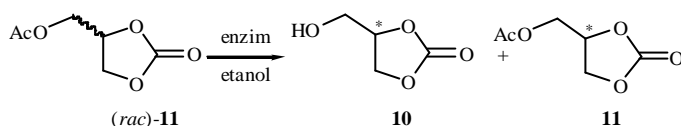
Törzs kód ^a	Táptalaj	Ido (óra)	Konf. ^b	Konv. (%) ^c	ee (%) ^c	E^d
BUTE 34R	repcemag	24	<i>S</i>	22	57	4,2
BUTE 21R	repcemag	24	<i>S</i>	23	42	2,8
BUTE 30BK	búzakorpa	24	<i>S</i>	67	23	2,4
BUTE 37BK	búzakorpa	24	<i>S</i>	48	22	1,9
BUTE 34BK	búzakorpa	24	<i>S</i>	24	28	1,9
BUTE 31BK	búzakorpa	24	<i>S</i>	52	21	1,9
BUTE 37R	repcemag	24	<i>S</i>	42	19	1,7
BUTE 30R	repcemag	24	<i>S</i>	75	12	1,7
BUTE 3BK	búzakorpa	24	<i>S</i>	88	7	1,6
BUTE 20BK	búzakorpa	24	<i>S</i>	82	7	1,5
BUTE 3R	repcemag	24	<i>S</i>	75	1	1,5
BUTE 36R	repcemag	24	<i>S</i>	82	7	1,5
BUTE 32R	repcemag	24	<i>S</i>	80	6	1,3

Reakciókörülmények: 30mg glicerín-karbonátot feloldunk 2 ml THF-ben, hozzáadunk: 0,5ml vinilacetátot és 200 mg szilárd fázisú fermentációs enzimet. ^aA táblázatban a 24 óra alatt, $? > 5\%$ felett működő enzimek adatait tüntettük fel; ^bAz acetát **11** konfigurációja. ^cAz (*S*)-**11** és (*R*)-**10** ee értékeit és a $?$ értékeit GC-vel, HP-Chiral oszlopon mértük; ^dAz E enantiomer szelektivitás értékét ee_{10}/ee_{11} valamint a c között fennálló összefüggés alapján számítottuk;

3.4.3.2.3. A glicerín-karbonát-acetát enzimés hidrolízise/alkoholízise

A rendelkezésünkre álló enzimek közül, az acilezési elokisérletek (15. táblázat) során pozitív eredményt adó enzimek készítményekkel (20 kereskedelmi és 16 termofil fonalagombából előállított enzimek készítmény) vizsgáltuk a glicerín-karbonát acetátjának (2-oxo-[1,3]dioxolán-4-il)metil acetát; *rac*-**11**) enzimés hidrolízisét is, mivel a racém acetát vissza-hidrolízisével, az ellentétes enantiomer alkoholt nyerhetjük. A tesztelt kereskedelmi enzimek közül a Lipase Ak katalizált reakció (24 óra, 49 % konverzióval, $E=9,5$) zajlott a legjobb szelektivitással, de hasonlóan jól működött a Lipase Ps és a PPL is. Az általunk tesztelt többi enzimmel a reakció 24 óra alatt nem jutott el 5 %-os konverzióig (18. táblázat).

18. táblázat Racém glicerín-karbonát acetát (*rac*-**11**) enzimés alkoholízise néhány lipáz készítménnyel



Enzim ^a	Ido (óra)	Konf ^b	Konv (%) ^c	ee (%) ^c	E^d
Lipase Ak	24	<i>R</i>	49	66	9,5
PPL	24	<i>R</i>	63	41	4,7
Lipase Ps	24	<i>R</i>	24	22	1,6
Novozyme 435	24	<i>S</i>	81	31	-

Reakciókörülmények: 50 mg glicerín-karbonátot feloldunk 1 ml acetonban, hozzáadunk 1 ml etanolt és 50 mg enzimet. ^a A táblázatban a 24 óra alatt, $? > 5\%$ felett működő enzimek adatait tüntettük fel; ^b Az acetát **11** konfigurációja. ^c A **11** és **10** *ee* értékeit és a $?$ értékeit GC-vel, HP-Chiral oszlopon mértük; ^d Az *E* enantiomer szelektivitás értékét ee_{10}/ee_{11} valamint a $?$ között fennálló összefüggés alapján számítottuk;

3.4.4. HETEROCIKLUSOS ALKOHOLOK ENZIMES REAKCIÓI

A BME Szerves Kémia Tanszékének és a Babes-Bolyai Egyetem Biokémia és Biotechnológia Tanszékének együttműködésével már évek óta folynak kísérletek egyes optikailag aktív heterociklusos vegyületek - szintézisintermedierek, köztitermékek - enzimatisz előállításának vizsgálatára.

A heterociklusos vegyületek számos gyógyszerhatóanyag ⁶⁷ (indometacin, allopurinol, mebendazol stb.) alapvázában fellelhető, fontos építőegységek, melynek előállítása kulcsfontosságú egyes gyógyszerhatóanyagok előállításához.

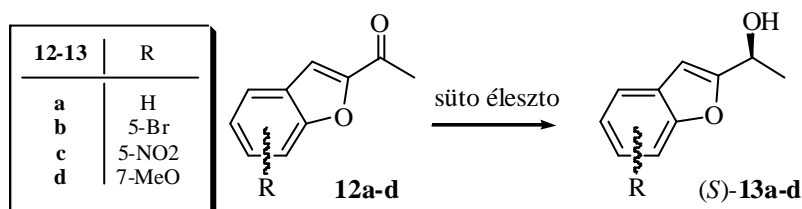
Ilyen fontos alapvázak lehetnek az indolok, benzofuránok, az O, N, S tartalmú gyuruk, melyek származékainak optikailag aktív előállítása sok esetben a gyógyszer-szintézis meghatározó lépése.

3.4.4.1. Az 1-(benzofurán-2-il)etanol enzimes acilezése

3.4.4.1.1. Elozmények

A benzofurán alapváz számos biológiailag aktív molekula fontos építőegysége. A (benzofurán-2-il)-karbinolok változatos biológiai aktivitással rendelkeznek. Származékaik antibakteriális⁶⁸ és antifungális^{68, 69} hatóanyagok. Az optikailag aktív 2-(2-terc-butilamino-1-hidroxietyl)benzofuránokat, mint β -blokkolókat tanulmányozták⁷⁰ (ld. 5. ábra). A 2-szubsztituált benzofuránok képesek gátolni a HIV-1 reverz transzkriptázt⁷¹ vagy antiágens vegyületekként viselkednek⁷². Mivel a biológiailag aktív királis molekuláknak csak az egyik enantiomerje hatásos, lényeges kérdés a tiszta enantiomerek előállítása, amit biokatalízissel valósíthatunk meg.

19. táblázat Az 1-(benzofurán-2-il)etán származékok (**12a-d**) aszimmetrikus redukciója sütoélesztóvel



Termék	Ido (óra) ^a	Term(%) ^a	[α] _D ^b	ee (%)
(S)- 13a	168	60	-9.1 ^c	55
(S)- 13b	168	74	-9.4	65
(S)- 13c	168	61	-16.8	88
(S)- 13d	168	66	-10.2	68

^a nem fermentált rendszer (cukorral); ^b t = 20 °C, (c = 1.00, CHCl₃); ^c Irod. [α]_D = +19.9 (c = 1.21, CHCl₃) (R)-**13a**⁷³

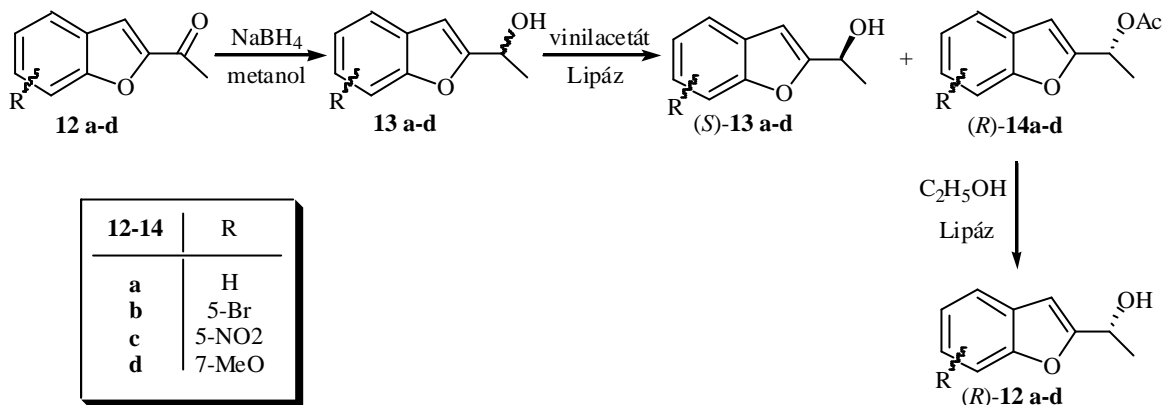
A hidroximetil ketonok és acetoximetil ketonok mind kémiai úton, mind sütoélesztóvel alkohollá redukálhatóak^{77, 78, 81}. A kémiai redukció eredményeként a racém alkoholokat kaphatjuk meg, a sütoélesztóvel történő redukció jó lehetőséget nyújt optikailag aktív enantiomerek előállítására is^{86, 87}. Az 1-(benzofurán-2-il)etán származékok (**12a-d**) sütoélesztős redukcióját mind fermentált, mind nem fermentált közegben tesztelték, és azt tapasztalták, hogy a fermentált rendszerben gyorsabban, de gyengébb szelektivitással (80 % termelés, 48 óra, 20 % ee), míg nem-fermentált körülmények között végzett sütoélesztős redukció során (60 % termelés, 168 óra, 55 % ee) magasabb enantiomertisztaságú termékeket kaptak (19. táblázat)⁸².

3.4.4.1.2. Az 1-(benzofurán-2-il)etanol enzimatisz átalakítása

A sütoélesztóvel végzett redukciók során a Prelog-szabálynak megfelelően csak az (S)-enantiomerek keletkeztek, közepes 58-88 % ee-vel, így kézenfekvő volt a kérdés, hogy a racém alkoholból kiindulva enzimkatalizált acilezés segítségével lehet-e magasabb enantiomertisztaságokat elérni. A racém alkoholokat (**13a-d**) kereskedelmi enzimekkel, rázatott lombikos fermentációval előállított enzimekkel, illetve a legjobb saját szilárd fázisú fermentációval előállított készítményeinkkel végzett acilezési reakcióban teszteltük

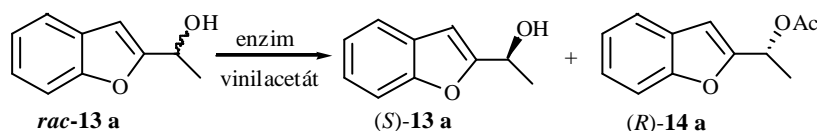
83, 84, 85, majd az acilezési reakcióval kapott *(R)*-**14a-d** acetátokból enzimkatalizált alkoholízissel előállítottuk a másik enantiomer alkoholt is. Eredményeinkből két publikáció született^{86, 87}.

11. ábra Az 1-(benzofurán-2-il)etanol származékok (**13a-d**) enzimes acilezése



A racém 1-(benzofurán-2-il)etanolokkal (**13a-d**) vinilacetátban végzett enzimátikus acilezés eredményeit a 20. táblázatban foglaltuk össze. Az enantiomer- tisztaságot királis fázison GC-vel és HPLC-vel határoztuk meg. A korábbi publikációkban már leírt *Pseudomonas* lipázok (Lipase Ps, Lipase Ak-val) itt is nagyon magas (14 óra, 50 % konverzió, *R, E*»100) szelektivitás értékekkel szolgáltatták az *(R)*-**14a** acetátot és a visszamaradó *(S)*-**13a** alkoholt, míg néhány gomba eredetű enzim – az immobilizált Lipozyme TL IM és néhány általunk előállított termofil fonalgomba készítmény: BUTE 3b – is kituno szelektivitásértékeket adott (24 óra, 50 %-os konverzió, *R, E*»100).

20. táblázat: Az 1-(benzofurán-2-il)etanol (*rac*-**13a**) enantiomer szelektív acilezése



Enzim ^a	Ido (óra)	Konv (%) ^b	ee (%) <i>(R)</i> - 14a ^c	ee (%) <i>(S)</i> - 13a ^c	<i>E</i> ^c
BUTE 3b	24	50	>99	>99	»100
Lipase AK	14	50	99	99	»100
Lipozyme TL IM	14	35	99	52	»100
Lipase PS	14	45	98	82	»100
PPL	48	16	99	18	»100
Novozyme 435	14	52	96	>98	>100
BUTE 16b	48	10	98	11	90
BUTE 4a	48	7	97	7	77
BUTE 20b	48	12	86	11	15
CrL	72	12	83	11	12
CcL	48	22	80	22	11
Lipase AY	48	8	79	7	9
Lipase F	72	11	88 ^d	11 ^e	18
<i>Rh. javanicus</i>	72	3	47 ^d	1 ^e	3

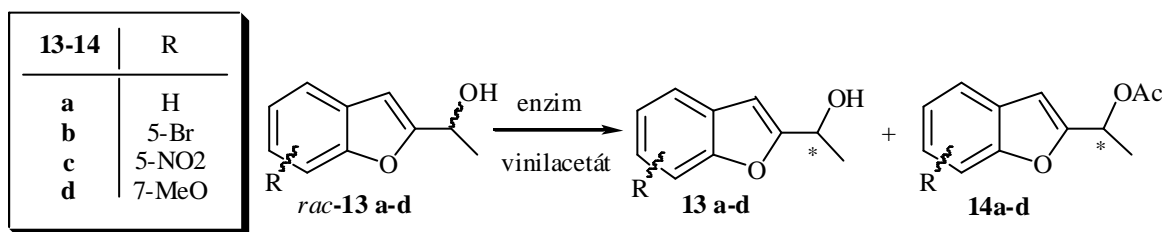
^a Csak azok a reakciók, melyek 72 óra alatt >5 % eljutottak. ^b Az adatokat GC, HP -Chiral oszlopon mértük; ^c A konverzióból és a ee_{14a}-ból számítottuk; ^d *(S)*-**14a** volt a termék; ^e *(R)*-**13a** volt a termék;

Érdekes, hogy a tesztelt enzimek közül a *Rhizomucor* eredetű készítmények (*Rhizomucor javanicus*, Lipase F) lassabban és kisebb enantiomer szelektivitással (72 óra, 11 % konverzió, *S*, *E*=18), de a másik, (*S*)-**14a** acetátot szolgáltatta. Ezen eredmények alapján a többi benzofurán származék enzimátikus acilezését is teszteltük, kiválasztott enzim készítményekkel, vagyis a legszelektívebb termofil fonalgomba eredetű, saját BUTE-3b enzimekkészítménnyel, a legszelektívebb kereskedelmi enzimmel, a Lipase AK-val és az ellentétes szelektivitású terméket szolgáltatató, kereskedelmi Lipase F enzimekkészítménnyel.

A 21. táblázat eredményei alapján jól látszik, hogy mind BUTE 3b-vel, mind Lipase Ak-val magas enantiomertisztaságú termékeket - (*R*)-**14a** acetátot és (*S*)-**13a** alkoholt - állítottunk elő. A BUTE 3b enzimekkészítmény a Lipase AK-val összehasonlítva valamivel szelektívebbnek bizonyult mind a négy benzofurán származékon.

A tesztelt három enzim, a nem szubsztituált benzofurán acilezéséhez képest (*rac*-**13a**) az 5 és 7 pozícióban szubsztituált származékok acilezését (**13b-d**) szignifikánsan alacsonyabb reakciósebesség mellett, kisebb szelektivitással katalizálta.

21. táblázat Az 1-(benzofurán-2-il)etanolok (*rac*-**13a-d**) BUTE 3b-vel, Lipase AK-val és Lipase F-el katalizált enantiomer szelektív acilezése

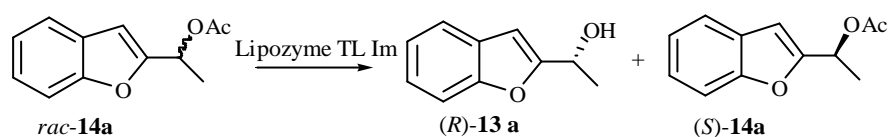


Termékek 13, 14	Lipáz	Ido (óra)	konv ^a (%)	14 Konf ^b	ee (%) ^a	13 Konf ^b	ee (%) ^c	<i>E</i> ^c
a	BUTE 3b	24	50	<i>R</i>	>99	<i>S</i>	>99	»100
b	BUTE 3b	168	49	<i>R</i>	97	<i>S</i>	99	»100
c	BUTE 3b	24	50	<i>R</i>	>99	<i>S</i>	>99	»100
d	BUTE 3b	168	51	<i>R</i>	98	<i>S</i>	>99	»100
a	Lipase AK	14	49	<i>R</i>	99,1	<i>S</i>	98,6	»100
b	Lipase AK	18	49	<i>R</i>	98,6	<i>S</i>	97,5	»100
c	Lipase AK	72	43	<i>R</i>	>99,8	<i>S</i>	81	»100
d	Lipase AK	72	42	<i>R</i>	99,1	<i>S</i>	81	»100
a	Lipase F	72	11	<i>S</i>	88	<i>R</i>	11	18
b	Lipase F	168	13	<i>S</i>	95	<i>R</i>	15	44
c	Lipase F	168	12	<i>S</i>	89	<i>R</i>	12	20
d	Lipase F	168	5	<i>S</i>	99	<i>R</i>	6	>100

^a Az eredményeket GC, HP-Chiral oszlopon mértük; ^b ismert konfigurációjú vegyületekre vezettük vissza; ^c A konverzió és az ee₁₃/ee₁₄ alapján számítottuk.

Az acilezést követően teszteltük a benzofurán származékok enzimés hidrolízisét/alkoholízisét is, mivel ezzel a módszerrel az alkohol másik (*S*)-**13a** enantiomerjét is elő lehet állítani. Az alkoholízist az immobilizált Lipozyme TL IM-enzimmal végeztük. A hidrolízist vízben, az alkoholízist metanolban, etanolban, propanolban és butanolban, szobahőmérsékleten végeztük. (A módszer, 22. táblázat) Ezen eredményeinket megismételtük szuperkritikus CO₂-ban, 38 °C-on⁸⁸ (C módszer), illetve a szuperkritikus körülményeket modellezo 10%-os hexános oldatban is (B módszer).

22. táblázat Az 1-acetoxi-1-(benzofurán-2-il)etán (*rac*-**14a**) hidrolízise/alkoholízise^a



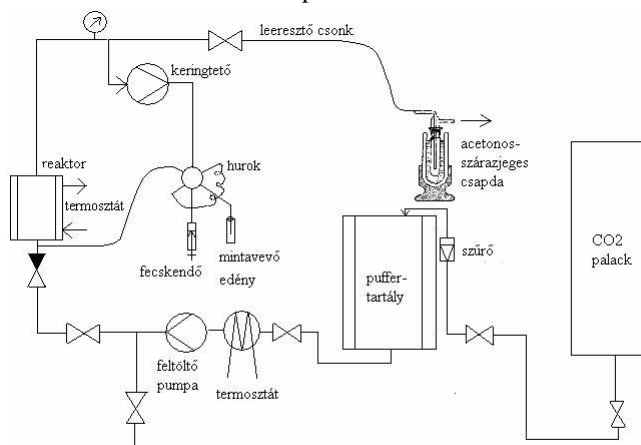
Módszer ^a	Nukleofil	Ido (h)	konv ^b (%)	ee (%) (<i>S</i>)- 13a ^c	ee (%) (<i>R</i>)- 14a ^b	<i>E</i> ^c
A	H ₂ O	24	40	34	50,0	11,4
B	H ₂ O	24	20	4	17,5	7,2
C	H ₂ O	4	9	7	6,7	5,2
A	MeOH	24	3	<1	0,7	1,5
B	MeOH	24	5	<1	3,7	8,8
C	MeOH	4	4	<1	1,3	2,1
A	EtOH	24	3	<1	2,1	12,8
B	EtOH	24	11	1	9,4	8,5
C	EtOH	4	11	<1	1,6	1,3
A	PrOH	24	7	<1	7,7	54,9
B	PrOH	24	25	8	24,2	8,2
C	PrOH	4	6	<1	3,2	3,3
A	BuOH	24	30	6	14,3	2,3
B	BuOH	24	41	41	58,2	19,6
C	BuOH	4	6	<1	1,0	1,4

^a A módszer: nukleofil ágensben, B módszer: hexán és nukleofil (10 %) keveréke, ez modellezi a szuperkritikus oldószert, C módszer: szuperkritikus CO₂ és nukleofil (1%). A reakció A és B módszerrel szobahőmérsékleten ment, C módszer esetén 38 °C; ^b Az eredményeket GC-vel, HP-Chiral oszlopon mértük; ^c A konverzióból és ee₁₄-ból számítottuk.

A szuperkritikus állapotú oldószerekre jellemző, hogy nyomásuk és hőmérsékletük az oldószerre jellemző kritikus érték feletti. A hagyományos szerves oldószerekkel szembeni előnyük, hogy a nyomás és a hőmérséklet változtatásával az oldóképességük szabályozható, ezáltal lehetővé válik a termék és a szubsztrát elválasztása az oldószer lépcsőzetes expandálásával.

Oldószerként leggyakrabban az alacsony kritikus nyomással (73 bar) és hőmérséklettel (38°C) rendelkező szén-dioxidot használják. A CO₂ nem oldja az enzimet viszont jól oldja az apoláris molekulákat (szubsztrát és termék) így azok az enzimtől könnyen elválaszthatók. A szén-dioxid maradék nélkül eltávozik a termékből és a relatíve nagy diffúzivitás miatt jó anyagtranszport valósítható meg. Nem tűzveszélyes és nem szennyezi a környezetet (bár mérgező), ezért biztonságtechnikai és környezetvédelmi szempontból is megfelelő.

12. ábra A szuperkritikus extrakciós készülék felépítése

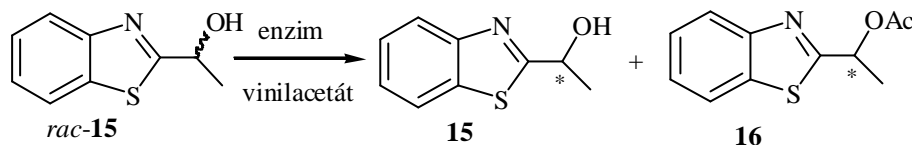


3.4.4.2. Az 1-(benzotiazol-2-il)etanol enzimkatalizált acilezése

A benzofurános kísérleteket követően feltételeztük, hogy hasonló geometriájú gyűrűrendszert tartalmazó heterociklusos alkoholokon, mint amilyenek az 1-(benzotiazol-2-il)etanol is, hasonlóan jó szelektivitással működő enzimeket találhatunk.

3.4.4.2.1. Az 1-(benzotiazol-2-il)etanol enzimés átalakítása

A racém alkoholt kereskedelmi enzimekkel, rázatott lombikos fermentációval előállított enzimekkel, illetve a legjobb törzsek szilárd fázisú fermentációs enzimkészítményeivel végzett acilezési reakcióban teszteltük. A legjobban működő készítmények reakcióinál vizsgáltuk a folyamat oldószerfüggését a reakció sebesség és szelektivitás javítása céljából.

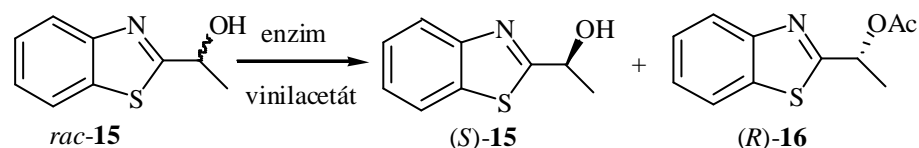
23. táblázat Az 1-(benzotiazol-2-il)etanol (*rac*-**15**) kereskedelmi enzimekkel végzett acilezése

Enzim ^a	Ido (óra)	Konv (%) ^b	Konf.	ee (%) ^b	<i>E</i> ^c
Novozyme 435	1,5	50	<i>R</i>	>99	>200
Lipase Ps	3	50	<i>R</i>	>99	>100
Lipase Ak	1,5	45	<i>R</i>	>99	>100
Lipozyme IM 20	1,5	5	<i>R</i>	>95	>50
Lipozyme IM	24	34	<i>R</i>	>95	>50
PLE	24	18	<i>R</i>	>95	>50
PPL	48	12	<i>R</i>	>90	>30
Lipase AZ	48	8	<i>R</i>	>90	>30
Lipase M	48	4	<i>R</i>	>90	>30
CcL	3	20	<i>R</i>	76	30
Lipase F	24	13	<i>S</i>	91	45
<i>Rhizopus javanicus</i>	24	1	<i>S</i>	>95	>50

^a Csak azok a reakciók, melyek 48 óra alatt >3 % eljutottak, kivéve a *Rhizopus javanicus* törzset. ^b Az adatokat GC, HP-Chiral oszlopon mértük; ^c A konverzióból és a ee₁₆-ból számítottuk;

Az 1-(benzotiazol-2-il)etanol (*rac*-**15**) kereskedelmi enzimekkel végzett enzim acilezése során a Novozyme 435 és Lipase Ps esetén bizonyult leginkább szelektívnek (23. táblázat). Ezen enzimekkel 50 % konverzióval gyakorlatilag enantiomertiszta (*R*)-**16** acetátot nyertünk. Hasonlóan jó eredményt kaptunk a Lipase AK-val is. A kereskedelmi enzimek többsége igen jó szelektivitással szolgáltatja az (*R*)-**16** acetátot, de hasonlóan a benzofurán származékok (**13a-d**) enzimatis acilezéséhez (21. táblázat) a Lipase F - a *Rhizopus sp.*-ből nyert enzim- lassabban ugyan, de az ellentétes (*S*)-**16** enantiomert képezte. A kereskedelembe még egy *Rhizopus* törzs (*Rhizopus javanicus*) által termelt lipáz beszerezhető, amelyik a Lipase F-vel azonos szelektivitással, de annál lassabban katalizálta a folyamatot. A Novozyme 435 a *Candida antartica* immobilizált lipáz készítménye 1,5 óra alatt 50 %-os konverzióval enantiomertiszta (*R*)-acetátot termelt, ám a reakcióido növelésével az (*S*)-acetát is képződött, így a második legjobb Lipase Ps enzimet használtuk fel a preparatív léptéku reakcióhoz.

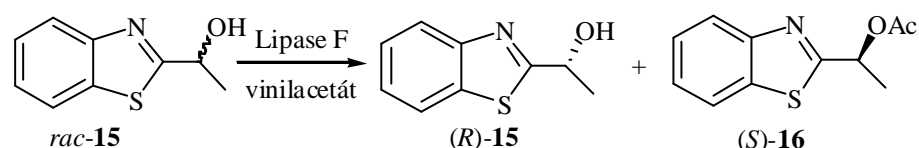
Mivel ebből az enzimműködésből különböző immobilizált készítmények is rendelkezésünkre álltak, és ismert, hogy az immobilizálás során az enzim aktivitása és szubsztrát specifikusa jelentősen változik az immobilizálásra használt hordozótól függően további acilezési teszteket végeztünk (24. táblázat). A rendelkezésünkre álló két kereskedelmi immobilizált Lipase Ps készítmény nem mutatott jelentős időbeli/szelektivitásbeli különbséget a nem immobilizált készítményhez képest. Minden esetben *E*>100 enantiomer szelektivitással kaptuk az (*R*)-**16** acetátot és a visszamaradó (*S*)-**15** alkoholt.

24. táblázat Az 1-(Benzotiazol-2-il)etanol (*rac*-**15**) immobilizált Lipase Ps-enzimokkal katalizált acilezése

Enzim	Ido (óra)	Konv (%) ^a	Konf.	ee (%) ^a	<i>E</i> ^b
Lipase Ps	3	50	<i>R</i>	>99	>100
Lipase Ps-diatomit	3	49	<i>R</i>	>99	>100
Lipase Ps-TOYONITE	3	49	<i>R</i>	>99	>100

^a Az adatokat GC, HP-Chiral oszlopon mértük; ^c A konverzióból és a *ee*₁₆-ból számítottuk;

Szintetikus szempontból érdekes kérdés, hogy a másik, ellentétes enantiomert (*S*)-**15** preferáló Lipase F-el milyen módon javítható az enzim acilezési folyamat sebessége. Ehhez oldószerfüggési vizsgálatokat végeztünk. Az acetonitrilben végzett acilezési reakció azonos idő alatt nagyobb konverzióig jutott el, mint az első teszthez használt hexános közegben, de az is jónak mondható. Általánosságban elmondható, hogy a Lipase F kisebb konverzióig jut el, lassabban katalizálja a folyamatot, de nagyfokú szelektivitással állítja elő az (*S*)-**16** acetátot és az (*R*)-**15** alkoholt.

25. táblázat Az 1-(benzotiazol-2-il)etanol (*rac*-**15**) Lipase F által katalizált acilezési reakciójának oldószerfüggése

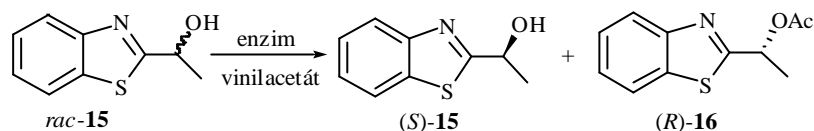
Oldószer ^a	Ido (óra)	Konv (%)	Konf.	ee (%)	<i>E</i> ^b
acetonitril	96	15	<i>S</i>	98	>200
hexán	96	9	<i>S</i>	98	>200
diklórometán	24	5	<i>S</i>	95	>100
toluol	24	3	<i>S</i>	95	>100
vinilacetát: hexán 1:2	24	2	<i>S</i>	95	>100
aceton	96	2	<i>S</i>	95	>100
kloroform	24	1	<i>S</i>	90	>50
etilacetát	24	1	<i>S</i>	90	>50
<i>t</i> -butanol	48	1	<i>S</i>	90	>50
THF	24	1	<i>S</i>	90	>50
dietil-éter	24	0	-	-	-

^a Az adatokat GC, HP-Chiral oszlopon mértük; ^b A konverzióból és a *ee*₁₆-ból számítottuk;

A kereskedelmi forgalomban kapható enzimeken kívül a termofil fonalgombákból izolált, rázatott lombikos enzimpороkat is teszteltük a 1-(Benzotiazol-2-il)etanol (*rac*-**15**) enzim acilezésére és azt tapasztaltuk, hogy hasonlóan a benzofurán származékokhoz, itt is kimagaslóan jó szelektivitással katalizálta a reakciót a BUTE-3b (*E*>200,) és az

ugyanazon törzsbe tartozó termofil fonalagombákból nyert izolátumok. (BUTE-3a; BUTE-30; BUTE-31; BUTE-34; BUTE-35; BUTE-36; BUTE 37; BUTE-41). (26. táblázat) Ezen enzimek készítmények mindegyike az (*R*)-**16** acetátot szolgáltatta és a visszamaradt az (*S*)-**15** alkohol.

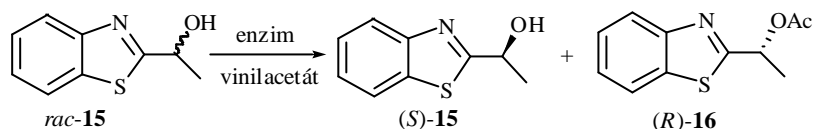
26. táblázat Az 1-(benziazol-2-il)etanol (*rac*-**15**) enzim acilezése termofil fonalagombákból nyert készítményekkel



Enzim ^a	Ido (óra)	Konv (%) ^b	ee (%) ^b	E ^c
BUTE-37b	24	50	>98	>200
BUTE-36a	24	50	>98	>200
BUTE-30b	48	50	>98	>200
BUTE-31a	48	49	>98	>200
BUTE-30a	24	49	>98	>200
BUTE-41b	24	47	>98	>200
BUTE-31b	24	47	>98	>200
BUTE-3b	2	46	>98	>200
BUTE-35a	2	46	>98	>200
BUTE-36b	24	45	>98	>200
BUTE-37a	24	44	>98	>200
BUTE-35b	2	30	>98	>200
BUTE-6b	48	8	>98	>200
BUTE-46a	24	30	>95	>100
BUTE-41a	24	20	>95	>100
BUTE-34a	2	20	>95	>100
BUTE-46b	24	12	>90	>50
BUTE-39b	24	9	>90	>50
BUTE-39a	24	7	>90	>50
BUTE-2a	48	11	60	4,2
BUTE-26b	48	19	36	2,3
BUTE-7b	1,5	5	37	2,2
BUTE-25b	48	10	26	1,7
BUTE-10	24	16	20	1,5
BUTE-21b	24	6	13	1,3

^a A táblázatban a 48 óra alatt, ? >5% meghaladó konverziót elérő reakciókat tüntettük fel; ^b Az adatokat GC, HP -Chiral oszlopon mértük; ^c A konverzióból és a ee₁₆-ból számítottuk;

A BUTE-3 törzssel kapott jó eredmények hatására felmerült a kérdés, hogy ugyanezen törzs szilárd fázisú fermentációval előállított enzimek készítményei hasonlóan jó biokatalizátorok-e. (27. táblázat) A két rázatott lombikos táptalajon, illetve repcemagon, búzakorpán szilárd fázisú fermentációval előállított enzimek készítmények hasonlóan jó (*R*)-szelektivitással szolgáltatta az (*R*)-**16** acetátot, de egyes esetekben lassabban katalizálták a folyamatot.

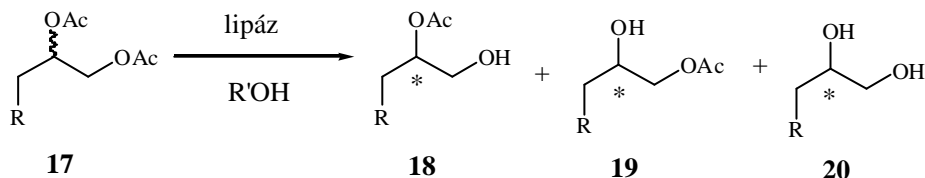
27. táblázat Az 1-(benzotiazol-1-il)etanol (*rac*-**15**) enzimés acilezése rázatott lombikos táptalajon és szilárd fázisú fermentációval növesztett BUTE-3 törzssel

Enzim ^a	Ido (óra)	Konv (%) ^b	Konf.	ee (%) ^b	E ^c
BUTE-3b	1	47	R	>98	>200
BUTE-3a	1	38	R	>98	>200
BUTE-3R	20	13	R	>95	>100
BUTE-3BK	20	29	R	>95	>100

^a 20 mg alkoholt (**15**) oldottunk 0,5 ml vinilacetátban, majd 1,5 ml hexánt adtunk hozzá. Az így nyert oldathoz 30 mg termofil fonalgomba eredeti enzimmészítményt vagy 50 mg szilárd fázisú fermentációs készítményt adtunk; ^b Az adatokat GC, HP-Chiral oszlopon mértük; ^c A konverzióból és a ee₁₆-ból számítottuk;

3.4.5. A RACÉM 3-KLÓRPROPÁN-1,2-DIOL ENZIMES KINETIKUS REZOLVÁLHATÓSÁGÁNAK VIZSGÁLATA

A racém 3-klórpropán-1,2-diol jó szintetikus alapanyagának számít. Optikailag aktív enantiomerjeivel értékes szintetikus C₃ építőegységeket állíthatunk elő.



R= Cl: 3-klórpropán-1,2-diol diacetát
R= CN: 3,4-dihidroxibutironitril diacetát

Kereskedelmi és saját készítésű enzimekkel vizsgálatokat végeztünk a racém 3-klórpropán-1,2-diol enzimés acilezésére és megállapítottuk, hogy a folyamat viszonylag gyenge szelektivitással játszódik le és termékül a diol, a két monoacetát és diacetát elegyét kaptuk, amelyek szétválasztását GC segítségével oldottuk meg.

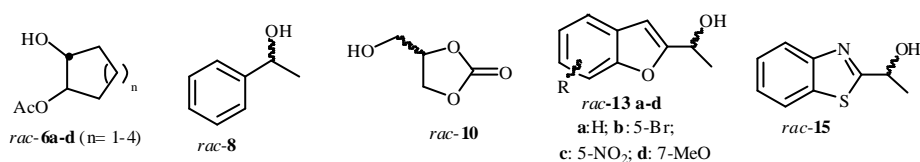
Hasonlóan gyenge szelektivitásokkal (visszamaradó diacetát ee < 50 %) tudtuk csak megvalósítani a diacetátok enzimés etanolízisét is.

Megjegyzésre érdemes, hogy a királis GC felvételek tanúsága szerint az alkoholízis folyamatban számos enzimmal a szekunder hidroxicsoponton acilezett monoacetát kis mértékben ugyan, ám igen magas szelektivitással képződött. Ez valószínűsíti, hogy amennyiben sikerülne jó kémiai módszert találni e monoacetátok racém formájának előállítására, azok magas szelektivitással lennének acilezhetők.

3.4.6. A BUTE-3A, BUTE-3B ENZIMKÉSZÍTMÉNYEKKEL KATALIZÁLT FOLYAMATOK

A korábbi fejezetekben, már számos esetben találkozhattunk olyan termofil fonalagombából nyert enzimek készítményekkel, melyek a kereskedelembe beszerezhető enzimekhez képest jobb szelektivitással működtek, vagy ellentétes enantiomereket szolgáltatottak. Az általunk vizsgált vegyületcsaládokon kiemelkedően jó enzimek készítményeknek bizonyult a BUTE 3a vagy BUTE 3b. Ezen eredmények egy részét az alábbi 28. táblázatban foglaltuk össze. További szubsztrátokon is teszteltük ezeket az enzimek készítményeket, hasonlóan jó szelektivitási eredményekkel. Ennek megfelelően ezek az optimalizálás nélküli enzimek készítmények általános célokra jól használható lipáznak bizonyultak, a későbbiekben szabadalmaztatásuk várható.

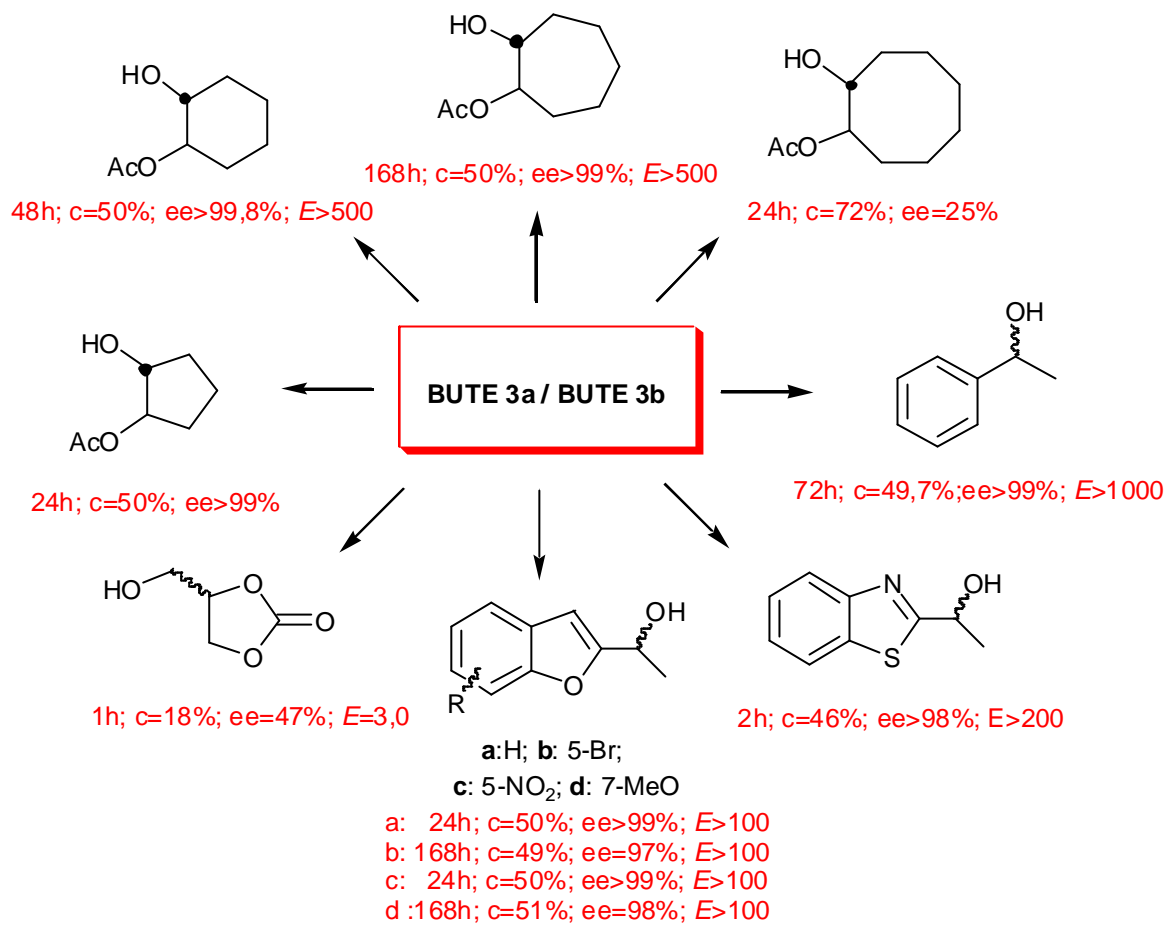
28. táblázat A BUTE-3a és BUTE-3b enzimekkel katalizált enzimkatalizált acilezés



E^a	Kiind.^b	Term 1^b	Term 2^b	Ido (óra)	Konv (%)	ee %^b	E^c	Forrás^c
3b	<i>rac-6a</i>	(<i>S,S</i>)- 6a	(<i>R,R</i>)- 7a	24	50	>99		8. táblázat
3b	<i>rac-6b</i>	(<i>S,S</i>)- 6b	(<i>R,R</i>)- 7b	48	50	>99,8	>500	9. táblázat
3b	<i>rac-6c</i>	(<i>S,S</i>)- 6c	(<i>R,R</i>)- 7c	168	50	>99	>500	10. táblázat
3b	<i>rac-6d</i>	(<i>S,S</i>)- 6d	(<i>R,R</i>)- 7d	24	72	25		11. táblázat
3a	<i>rac-8</i>	(<i>S</i>)- 8	(<i>R</i>)- 9	72	49,7	>99	>1000	14. táblázat
3b	<i>rac-8</i>	(<i>S</i>)- 8	(<i>R</i>)- 9	96	12,3	>99	>200	14. táblázat
3b	<i>rac-10</i>	(<i>R</i>)- 10	(<i>S</i>)- 11	1	18	47	3,0	15. táblázat
3b	<i>rac-13a</i>	(<i>S</i>)- 13a	(<i>R</i>)- 14a	24	50	>99	»100	20. táblázat
3b	<i>rac-13b</i>	(<i>S</i>)- 13b	(<i>R</i>)- 14b	168	49	97	»100	20. táblázat
3b	<i>rac-13c</i>	(<i>S</i>)- 13c	(<i>R</i>)- 14c	24	50	>99	»100	20. táblázat
3b	<i>rac-13d</i>	(<i>S</i>)- 13d	(<i>R</i>)- 14d	168	51	98	»100	20. táblázat
3b	<i>rac-15</i>	(<i>S</i>)- 15	(<i>R</i>)- 16	2	46	>98	>200	26. táblázat

^a 3a: BUTE 3a és 3b: BUTE 3b; ^b Kiind: kiindulási alkohol, szubsztrát; Term 1: visszamaradó alkohol; Term 2: keletkező acetát; ^c Forrás: az eredményeket, körülményeket tartalmazó táblázat száma;

13. ábra: A BUTE 3a és BUTE- 3b enzimekkel katalizált enzimkatalizált acilezés



3.5. KISÉRLETI RÉSZ

3.5.1. FELHASZNÁLT ESZKÖZÖK

Az NMR felvételek Bruker DRX-500 készüléken (^1H : 500 MHz és ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 ; TMS). IR spektrumok Specord 2000 spectrométer alkalmazásával készültek. GC felvételek Agilent 4890D illetve HP 5890 készülékeken FID detektorral, H_2 vivo gázzal (injektor: 250 °C, detektor: 250 °C, fej nyomás: 12 psi). Az elválasztáshoz HP-Chiral oszlopot használtunk (30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μm film, 20 % permethylated β -cyclodextrin, HP Part No.: 190916-B213) 1 : 50 split hányadossal; vagy Beta-DEX 225 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm film, Supelco Column No.: 16161-0413) 1 : 80 split hányadossal. Az optikai forgatóképességet Perkin Elmer 241 polariméterrel határoztuk meg. A szuperkritikus CO_2 -dal végzett méréseket termosztált (38 °C) tartályreaktorban végeztük (reaktor térfogat 5 ml). Szuperkritikus CO_2 (teljes térfogat 20 ml) SFC 300 pumpával (Carlo Erba) áramoltattuk a reaktortérbe vissza. A CO_2 99.5 % (w/w) tisztaságú és a Messer Griesheim Hungaria Ltd. (Budapest) származott. A VRK-hoz Kieselgel 60 F_{254} (Merck) (szemcseátmé: 0.063-0.200 mm) lapokat használtunk. A megjelenő foltok azonosítása UV-fény alatt vagy 5% foszformolibdén-sav etanolos oldatát használtuk. Az oldószereket frissen desztilláltuk.

3.5.2. FELHASZNÁLT ANYAGOK

A glicerint, a benzaldehidet, a *transz*-ciklopentán-1,2-diolt (*rac*-**6a**), a *transz*-ciklohexán-1,2-diolt (*rac*-**6b**), a *rac*-1-feniletanol (*rac*-**8**) és a vinilacetátot Sigma-Aldrich cégtől szereztük be.

cisz-5-(4-metilbenzoi)oxi-2-fenil-1,3-dioxán **3b**⁴¹, *cisz*-5-p-toluolszulfoniloxi-2-fenil-1,3-dioxán **3h**⁴¹, *transz*-cikloheptán-1,2-diolt *rac*-**6c**⁸⁹ és *transz*-ciklooktán-1,2-diolt *rac*-**6d**⁹⁰ a jelzett irodalom alapján állítottuk elő.

Lipase A, Lipase AK, Lipase AY, Lipase M, Lipase N, Lipase G, Lipase PS, Lipase R az Amano Europe cégtől származott. Lipozyme IM, Lipozyme IM 20, Lipozyme TL IM, Novozyme 435 és *Candida antarctica* A a Novozymes, Denmark-ből vásároltuk. A *Candida rugosa* és *Pseudomonas fluorescens* enzimeket a Fluka cégtől vásároltuk. A PPL és a *Candida cylindracea* lipázok Sigma cégtől származtak. A termofil fonalgombákból származó extracelluláris hidrolázokat, lipázokat (lipases BUTE 1-52a,b) az 1. fejezet alapján állítottuk elő az acetonnal szárított sejtmentes felülúszóból³⁹.

3.5.3. MÓDSZEREK

Az enantiomer szelektív reakciók mindegyikénél királis állófázison végzett GC-vel határoztuk meg a reakció konverzióját, illetve a termékek enantiomer összetételét. Az adatokból meghatározott enantiomertisztaság (ee%) becsült hibája: $\pm 0,2$ % és $\pm 1,6$ % között, a konverzió (?) becsült hibája $\pm 1,2$ % és $\pm 1,6$ % között adódott.

3.5.4. SZINTETIKUS ELJÁRÁSOK

Az ismert anyagokat, amelyeket saját módszerrel újonnan előállítottunk és részletes analitikai adatokkal jellemeztük, újra leírtuk **8** 1-feniletanol; **9** 1-feniletanol-acetát; **10** glicerinkarbonát; **11** (2-oxo-[1,3]dioxolán-4-il)metil acetát). Kísérleteink során a következő, irodalomból részlegesen vagy egyáltalán nem ismert anyagokat enantiomer tiszta formában állítottuk elő: **3a** 2-benzoiloxi-1,3-propándiol; **4a** 1-acetoxi-2-benzoiloxi-propán-3-ol; **6a-d** *transz*-2-acetoxi-cikloalkáno-1-olok; **13a-d** 1-(benzofurán-2-il)etanolok; **14a-d** 1-acetoxi-(benzofurán-2-il)etánok; **15** 1-(benzotiazol-2-il)-etanol; **16** 1-(benzotiazol-2-il)-acetát.

cisz-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxán (1a) ⁴⁰ Glicerín (50 g, 0.54 mol) és benzaldehid (50 g, 0.47 mol) elegyét katalitikus mennyiségű (50 µl) tömény kénsavval szobahőmérsékleten 4 óra hosszan kevertettük. A képződött vizet 40-45 °C-on az elegyrol vákuum alatt ledesztilláltuk. Az áttetszővé vált elegyet még egy órán át kevertettük, majd hűtést követően dietilétert (75 ml) adunk hozzá, az így nyert elegyet nátrium-karbonát oldattal (2x15 ml), telített NaCl oldattal (15 ml) mostuk, MgSO₄-on szárítottuk és 50 ml száraz dietiléttel hígítottuk. Az elegyet egy éjszakára mélyhűtőbe tettük, másnap kiszűrtük belőle a kivált szilárd anyagot (17 g, 20 %). Az anyalúg újabb hűtésével további (7 g, 8 %) termékhez jutottunk.

(1a): ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ, ppm): 3,15 (1H, d, *J*=10,0 Hz, OH), 3,58 (1 H, brd, *J*=10,0 Hz), 4,09 (2H, dd, *J*=12,0 és 1,5 Hz), 4,17 (2H, dd, *J*=12,0 és 1,5 Hz), 5,54 (1H, s), 7,36 (3H, m), 7,49 (2H, m); IR (KBr, ν, cm⁻¹): 3285, 3190, 2987, 2920, 2855, 1452, 1391, 1340, 1279, 1239, 1231, 1156, 1089, 1017, 996, 977, 948, 930, 831, 808, 741.

cisz-5-benzoiloxi-2-fenil-1,3-dioxán (2) ⁴⁰ Az **1a** szekunder alkoholt (3g, 16,7 mmol), trietilamint (2 g, 20 mmol) és 30 mg DMAP-t vegyületet 30 ml diklórometánban oldottuk, majd szobahőmérsékleten benzoil-kloridot (2,7g, 18,4 mmol) adunk hozzá. Az elegyet 2 óra hosszan szobahőmérsékleten kevertettük, majd 20 ml diklórometánt adunk hozzá. Az így nyert reakcióelegyet 10 ml 5%-os sósavoldattal, 10 ml telített Na₂CO₃-oldattal és 10 ml telített NaCl-oldattal mostuk, majd MgSO₄ felett szárítottuk, bepároltuk. A bepárlást követően 10-szeres mennyiségű (kb. 50 ml) etanoltól átkristályosítva. Fehér, tus, kristályos formában kaptuk meg a terméket. **(2)** (4.56 g, 96 %). O.p.: 92-93°C; ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ, ppm): 4,27 és 4,43 (2H, d, *J*=12 Hz, 2xCH₂), 4,96 (1H, s, CH-OBz), 5,72 (1H, s, CH-Ph), 7,39 (3H, t, *J*=9 Hz, Ar-H), 7,46 (2H, t, *J*=7,5 Hz, Ar-H), 7,56 (3H, m, Ar-H), 8,17 (2H, d, *J*=7,5 Hz, Ar-H); IR (KBr, ν, cm⁻¹): 3060, 2990, 2850, 1720, 1595, 1450, 1390, 1360, 1310, 1280, 1265, 1145, 1110, 1010, 790, 750, 710 cm⁻¹.

2-benzoiloxipropán-1,3-diol (3a) (I. Melléklet) A benzoil vegyület **(2)** (1,5 g, 5,3 mmol) 15 ml etilacetátos oldatát hidrogén atmoszféra alatt 15 ml etilacetátban szuszpendált és elohidrogénezett 75 mg 10 % Pd/C (Selcat-H) katalizátor elegyéhez adtuk, és az elegyet szobahőmérsékleten hidrogénezettük (7 óra, felvett hidrogénmennyiség: 240 ml). A katalizátor kiszűrése és bepárlás után nyert nyers terméket 20 ml toluol:hexán = 2:1 elegyből átkristályosítottuk. Termékül lapos, áttetsző kristályos diolhoz **(3a)** (0,75 g, 73 %) jutottunk. O.p.: 72-73°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 2,59 (2H, 2 OH), 3,87 (m, 4H, 2 CH₂-O), 5,08 (m, 1H, CH-O), 7,36 (t, 2H, *J*= 7 Hz, 2 *m*-Ar-H), 7,50 (t, 1H, t, *J*= 7 Hz, *p*-Ar-H), 7,89 (d, 2H, *J*= 7 Hz, 2 *o*-Ar-H); IR (KBr, ν, cm⁻¹): 3300, 2950, 2920, 2850, 1720, 1590, 1450, 1350, 1270, 1105, 1020, 955, 705 cm⁻¹

1-acetoxi-2-benzoiloxi-propán-3-ol (4) (I. Melléklet) ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 2,04 (s, 3H, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_3$), 3,32 (br s, 1H, OH), 3,85 (m, 2H, CH_2-OH), 4,40 (m, 2H, CH_2-OAc), 5,33 (m, 1H, CH-O), 7,43 (t, 2H, $J=7,5$ Hz, 2 *m*-Ar-H), 7,56 (t, 1H, $J=7,5$ Hz, 1 *p*-Ar-H), 8,04 (d, 2H, $J=7,5$ Hz, 2 *o*-Ar-H); IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3400, 2960, 2910, 2850, 1730, 1720, 1590, 1470, 1450, 1350, 1270, 1110, 1020, 960, 705 cm^{-1} .

Általános eloirat a 2-aciloxi-1,3-propándiolok acilezésekhöz:

Kereskedelembe kapható enzimek esetén: 300 mg diolt (**3a**) (1,5 mmol) 3 ml THF-ben oldottunk, majd 3 ml hexán és 1 ml vinilacetát elegyét adtuk hozzá. Az így nyert oldathoz az 5. táblázatban és a 6. táblázatban megadott enzimmennyiségeket adtuk. Az elegyet szobahomérsékleten kevertettük. A reakció lefutását VRK-val követtük (hexán:aceton = 10:4). Azon reakciók esetében, ahol a termékeket izoláltuk, a bepárlás után viszkózus olajként visszamaradó monoacetátot (**4**) és az apolárisabb diacetátokat kisnyomású-oszlopkromatográfiával választottuk el (eluens: hexán:aceton 4:1). Az egyes reakciók és az izolált monoacetátok (**4**) termelésadatait és forgatás értékeit a táblázatokban tüntettük fel.

Fonalgombából előállított lipázok esetén: 200 mg diolt (**3a**, **3b** vagy **3h**) (1,5 mmol) eloször 2 ml THF-ben oldottunk, majd 2 ml hexán és 0.8 ml vinilacetát elegyét adtuk hozzá. Az így nyert oldathoz az enzimeket megadott mennyiségét adtuk. Az elegyet a táblázatokban megadott ideig szobahomérsékleten kevertettük. A reakció lefutását VRK-val követtük (hexán:aceton = 10:4). Azon reakciók esetében, ahol vannak izolálható termékek, a bepárlás után a reakció lefutásától függően, - eltérő mennyiségben - diol, monoacetát és diacetát (apolárisabb) elegyét kapjuk. A monoacetátot preparatív vákuum-oszlopkromatográfiával nyerjük ki (eluens: hexán:aceton=10:1,5). Az egyes izolált monoacetátoknak mérjük a forgatóképességét és ebből lehet következtetni a tisztaságukra.

Kémiai úton végzett acilezés 200 mg diolt (**3a**) (1,0 mmol) feloldunk 2,2 ml THF-ben, 150 mg trietil-amint és katalitikus mennyiségu 8.6 mg DMAP-t összeöntünk egy kis, kónuszos lombikba, majd lassan 87 mg vinilacetátot adunk hozzá. Mágneses keverovel 1 órán keresztül szobahomérsékleten kevertetjük. A reakció lefutását VRK-val követjük. A VRK-hoz elozetes kirázás szükséges 5% HCl és etilacetát vagy dietiléter elegyében. Futtatóközegnek hexán:aceton = 10:4 -et használtunk, így a jel jól elkülönülve a lemez középso régiójában látható. Fontos, hogy a reakció csak akkor megy rendesen, ha vízmentes a közeg. A reakció lejátszódása után a racém elegyet a következő módon dolgozzuk fel: 15-20 ml etilacetátot vagy dietilétert öntünk hozzá, majd 2x3 ml 5%-os HCl -oldattal, 2x3 ml telített NaHCO_3 -oldattal, 2x3 ml telített NaCl -oldattal kirázzuk. MgSO_4 -on szárítjuk, szurjuk, bepároljuk. A keletkezett diacetátoktól nyomás alatti oszlopkromatográfiás elválasztással szabadultunk meg. Eluensként hexán:aceton 4:1 arányú elegyét használtunk. A keletkezett racém olajos monoacetát (*rac*-**4**) IR, és NMR spektrumai megegyeztek az aktív vegyületekével. Kitermelés (50 mg) 22%.

Racém-transz-2-acetoxicikloalkán-1-olok (rac-6a-d) (III. Melléklet) A racém diol *rac*-**5a-d** (17.2 mmol) és a Na_2CO_3 (5.48 g, 52 mmol) EtOAc oldatához (60 ml) Ac_2O (0.052 mol) adunk 15 percen át, kis léptékben, szobahomérsékleten, majd 14 órán át mágneses keverovel kevertettük, majd a keverékhez 40 ml jeges vizet adunk és a vizes fázist EtOAc (2 x 40 ml) kiráztuk. Az összegyűjtött szerves fázisokat MgSO_4 -tal szárítottuk, majd szurtuk, bepároltuk. Az elválasztást kromatográfiával végeztük (szilika gél, 33-100% gradiens EtOAc és hexán) a kapott monoacetátok *rac*-**6a-d** színtelen olajok.

transz-2-acetoxi-ciklopentán-1-ol (rac-6a) (III. Melléklet) Termelés: 1.36 g, 55 %; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.45-1.7 (m, 4H), 1.8-1.9 (m, 1H), 1.99 (s, 3H, $\text{CO}-\text{CH}_3$), 2.0-2.1 (m, 1H), 3.29 (m, 1H, OH), 4.00 (br s, 1H, C(1)H), 4.40 (m, 1H, C(2)H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 21.09, 21.36, 29.77, 32.22, 77.30, 83.04, 171.45. IR

(KBr, ν , cm^{-1}): 3448, 2968, 1736, 1376, 1244, 1140, 1092; $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_3$: Elemanalízis, számított: C, 58.32, H, 8.39, saját: C, 58.49, H, 8.32.

transz-2-acetoxi-ciklohexán-1-ol (rac-6b) (III. Melléklet) Termelés: 1.66 g, 61 %; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.2-1.36 (m, 4H), 1.62-1.71 (m, 2H), 1.95-2.05 (m, 2H), 2.06 (s, 3H, CO- CH_3), 2.53 (m, 1H, OH), 3.52 (mc, 1H, C(1)H), 4.56 (mc, 1H, C(2)H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 21.40, 23.84, 23.94, 30.03, 33.11, 72.57, 78.09, 171.04. $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3432, 2936, 2896, 1732, 1384, 1232, 1080, 1040; $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_3$: Elemanalízis, saját: C, 60.56, H, 8.88. számított: C, 60.74, H, 8.92.

transz-2-acetoxi-cikloheptán-1-ol (rac-6c) (III. Melléklet) Termelés: 1.36 g, 46 %; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.35-1.50 (m, 4H), 1.52-1.69 (m, 4H), 1.71-1.82 (m, 2H), 2.03 (s, 3H, CO- CH_3), 2.88 (s, 1H, OH), 3.67 (m, 1H, C(1)H), 4.64 (m, 1H, C(2)H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 21.38, 22.73, 22.86, 28.00, 30.19, 32.69, 75.47, 81.56, 171.12. $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3448, 2936, 2888, 1736, 1452, 1376, 1248, 1028; $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_3$: Elemanalízis, saját: C, 62.91, H, 9.29. számított: C, 62.77, H, 9.36.

transz-2-acetoxi-ciklooktán-1-ol (rac-6d) (III. Melléklet) Termelés: 0.99 g, 31% ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.35-1.50 (m, 2H), 1.61-1.83 (m, 10H), 1.98 (s, 3H), 2.13 (s, 1H, OH), 3.78 (m, 1H, C(1)H), 4.84 (m, 1H, C(2)H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 21.58, 22.03, 22.94, 27.39, 30.09, 30.48, 33.52, 71.31, 74.39, 170.21. $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3416, 2936, 2888, 1732, 1368, 1248, 1052, 1040; %; $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_3$: Elemanalízis, saját: C, 64.56, H, 9.82; számított: C, 64.49, H, 9.74.

Racém transz-1,2-diacetoxi-cikloalkánok (rac-7a-d) (III. Melléklet) A *rac-5a-d* (8.7 mmol) feloldunk száraz Et_3N (2.53 g, 25 mmol), majd 15 perc alatt hozzáadunk Ac_2O (1.77 g, 17.4 mmol) és 24 órán át, szobahőmérsékleten kevertetjük. A keverékre hideg vizet öntünk (20 ml), és a vizes fázist hexánnal kiráztuk (3×20 ml). Az összegyűjtött szerves fázist 5 % HCl (10 ml), majd telített NaHCO_3 (10 ml) és NaCl (10 ml) mostuk. Az oldatot MgSO_4 szárítottuk, bepároltuk. Az elválasztást kromatográfiával végeztük. (szilika gél, 33-100% gradiens EtOAc: hexán) A kapott diacetát *rac-7a-d* színtelen olajok.

transz-1,2-diacetoxi-ciklopentán, rac-7a (III. Melléklet) Termelés: 1.16 g, 72%; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.34-1.41 (2H, m), 1.48-1.54 (2H, m), 1.79 (6H, s, 2 CO- CH_3), 1.8-1.89 (2H, m), 4.82 (2H, br s, C(1)H and C(2)H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 20.49, 21.08, 29.90, 78.28, 169.10. $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 2976, 1748, 1372, 1252, 1088, 1040; $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_4$: Elemanalízis, saját: C, 57.96, H, 7.62; számított: C, 58.05, H, 7.58.

transz-1,2-diacetoxi-ciklohexán, (rac-7b) (III. Melléklet) Termelés: 1.39 g, 80%; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.26-1.42 (4H, m), 1.65-1.73 (2H, m), 2.01 (6H, s, 2 CO- CH_3), 2.03 (2H, m), 4.78 (2H, mc, C(1)H and C(2)H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 21.21, 23.49, 30.17, 73.63, 170.09; $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 2944, 2896, 1740, 1368, 1232, 1044; számított: $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4$: C, 59.98, H, 8.05 Saját: 60.01, H, 8.01

transz-1,2-diacetoxi-cikloheptán, (rac-7c) (III. Melléklet) Termelés: 1.47 g, 79%; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.44-1.65 (4H, m), 1.58-1.66 (4H, m), 1.72-1.79 (2H, m), 1.97 (6H, s, 2 CO- CH_3), 4.92 (2H, mc, C(1)H and C(2)H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 21.20, 22.82, 28.31, 30.37, 76.76, 169.84. $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 2936, 2838, 1740, 1372, 1240, 1032, 992; $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_4$: Elemanalízis, saját C, 61.59, H, 8.43 számított: C, 61.66, H, 8.47.

transz-1,2-diacetoxi-ciklooktán, (rac-7d) (III. Melléklet) Termelés: 1.39 g, 70% ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.43-1.51 (2H, m), 1.62-1.86 (10H, m), 1.97 (6H, s, 2 CO- CH_3), 4.84 (2H, m, C(1)H and C(2)H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 21.46,

22.53, 27.23, 30.13, 73.90, 168.88. $v_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 2936, 2838, 1736, 1368, 1248, 1032, 1020, 980; $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_4$: Elemanalízis, saját: C, 63.21, H, 8.78, számított: C, 63.14, H, 8.83.

Általános eloirat a transz-2-acetoxi-cikloalkán-1-olok (rac-6a-d) enzimés acilezésekhez:
Analitikai méretu 20 mg enzimet, *rac-6a*; *rac-6b*; *rac-6c*; *rac-6d*) adunk az oldószerben (hexán (1.5 ml) és vinilacetát (0.5 ml)) feloldott rácém *transz-2-acetoxi-cikloalkán-1-ol* okat *rac-6a-d* (20 mg) és jól záródó üvegekben, rázógéppel 1000 rpm, szobahomérsekleten rázattuk a táblázatokban megadott ideig. A reakciókat GC-velkövettük, analizáltuk. A konverziót, a monoacetátok (*S,S*)-**6a-d** és diacetátok (*R,R*)-**7a-d** enantiomer tisztaságot a táblázatban láthatjuk.

Az acilezési reakció GC analízise

transz-2-acetoxi-ciklopentán-1-ol (rac-6a) R_t (HP Chiral; 100-116 °C, 2 °C/min)/min: 5.76 (*S,S*)-**6a**, 6.27 (*R,R*)-**6a**, 6.98 (*S,S*)- és (*R,R*)-**7a**.

transz-2-acetoxi-ciklohexán-1-ol (rac-6b) R_t (HP Chiral; 100-115 °C, 1 °C/min)/min: 10.57 (*S,S*)-**6b**, 10.98 (*R,R*)-**6b**, 12.21 (*S,S*)-**7b**, 12.59 (*R,R*)-**7b**.

transz-2-acetoxi-cikloheptán-1-ol (rac-6c) R_t (HP Chiral; 100-136 °C, 2 °C/min)/min: 13.22 (*S,S*)-**6c**, 13.38 (*R,R*)-**6c**, 15.11 (*S,S*)-**7c**, 15.29 (*R,R*)-**7c**.

transz-2-acetoxi-ciklooctán-1-ol (rac-6d) R_t (Beta-DEX 225; 100-170 °C, 2 °C/min)/min: 28.62 (*S,S*)-**6d**, 28.79 (*R,R*)-**6d**, 33.21 (*S,S*)- és (*R,R*)-**7d**.

Általános eloirat a transz-2-acetoxi-cikloalkán-1-olok (rac-6a-d) preparatív méretu enzimés acilezésekhez: A rácém *transz-2-acetoxi-cikloalkán-1-ol (rac-6a*: 300 mg, 2.08 mmol; *rac-6b*: 500 mg, 3.16 mmol; *rac-6c*: 300 mg, 1.74 mmol; *rac-6d*: 400 mg, 2.15 mmol) feloldottuk vinilacetátban (3 ml for *rac-6a*, *rac-6c* és *rac-6d*; 5 ml *rac-6b*), majd mind a négy vegyület esetén Lipase AK-t adtunk hozzá. (150 mg for *rac-6a*, *rac-6b* és *rac-6c*; 100 mg *rac-6d*) A reakciókat jól záródó üvegben 1000 rpm, szobahomérsekleten rázattuk. (12 órán át *rac-6a*, 10 óra *rac-6b*; 18 óra *rac-6c*; 52 óra *rac-6d*). A reakció végeztével az enzimet kiszurtuk és az oldatot bepároltuk. Vákuum-kromatográfiával (szilika gél, hexán - acetón 10 : 1 v/v) választottuk el egymástól a monoacetát (*S,S*)-**6a-d** és diacetát (*R,R*)-**7a-d** frakciókat.

(S,S)-2-acetoxi-ciklopentán-1-ol (S,S)-6a (III. Melléklet) Termelés: 99 mg, 33 % színtelen olaj; $[\alpha]_D^{22} +29.2$ (c 1.0, acetónitrilben) (irod.⁹¹, $[\alpha]_D^{20} +22.3$ (c 1.12, CHCl_3) és irod.⁵⁵, $[\alpha]_D^{25} +29.3$ (c 1.1, CHCl_3) (*R,R*)-**6a**); IR, ^1H és ^{13}C NMR adatok megegyeznek a *rac-6a* spektrumával.

(R,R)-1,2-diacetoxi-ciklopentán (R,R)-7a (III. Melléklet) Termelés: 168 mg, 43 % színtelen olaj; $[\alpha]_D^{22} -29.7$ (c 1.0, acetónitril); IR, ^1H és ^{13}C NMR adatok megegyeznek a *rac-7a* spektrumával.

(S,S)-2-acetoxi-ciklohexán-1-ol (S,S)-6b (III. Melléklet) Termelés: 180 mg, 36 % fehér, kristályos; op 59.5-61 °C; $[\alpha]_D^{22} +44.3$ (c 1.0, CHCl_3); IR, ^1H és ^{13}C NMR adatok megegyeznek a *rac-6b* spektrumával.

(R,R)-1,2-diacetoxi-ciklohexán (R,R)-7b (III. Melléklet) Termelés: 231 mg, 37 % színtelen olaj; $[\alpha]_D^{22} -13.7$ (c 1.0, CHCl_3) (irod.⁹¹, $[\alpha]_D^{22} -10.7$ (c 0.58 in CHCl_3), irod.⁹², $[\alpha]_D^{27} -12.5$ (c 1.60, CHCl_3)); IR, ^1H és ^{13}C NMR adatok megegyeznek a *rac-7b* spektrumával..

(S,S)-2-acetoxi-cikloheptán-1-ol (S,S)-6c (III. Melléklet) Termelés: 106 mg, 36 % színtelen olaj; $[\alpha]_D^{22} +23.9$ (c 1.0, acetónitril); IR, ^1H és ^{13}C NMR adatok megegyeznek a *rac-6c* spektrumával.

(R,R)-1,2-diacetoxi-cikloheptán (R,R)-7c (III. Melléklet) Termelés: 156 mg, 40 % színtelen olaj; $[\alpha]^{22}_D$ -13.1 (c 1.0, acetonitril); IR, 1H és ^{13}C NMR adatok megegyeznek a *rac-7c* spektrumával.

(S,S)-2-acetoxi-ciklooctán-1-ol (S,S)-6d (III. Melléklet) Termelés: 171 mg, 43 % színtelen olaj; $[\alpha]^{22}_D$ +9.1 (c 1.0, acetonitril); IR, 1H és ^{13}C NMR adatok megegyeznek a *rac-6d* spektrumával.

(R,R)-1,2-diacetoxi-ciklooktán (R,R)-7d (III. Melléklet) Termelés: 215 mg, 44 % színtelen olaj; $[\alpha]^{22}_D$ 0 (c 1.0, acetonitril); IR, 1H és ^{13}C NMR adatok megegyeznek a *rac-7d* spektrumával.

A racém transz-1,2-diacetoxi-cikloalkán (rac-7a) preparatív léptéku enzimes hidrolízise
A racém transz-2-diacetoxi-cikloalkánt (*rac-7a*: 300 mg, 1.61 mmol; *rac-7b*: 500 mg, 2.50 mmol; *rac-7c*: 120 mg, 0.56 mmol; *rac-7d*: 150 mg, 0.66 mmol) vízbe csepegtettük (3 ml for *rac-7a* és *rac-7d*; 5 ml for *rac-7b*; 1.5 ml for *rac-7c*) és Lipase AK enzimet adtunk hozzá (150 mg *rac-7a* és *rac-7b*; 75 mg *rac-7c* és *rac-7d*) a reakcióelegyet szobahőmérsékleten, 1000 rpm rázattuk (30 órán át *rac-7a* és *rac-7d* esetén; 24 órán keresztül *rac-7b* és *rac-7c* esetén). A keveréket EtOAc (2 × 10 ml) kirázzuk és az összegyűjtött szerves fázist telített NaCl-dal mostuk (10 ml), Na₂SO₄-tal szárítottuk, és bepárooltuk. A monoacetát (*R,R*)-**6a-d** és diacetát (*S,S*)-**7a-d** frakciókat vákuumkromatográfiával választottuk el. (szilika gél, hexán - aceton 10 : 1 v/v).

(R,R)-2-acetoxi-ciklopentán-1-ol (R,R)-6a (III. Melléklet) Termelés: 65 mg, 28 % színtelen olaj; $[\alpha]^{22}_D$ -28.2 (c 1.0, acetonitril); IR, 1H és ^{13}C NMR adatok megegyeznek a *rac-6a* spektrumával.

(S,S)-1,2-diacetoxi-ciklopentén (S,S)-7a (III. Melléklet) Termelés: 154 mg, 51 % színtelen olaj; $[\alpha]^{22}_D$ +23.2 (c 1.0 acetonitril); IR, 1H és ^{13}C NMR adatok megegyeznek a *rac-7a* spektrumával.

(R,R)-2-acetoxi-ciklohexán-1-ol (R,R)-6b (III. Melléklet) Termelés: 106 mg, 21 % fehér kristály; mp 57-59 (irod.⁵⁵, olaj; lit.⁶⁰, M.p.: 28 °C); $[\alpha]^{22}_D$ -43.8 (c 1.0, CHCl₃) (lit., $[\alpha]^{22}_D$ -37.5 (c 1.1, CHCl₃), irod.⁹², $[\alpha]^{28}_D$ -30.2 (c 1.60, CHCl₃)); IR, 1H és ^{13}C NMR adatok megegyeznek a *rac-6b* spektrumával.

(S,S)-1,2-diacetoxi-ciklohexán (S,S)-7b (III. Melléklet) Termelés: 94 mg, 24 % színtelen olaj; $[\alpha]^{22}_D$ +9.5 (c 1.0, CHCl₃) (lit.⁹¹, $[\alpha]^{20}_D$ +12.0 (c 0.96, CHCl₃), lit. $[\alpha]^{20}_D$ +16.1 (c 0.42, MeOH)); IR, 1H és ^{13}C NMR adatok megegyeznek a *rac-7b* spektrumával.

(R,R)-2-acetoxi-cikloheptán-1-ol (R,R)-6c (III. Melléklet) Termelés: 36 mg, 37 % színtelen olaj; $[\alpha]^{22}_D$ -21.0 (c 1.0, acetonitril); IR, 1H és ^{13}C NMR adatok megegyeznek a *rac-6c* spektrumával.

(S,S)-1,2-diacetoxi-cikloheptán (S,S)-7c (III. Melléklet) Termelés: 52 mg, 43 % színtelen olaj; $[\alpha]^{22}_D$ +3.0 (c 1.0 acetonitril); IR, 1H és ^{13}C NMR adatok megegyeznek a *rac-7c* spektrumával.

(R,R)-2-acetoxi-ciklooktán-1-ol (R,R)-6d (III. Melléklet) Termelés: 97 mg, 80 % színtelen olaj; $[\alpha]^{22}_D$ -0.9 (c 1.0, acetonitril); IR, 1H és ^{13}C NMR adatok megegyeznek a *rac-6d* spektrumával.

(S,S)-1,2-diacetoxi-ciklooktán (S,S)-7d (III. Melléklet) Termelés: 11 mg, 7 % színtelen olaj; $[\alpha]^{22}_D$ 0 (c 1.0, acetonitril); IR, 1H és ^{13}C NMR adatok megegyeznek a *rac-7d* spektrumával.

Általános eloirat az 1-feniletanol (*rac*-8) analitikai méretű enzim acilezésekhez:

20 mg *rac*-8 1-feniletanolt (*rac*-8) oldottuk hexánba (2 ml) és vinilacetátba (0,5 ml) és hozzáadtunk 20 mg enzimmészítményt. Jól záródó üvegedényben 1000 rpm-el, szobahomérosékleten a táblázatban megadott ideig rázattuk (14. táblázat). A konverziót VRK-val (hexán-aceton 10 : 4, v/v) követtük. A reakcióido elteltével az enzimeket kiszurtuk, a mintákat GC-vel értékeltük ki. (ld. 10. ábra) GC retenciós idok: 7.64 min, (*S*)-9; 8.04 min, (*R*)-8; 8.23 min, (*R*)-9; 8.65 min, (*S*)-8; GC moláris acetát/alkohol arányszám faktor (*rac*-9/*rac*-8): 1.18 [a *c* és *E* számításánál ezzel a faktorról számoltunk].

Általános eloirat az 1-feniletanol (*rac*-8) preparatív méretű enzim acilezésekhez:

200 mg *rac*-8 -t acileztünk Lipozyme TL IM (200 mg) enzimmel, hexánban (20 ml) és vinilacetátban (5 ml). A reakcióelegyet 1000 rpm-mel, szobahomérosékleten 5 órán át rázattuk, majd az enzimet kiszurtuk. A mintát bepároltuk, majd kromatográfiával elválasztottuk az alkohol (*S*)-8 és acetát (*R*)-2 frakciókat (szilika gél, hexán-aceton 10 : 1, v/v).

(*S*)-1-feniletanol (*S*)-8 Termelés: 156 mg, 78 %; színtelen olaj, 23 % ee GC-vel; $[\alpha]_D^{22}$: -11.1 (*c* 1.0, CHCl₃) {irod.: $[\alpha]_D$: -45.3 (CHCl₃); ⁹³ $[\alpha]_D$: -53.5 (*c* 1.13, CHCl₃); ²⁰ $[\alpha]_D^{25}$: -55.1 (*c* 1.63, CHCl₃)⁹⁴}; ¹H NMR: 1.513 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, 2-CH₃), 3.38 (br s, 1H, OH), 4.861 (q, *J* = 6.3 Hz, 1H, 1-CH), 7.40 (mc, 5H, Ar H); ¹³C NMR: 25.034, 69.843, 125.071, 126.862, 127.970, 145.525; IR: 3352, 3008, 2976, 2952, 1466, 1430, 1368, 1204, 1080, 1008, 900, 760, 690;

(*R*)-1-acetoxi-1-feniletán (*R*)-9 Termelés: 43 mg, 16 %; színtelen olaj; 97 % ee GC-vel; $[\alpha]_D^{22}$: 99.0 (*c* 1.0, CHCl₃) {irod.: $[\alpha]_D^{20}$: 103.5 (*c* 1.0, CHCl₃); ⁹⁴ $[\alpha]_D$: 105.1 (*c* 1.3, CHCl₃)⁹⁵}; ¹H NMR: 1.574 (d, *J* = 7.4 Hz, 2-CH₃), 21.103 (s, 3H, Ac CH₃), 5.926 (q, *J* = 6.9 Hz, 1H, 1-CH), 7.30-7.40 (m, 5H, Ar H); ¹³C NMR: 21.416, 22.283, 72.241, 125.860, 127.632, 128.258, 141.422, 169.946; IR: 1740, 1456, 1376, 1244, 1208, 1064, 944, 760, 700; IR és NMR adatok megegyeznek (*S*)-8⁹⁶ és (*R*)-9⁹⁷ irodalmi adatokkal.

Általános eloirat a glicerín-karbonát (10) enzim acilezéshez

30 mg glicerín-karbonátot (10) feloldottunk 2 ml THF-ben, ehhez adtunk 0,5 ml vinilacetát majd 50 mg kereskedelmi enzimet, vagy 200 mg szilárd fázisú fermentációval kapott enzimet, vagy 50 mg rázatott lombikos fermentációval kapott enzimpot. A reakciókat VRK-val követtük Hexán: acetón = 10:4-ben, majd a mintákat GC-vel mértük. **HP-Chiral** [20% Permethyated β- Cyclodextrin; 30m×0,32mm×0,25μm; HP Part No.: 190916-B213; US. Parent No.: 4,293,415]: 140°C, 15 min, 12 psi; 8,54 min Ac 1 (*R*)-Ac; 8,72 min Ac 2 (*S*)-Ac; 11,27 min OH *rac*-OH

Általános eloirat a glicerín-karbonát (10) enzim acilezés oldószerfüggéséhez

50 mg glicerín-karbonátot (10) feloldottunk 2 ml oldószerben, ehhez adtunk 0,5 ml vinilacetát majd 50 mg Lipase Ps-t vagy 50 mg Lipase 6a-t.

Általános eloirat a (2-oxo-[1,3]dioxolán-4-il)metil acetát (11) enzim alkoholízishez

50 mg (2-oxo-[1,3]dioxolán-4-il)metil acetátot (11) feloldottunk 1 ml acetónban, ehhez adtunk 1 ml etanolt majd 50 mg kereskedelmi enzimet, vagy 50 mg rázatott lombikos fermentációval kapott enzimpot.

Racém 1-(benzofurán-2-il)etanolk előállítása (rac-13a-d)

A ketonokat (**13a-d**, 1000 mg) metanolban oldottuk, (50 ml) és hozzáadtunk NaBH₄ (400 mg), majd 30 percig szobakomórésületen kevertettük. A reakció teljes lejátszódását követően (VRK-val követtük), 2N HCl (5 ml) adtunk az oldathoz és vákuumban desztilláltuk, majd CH₂Cl₂ (20 ml, kétszer) extraháltuk. A szerves fázist MgSO₄-tal szárítottuk és rotadeszten bepárooltuk. Az alkoholok (rac-**13a-d**) teljes tisztítását vákuum kromatográfiával (szilika gél, CH₂Cl₂-acetone, 10:1, v:v) végeztük.

1-(benzofurán-2-il)etanol (rac-13a) Termelés: 83 %; O.p.: 41 °C [irod. 40-41 °C⁹⁸]; ¹H NMR: 1.66 (3H, d), 2.41 (1H, broad s), 5.04 (1H, q), 6.63 (1H, s), 7.23-7.26 (1H, m), 7.28-7.32 (1H, m), 7.49 (1H, d), 7.57 (1H, d); ¹³C NMR: 21.47, 64.14, 101.36, 112.69, 115.84, 123.75, 127.11, 130.20, 153.58, 161.60; IR: 3384, 2984, 1456, 1376, 1304, 1256, 1152, 1076, 1008, 944, 808, 748; C₁₀H₁₀O₂: Elemanalízis, saját C, 74.16; H, 6.25 %. számított: C, 74.06; H, 6.21.

1-(5-brómbenzofurán-2-il)etanol (rac-13b) Termelés: 83 %; O.p.: 50 °C; ¹H NMR: 1.63 (3H, d), 2.26 (1H, broad s), 5.00 (1H, q), 6.55 (1H, s), 7.27-7.37 (2H, m), 7.66 (1H, s); ¹³C NMR: 21.47, 64.14, 101.36, 112.69, 115.84, 123.75, 127.11, 130.20, 153.58, 161.69; IR: 3408, 2984, 1448, 1372, 1300, 1264, 1152, 1088, 1024, 936, 808; C₁₀H₉BrO₂: Elemanalízis, saját C, 49.76; H, 3.65; Br, 33.05 % számított: C, 49.82; H, 3.76; Br, 33.14.

1-(5-nitrobenzofurán-2-il)etanol (rac-13c) Termelés: 83 %; O.p.: 75 °C [irod. 73-76 °C⁹⁸]; ¹H NMR: 1.66 (3H, d), 2.42 (1H, broad s), 5.06 (1H, q), 6.75 (1H, s), 7.51 (1H, d), 8.18 (1H, d), 8.43 (1H, s); ¹³C NMR: 21.50, 64.06, 102.58, 111.54, 117.57, 120.94, 128.64, 144.16, 157.64, 163.91; IR: 3320, 1528, 1348, 1296, 1264, 1160, 1080, 1024, 884, 816, 736; Elemanalízis, saját C, 57.92; H, 4.27; N, 6.77 %. számított: C₁₀H₉NO₄: C, 57.97; H, 4.38; N, 6.76.

1-(7-metoxibenzofurán-2-il)etanol (rac-13d) Semisolid, Termelés: 83 %; ¹H NMR: 1.64 (3H, d), 2.46 (1H, broad s), 4.00 (3H, s), 5.03 (1H, q), 6.60 (1H, s), 6.76-6.80 (1H, m), 7.14 (2H, d); ¹³C NMR: 21.41, 55.98, 64.08, 102.02, 106.29, 113.46, 123.46, 129.86, 143.96, 145.26, 160.64; IR: 3296, 2984, 1624, 1600, 1496, 1440, 1376, 1312, 1272, 1200, 1184, 1096, 1032, 936, 892, 836, 728; Elemanalízis, saját C, 68.66; H, 6.25 %. számított: C₁₁H₁₂O₃: C, 68.74; H, 6.29.

1-acetoxi-1-(benzofurán-2-il)etán (rac-14a) Termelés: 90 %; ¹H NMR: 1.71 (3H, d), 2.13 (3H, s), 6.13 (1H, q), 6.72 (1H, s), 7.24-7.29 (1H, m), 7.31-7.34 (1H, m), 7.51 (1H, d), 7.58 (1H, d); ¹³C NMR: 18.43, 21.16, 65.51, 104.24, 111.37, 121.24, 122.87, 124.56, 127.86, 154.86, 155.99, 170.12; IR: 1744, 1456, 1372, 1236, 1060, 1028, 752; GC (165°C) *R*_{T(R)}: 3.75 min, *R*_{T(S)}: 3.84 min; HPLC ((*S,S*)-Whelk-O1, 1 ml/min) *R*_{T(S)}: 3.88 min, *R*_{T(R)}: 5.25 min, ((*R,R*)-Whelk-O1, 1 ml/min) *R*_{T(R)}: 4.4 min, *R*_{T(S)}: 6.37 min; Elemanalízis, saját C, 70.62; H, 5.95 %. számított: C₁₂H₁₂O₃: C, 70.57; H, 5.92.

1-acetoxi-1-(5-brómbenzofurán-2-il)etán (rac-14b) Termelés: 85 %; ¹H NMR: 1.66 (3H, d), 2.11 (3H, s), 6.07 (1H, q), 6.63 (1H, s), 7.33-7.39 (2H, m), 7.67 (1H, s); ¹³C NMR: 18.80, 21.52, 65.68, 104.05, 113.24, 116.30, 124.27, 127.87, 130.26, 153.99, 157.84, 170.44; IR: 1740, 1448, 1372, 1264, 1024, 800; GC (120-170 °C, 1 °C/min) *R*_{T(R)}: 37.34 min, *R*_{T(S)}: 38.06 min; HPLC ((*S,S*)-Whelk-O1, 1 ml/min) *R*_{T(S)}: 4.07 min, *R*_{T(R)}: 5.45 min, ((*R,R*)-Whelk-O1, 1 ml/min) *R*_{T(R)}: 4.42 min, *R*_{T(S)}: 6.04 min; C₁₂H₁₁BrO₃: Elemanalízis, saját C, 50.82; H, 3.88; Br, 28.34 %. számított: C, 50.91; H, 3.92; Br, 28.22.

1-acetoxi-1-(5-nitrobenzofurán-2-il)etán (rac-14c) Termelés: 93 %; ^1H NMR: 1.70 (3H, d), 2.13 (3H, s), 6.10 (1H, q), 6.83 (1H, s), 7.55 (1H, d), 8.23 (1H, d), 8.48, (1H, s); ^{13}C NMR: 18.42, 21.08, 65.10, 104.85, 111.78, 117.8, 120.48, 128.34, 144.31, 157.61, 159.66, 169.70; IR: 1748, 1524, 1348, 1232, 1064, 1032, 952; GC (130-180 °C, 1 °C/min) $R_{T(R)}$: 46.94 min, $R_{T(S)}$: 47.56 min; HPLC ((S,S)-Whelk-O1, 2 ml/min) $R_{T(S)}$: 4.09 min, $R_{T(R)}$: 5.12 min, ((R,R)-Whelk-O1, 1 ml/min) $R_{T(R)}$: 4.75 min, $R_{T(S)}$: 6.03 min; Elemanalízis, saját C, 57.75; H, 4.52; N, 5.68 %. számított: $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_5$: C, 57.83; H, 4.45; N, 5.62.

1-acetoxi-1-(7-metoxibenzofurán-2-il)etán (rac-14d) Termelés: 85 %; ^1H NMR: 1.69 (3H, d), 2.09 (3H, s), 4.01 (3H, s), 6.08 (1H, q), 6.79-6.82 (1H, m), 6.69 (1H, s), 7.14-7.16 (2H, m); ^{13}C NMR: 18.93, 21.58, 56.41, 66.41, 105.01, 107.09, 113.93, 123.97, 129.95, 144.56, 145.78, 156.57, 170.50; IR: 1740, 1496, 1372, 1272, 1096, 1056, 1028, 852, 928, 732; GC (120-170 °C, 1 °C/min) $R_{T(R)}$: 33.39 min, $R_{T(S)}$: 34.07 min; HPLC ((S,S)-Whelk-O1, 1 ml/min) $R_{T(S)}$: 7.70 min, $R_{T(R)}$: 11.56 min, ((R,R)-Whelk-O1, 1 ml/min) $R_{T(R)}$: 8.69 min, $R_{T(S)}$: 13.19 min; $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$: Elemanalízis, saját C, 66.62; H, 6.11%. számított: C, 66.66; H, 6.02.

Általános eloirat az 1-(benztiazol-2-il)etanol (15) előállításához:

13,5 ml (100 mmol, 10,8 ml) Benzotiazolt oldottunk 100 ml száraz THF-ban, majd az elegyet inert N_2 atmoszféra alatt -70 °C-ra hűtöttük és -60 °C alatti hőmérsékletet tartva hozzácepegettünk 50 ml 2 M hexános butil-lítiumot, majd az elegyet 15 percig -70 °C-on kevertettük. Ezután hozzáadtunk 6,6 g (150 mmol, 8,41 ml) acetaldehidet úgy, hogy a hofok -50 °C alatt maradjon, majd az elegyet engedték szobahofokra melegedni és szobahofokon 30 percen át kevertettük. A reakcióelegyet ezután 100 ml vízre öntöttük és 3 x 60 ml éterrel extraháltuk. Az egyesített szerves fázisokat 50 ml vízzel, 50 ml telített sóoldattal mostuk, MgSO_4 -on szárítottuk, bepárooltuk. Ezen a módon 13.4 g (75 %) néhány százalék szubsztituálatlan kiindulási anyagot tartalmazó termékhez jutottunk, melyet vákuumkromatográfiával (szilika-gél, hexán-aceton 10:2) tisztítottunk. A kromatográfia után 3.6 g tiszta és 9.4 g vegyes frakcióhoz jutottunk.

1-Benzotiazolil-etanol (15): Termelés: 130mg (43%), sárga kristályos, Op.: 62 °C; ^1H NMR: 1.700 (d, 3H), 4,800 (br s, 1H), 5.287 (q, 1H), 7.346 (t, 1H); 7.437 (t, 1H); 7.836 (d, 1H); 7.933 (d, 1H); ^{13}C NMR: 24,458, 68.708, 122.249, 123.036, 125.437, 126.534, 135.026, 153.025, 178.323.

Általános eloirat az 1-(benztiazol-2-il)etanol (15) acilezésekhöz:

Kereskedelemben kapható és fonalgombákból előállított lipázok esetén: 20 mg alkoholt (15) oldottunk 0,5 ml vinilacetátban, majd 1,5 ml hexánt adtunk hozzá. Az így nyert oldathoz 30 mg kereskedelmi vagy termofil fonalgomba eredetű enzimkészítményt vagy 50 mg szilárd fázisú fermentációs készítményt adtunk. Jól záródó üvegedényben 1000 rpm-el, szobahőmérsékleten a táblázatban megadott ideig rázattuk. A reakció lefutását VRK-val követtük (hexán:aceton = 10:4), kb. 50%-os konverziónál GC-vel analizáltuk. A konverziót, az acetát (16) és az alkoholok (15) enantiomer tisztaságát a 23. táblázat, 24. táblázat, 25. táblázat, 26. táblázat, 27. táblázatokban láthatjuk.

Az acilezési reakció GC analízise: 1-(benztiazol-2-il)etanol: R_t (HP Chiral; 105-135 °C, 1 °C/min, 12 psi)/min: 24.58 (S,S)-16, 24.96 (R,R)-15, 25.8 (S,S)- és (R,R)-14.86.

Általános eloirat az 1-(benztiazol-2-il)etanol (15) preparatív méretu enzimes acilezésekhez: 300 mg **15**-t 7,5 ml vinilacetátban oldottuk, majd 22,5 ml hexánt adtunk hozzá. 450 mg BUTE-3b-vel katalizáltuk az acilezést. A reakció lefutását VRK-val követtük (hexán:aceton = 10:4), kb. 50%-os konverziónál GC-vel analizáltuk. Az alkohol és acetát frakciókat preparatív vákuum-oszlop kromatográfiával nyertük ki (eluens: hexán:aceton=10:1). Az izolált acetátnak és alkoholnak mértük a forgatóképességét. $[\alpha]_D^{25}$: +5,217 (c 1.0, CHCl₃)

1-Acetoxi-1-(benztiazol-2-il)-etán (16): Termelés: 72 mg (43%), olaj, Op.: $[\alpha]_D^{22}$: +52.17 (c 1.0, CHCl₃) ¹H NMR: 1.770 (d, 3H), 2.182 (s, 3H), 6.250 (q, 1H), 7.378 (t, 1H); 7.459 (t, 1H); 7.870 (d, 1H); 8.021 (d, 1H); ¹³C NMR: 20.896, 21.137, 70.283, 121.796, 123.383, 125.397, 126.284, 134.825, 153.131, 169.866, 171.389.

3.6. IRODALOM

1. Johri, B. N.; Jain, S.; Chouhan, S.: *Proc. Ind. Acad. Sci., Plant Sci.*, **94**, **1985**, 175-196.
2. Johri, B. N.; Ahmad S.: *Thermophilic Moulds in Biotechnology* (Eds.: Johri, B. N. ; Satyanarayana, T.; Olsen, J.), Kluwer Academic, Dordrecht, **1999**, 219-243.
3. Alcantara, A. R.; Fuentes, I. E.; Sinisterra, J. V.: *Chem. Phys. Lipids*, **93**, **1998**, 169-184.
4. Faber, K.: *Biotransformation in Organic Chemistry* Springer-Verlag **1995**.
5. Koskinen, A.M.P.; Kibanov, A. M.: *Enzymatic Reactions in Organic Media*, Blackie Academic & Professional **1996**.
6. Poppe, L., Novák, L. Kajtár-Peredy, M., Szántay, Cs., *Tetrahedron: Asymmetry* **4**, **1993**, 2211.
7. Chen, C.S.; Wu, S.H.; Girdaukas, G.; Sih, C. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, **1987**, 2812.
8. Egri, G.: *PhD értekezés*, BME, **1997**, 10-12.
9. Chen, C. S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, **1982**, , 7294-7299.
10. Rakels, J. L. L.; Staathof, A. J. J.; Heijnen, J. J.: *Enzyme Microb. Technol.*, **15**(12), **1993**, 1051-1056.
11. Poppe, L.; Novák, L.: *Selective Biocatalysis: A Synthetic Approach*, VCH, Weinheim-New York, **1992**.
12. Theil, F., *Catalysis Today* **22**(3), **1994**, 517-536.
13. Rétey, J.: *Angew. Chem.*, **102**, **1990**, 373.
14. Theil, F., Lemke, K., Ballschuh, S., Hunath, A., Schick, H., *Tetrahedron: Asymmetry* **6**(6), **1995**, 1323-1344.
15. Theil, F., Weidner, J., Ballschuh, S., Hunath, A., Schick, H., *J. Org. Chem.* **59**(2), **1984**, 388-393.
16. Zaks, A.; Klivanov, A. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* **82**, **1985**, 3192-3196.
17. Biachi, D., Bosetti, A., Cesti, P., Golini, P., *Tetrahedron Lett.* **33**, **1992**, 3231.
18. Baer, E.; Kindler, A.: *Biochemistry*, **1**, **1962**, 518-521 .
19. Dennis, E.A.: *Bio/Technology*, **1962**, **5**, 518.
20. Hirth, G.; Barner, R.: *Helv. Chim. Acta.*, **65**, **1982**, 1059.
21. Jurczak, J.; Pikul, S.; Bauer, T.: *Tetrahedron*, **42**, **1986**, 447-488.
22. Poppe, L.: *Biokatalitikus folyamatok szintetikus alkalmazása és mechanizmusvizsgálata*; MTA-doktori értekezés; Budapest, 63-67; **2000**.
23. Toke, L., Szeghy, L., *Gyógyszerkémia I-II. Tankönyvkiadó*, Budapest, **1992**.
24. Encyclopedia Reprint Series, *Chemotherapeutics and Disease Control* JohnWiley&Sons, New York, **1993**.
25. Bódai, V.; Egri, G.; Bálint, J.; Novák, L.; Poppe, L.: *Synthesis and Lipase-catalyzed Enantioselective Acetylation of 2-Acyloxypropane-1,3-diols* , 27 th GDCh General Meeting and 37 th IUPAC Congress; 15-19th August, **1999**. Berlin, Germany.
26. Bódai, V.: 2-Aciloxi,3-propándiolok enzimes acilezése ismert és fonalgombákból újonnan izolált enzimekkel, Diplomamunka, BME, Budapest, **2000**.
27. Ghisalba, O.; Lattmann, R.; Gyax, D.: *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **110**(05), **1991**, 263-264.

28. Ramos-Tombo, G. M.; Shär, H. P.; Fernandez, X.; Busquets, I.; Ghisalba, O.: *Tetrahedron Lett.*, 27(47), **1986**, 5707-5710.
29. Murata, M.; Terao, Y.; Achiwa, K.; Nishio, T.; Seto, K.: *Chem. Pharm. Bull.* 37, **1989** 2670.
30. Breitgoff, D.; Laumen, K.; Schneider, M.: *Chem. Commun.* 16, **1986**, 1523.
31. Kerscher, V.; Kreiser, W.: *Tetrahedron Lett.* 28(5), **1987**, 531-534.
32. Wang, Y. F.; Lalonde, J. J.; Momongau, M.; Beergbreiter, D. E.; Wong, C. H.: *J. Am. Chem. Soc.* 110(21), **1988**, 7200-7205.
33. Wang, Y. F.; Wong, C. H.: *J. Org. Chem.* 53(13), **1988**, 3127-3129.
34. Terao, Y.; Nurata, M.; Achiwa, K.: *Tetrahedron Lett.* 29, **1988**, 5173-5175.
35. Xie, Z. F.; Suemune, H.; Sakai, K.: *Chem. Commun.* 24, **1988**, 1638-1639.
36. Wang, Y. F.; Sih, C. J.; *Tetrahedron Lett.* 25., **1984**, 4999-5000.
37. Suemune, H.; Sakai, K.; Xie, Z. F.; Harabe, T.: *Chem. Pharm. Bull.* 36, **1988**, 4337-4340.
38. Bódai, V.; Novák, L.; Poppe, L.: *Synlett*, 6, **1999**, 759-761. (I. melléklet)
39. Bódai, V.; Peredi, R.; Bálint, J.; Egri, G.; Novák, L.; Szakács, Gy.; Poppe, L.: *Adv. Synth. Catal.*, **2003**, 345 (6-7); 811-818. (II. melléklet)
40. Carlsen, J.; Sorbze, K.; Ulven, T.; Aasbo, K., *Acta Chemica Scandinavica* 50(2), **1996**, 185-187.
41. Egri, G.; Bálint, J.; Peredi, R.; Fogassy, E.; Novák, L.; Poppe, L.: *J. Mol. Cat. Sect. B.*, 10, **2000**, 583-596.
42. Egri, G.; Bálint, J.; Bódai, V.; Szakács, Gy.; Fogassy, E.; Novák, L.: *Biotrans'99*, Giardini Naxos, Olaszország, **1999**. szeptember 26 - október 1.
43. Bódai, V.; Peredi, R.; Bálint, J.; Novák, L.; Poppe, L.; Szakács, Gy.: *International Training Course organized by the Hungarian Society for Microbiology and the UNESCO- Hebrew University of Jerusalem International School for Molecular Biology, Microbiology and Science for Peace*, Keszthely, **2000**. Aug., 23-27.,
44. Szakács, G.; Poppe, L.; Bódai, V.; Peredi, R.; Bálint, J.; Novák, L.: *Pacificchem 2000*, Honolulu, Hawaii, **2000**. Dec., 9-14.
45. Bódai, V.; Peredi, R.; Bálint, J.; Novák, L.; Poppe, L.; Szakács, G.: *International Conference on New Horizons in Biotechnology*, Trivandium, India, **2001**. Árp., 18-21.
46. Hayward, R. C.; Overton, C. H.; Witham, G. H.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1976**, 2413-2415.
47. Sakai, K.; Suemune, H.: *Tetrahedron: Asymmetry*, 4, **1993**, 2109-2118.
48. Kato, K.; Suemune, H.; Sakai, K.: *Tetrahedron Lett.* 34, **1993**, 4979-4980.
49. Orovecz, O.; Kovács, P.; Kolonits, P.; Párkányi, L.; Szabó, É.; Novák, L.: *Synthesis*, **2002**, 2711-2716.
50. Seemayer, R.; Schneider, M. P.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1, **1991**, 49-50.
51. Kaga, H.; Yamaguchi, Y.; Narumi, A.; Yokota, K.; Kakuchi, T.: *Enantiomer*, 3, **1988**, 203-205.
52. Crout, D. H. G.; Gaudet, V. S. B.; Laumen, K.; Schneider M. P.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1986**, 808-810.
53. Xie, Z.-F.; Suemune, H.; Sakai, K.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 838-839.
54. Caron, G.; Kazlaukas, R. J.: *J. Org. Chem.*, 56, **1991**, 7251-7256.
55. Fang, C.; Ogawa, T.; Suemune, H.; Sakai, K.: *Tetrahedron: Asymmetry*, 2, **1991**, 389-398.
56. Xie, Z.-F.; Nakamura, I.; Suemune, H.; Sakai, K.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1988**, 966-967.

57. Clarke, P. A.; Holton, R. A.; Kayaleh, N. E.; *Tetrahedron Lett.*: **41**, **2000**, 2687-2690.
58. Egri, G.; Baitz-Gács, E.; Poppe, L.: *Tetrahedron: Assymetry*, **7**, **1996**, 1437-1448.
59. Bódai, V.; Orovecz, O.; Szakács, Gy.; Novák, L.; Poppe, L.: *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, közlésre benyújtva. (V. melléklet)
60. Sevin, C.: *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **2**, **1974**, 918-921.
61. Bihovsky, R.; Boudepudi, V.: *Tetrahedron*, **46**, **1990**, 7669-7676.
62. Rosen, T.; Heathcock, C. H.: *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, **1985**, 3731-3733.
63. Rehm, H.-J.; Reed, G.; Pühler, A.; Stadler, P.; Kelly, D. R.: *Biotechnology: Biotransformations I and II*, Vols. 8a and 8b, 2nd Edn., Wiley-VCH, Weinheim, **1998**
64. Faber, K.: *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4th Edn., Springer, Berlin, **2000**.
65. Pallavicini, M.; Valoti, E.; Villa, L.; Piccolo, O.: *J. Org. Chem.*, **59** (7), **1994**, 1751-1754.
66. Liljeblad, A.; Vanttinen, E.; Kanerva, L.: *Chirality*, **11**, **1999**, 432-439.
67. Egri, G.: Gyógyszerkémiai technológia, Muegyetemi kiadó, Budapest, **1995**.
68. Bevinakatti, H. S.; Badiger, V. V.: *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **314**, **1981**, 162-167.
69. Wahbi, Y.; Caujolle, R.; Tournaire, C.; Payard, M.; Linas, M. D.; Seguela, J. P.: *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.*, **30**, **1995**, 955-962.
70. Machin, P. J.; Hurst, D. N.; Osbond, J. M.: *J. Med. Chem.*, **28**, **1985**, 1648-1651
71. Hoffman, J. M.; Smith, A. M.; Rooney, C. S.; Fisher, T. E.; Wai, J. S.; Thomas, C. M.; Bamberger, D. L.; Barnes, J. L.; Williams, T. M.: *J. Med. Chem.*, **36**, **1993**, 953-966.
72. Knoll, J.: *CNS Drug Reviews*, **7**, **2001**, 317-345.
73. Kusakabe, M.; Kitano, Y.; Kabayashi, Y.; Sato, F.: *J. Org. Chem.*, **54**, **1989**, 2085.
74. Guette, J. P.; Spassky, N.: *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1972**, 4217-4218.
75. Ridley, D. D.; Stralow, M.: *Chem. Commun.*, **1975**, 400.
76. Barry, J.; Kagan, H. B.: *Synthesis*, **1981**, 453-457.
77. Aragozzini, F.; Maconi, E.; Potenza, C.; Scolastico, C.: *Synthesis*, **1989**, 225-227.
78. Manzocchi, A.; Fiecchi, A.; Santaniello, E.: *J. Org. Chem.*, **53**, **1988**, 4405-4408.
79. Waagen, V.; Partali, V.; Hollingsaeter, I.; Huang, M. S. S.; Anthonsen, T.: *Acta Chem. Scand.*, **48**, **1994**, 506-510.
80. Watson, C. Y.; Whish, W. J. D.; Threadgill, M. D.: *Bioorg. Med. Chem.*, **6**, **1998**, 721-734.
81. Egri, G.; Kolbert, A.; Bálint, J.; Fogassy, E.; Novák, L.; Poppe, L.: *Tetrahedron: Assymetry*, **9**(2), **1998**, 271-283.
82. Paizs, Cs.; Tosa, M.; Majdik, C.; Moldovan, P.; Novák, L.; Kolonits, P.; Marcovici, A.; Irimie, F.-D.; Poppe, L.: *Tetrahedron: Assymetry*, **2003**, nyomtatás alatt. (IV. melléklet)
83. Bódai, V.; Paizs, Cs.; Tosa, M.; Majdik, C.; Kmecz, I.; Simándi, B.; Szakács, Gy.; Poppe, L.: *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2002 évi nagygyűlése*, **2002**, október 8-10, Balatonfüred.
84. Bódai, V.; Paizs, Cs.; Tosa, M.; Majdik, C.; Peredi, R.; Egri, G.; Bálint, J.; Novák, L.; Szakács, Gy.; Poppe, L.: *VIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia*, (ISBN 973-85809-8-6), **2002**, november 15-17., Kolozsvár, Románia, 62-65.
85. Poppe, L.; Paizs, Cs.; Pilbák, S.; Bódai, V.; Szakács, Gy.; Novák, L.; Irimie, F.-D.: **VIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia**, (ISBN 973-85809-8-6), **2002**, november 15-17., Kolozsvár, Románia, 250-253.

86. Paizs, Cs.; Tosa, M.; Majdik, C.; Bódai, V.; Novák, L.; Irimie, F.-D.; Poppe, L.: *J. Chem. Soc., Perkin 1*, **21**, **2002**, 2400-2402. (III. melléklet)
87. Paizs, Cs.; Tosa, M.; Bódai, V.; Szakács, Gy.; Kmecz, I.; Simándi, B.; Majdik, C.; Novák, L.; Irimie, F.D.; Poppe, L.: *Tetrahedron:Asymmetry*, **2003**, nyomdában
88. Kmecz, I.; Simándi, B.; Poppe, L.; Renner, K.; Bódai, V.; Csajági, Cs.: *Szuperkritikus oldószerek analitikai és muveleti alkalmazása konferencia*, BME, **2002**, május 23., Budapest.
89. Oven, L. N.; Saharia, G. S.: *J. Chem. Soc.*, **1953**, 2582-2588.
90. Cope, A. C.; Pike, R. A.; Spencer, C. F.: *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, **1953**, 3212-3215.
91. Laine, D.; Fujita, M.; Ley, S. V.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans., 1*, **1999**, 1639-1646.
92. Naemura, K.; Fukuda, R.; Murata, M.; Konishi, M.; Hirose, K.; Tobe, Y.: *Tetrahedron: Asymmetry*, **6**, **1995**, 2385-2394.
93. Nishio, T.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **10**, **1993**, 1113-1118.
94. Schudok, M.; Kretschmar, G.: *Tetrahedron Lett.*, **38**, **1997**, 387-388.
95. Faraldos, J.; Arroyo, E.; Herradon, B.: *Syn. Lett.*, **5**, **1997**, 367-370.
96. Tanno, N.; Terashima, S.: *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, **1983**, 837-851.
97. Kita, Y.; Takebe, Y.; Murata, K.; Naka, T.; Akai, S.: *J. Org. Chem.*, **65**, **2000**, 83-88.
98. Magnusson, R.: *Acta Chem. Scand.*, **17**(8), **1963**, 2358-2359.

4. ÖSSZEFOGLALÁS

Az élet mind több területén találkozunk azzal az igénnyel, hogy olyan, egészségünket, környezetünket nem károsító anyagokkal vegyük körül magunkat, melyek gyártása is környezetbarát. Az új igényeknek megfelelően új alkalmazási területek születtek, új kutatási irányok váltak életképesé, illetve lehetőséget adtak egy-egy folyamat környezetbarát megvalósítására. Ilyen új irány a *biokatalízis*, melyet az utóbbi évtizedektől kezdve a hagyományos szerves kémiai (szintetikus) eljárások kiegészítéseként, vagy akár helyettesítéseként elterjedten alkalmazzák. Felhasználják gyógyszerhatóanyagok, mezőgazdasági vegyszerek, finomkémikáliák és műanyagok gyártása során. A növekvő igények kielégítéséhez mikroorganizmusokból, növényi vagy állati sejtekből nyerhető új biokatalizátorok kutatása vált szükségessé.

Doktori munkám elsődleges célkitűzése termofil fonalgombákból lipáz/karboxiészteráz aktivitással rendelkező, a szerves szintetikus gyakorlatban általános biokatalizátorként jól használható enzimek előállításának vizsgálata volt, vizsgáltam ezek alkalmazhatóságát ismert, illetve eddig még nem vizsgált enzimek katalizált folyamatokban.

Kísérleteimet két tanszéken végeztem, ennek megfelelően a dolgozat is két különálló részre tagolódik, igazodva a mikrobiológia és a szerves kémia eltérő formái követelményeket támogató publikációs szokásaihoz. A dolgozat első fele a mikrobiológia, míg a második inkább a szerves kémia tudományterületéhez illeszkedik.

Kétféle rázatott lombikos táptalajon összesen **45 termofil fonalgomba izolátumot** növesztettünk, majd a felülúszóból mértük lipáz- és hidrolázaktivitásukat. A vizsgált fajok egy részéről már leírták, hogy termelnek lipáz/karboxiészteráz aktivitással rendelkező enzimeket, azonban a vizsgált termofil fonalgombák közül csak néhányat alkalmaztak az iparban lipáz termelésre, sőt többségüket eddig még nem is tesztelték biokatalitikus folyamatokban. Az általunk vizsgált *Myceliophthora thermophila*, *Thielavia terrestris* és *Thermomucor indicae-seudaticae* lipáz/karboxiészter hidrolázaktivitására nem találtunk utalást az irodalomban. Kísérleteink során 18 nem identifikált termofil fonalgombát is teszteltünk, melyek a TUB törzsgyűjteményből származtak. A TUB F-987, TUB F-914, TUB F-1003 és TUB F-1060 jelű izolátumok makroszkópikus telepmorfológiája az ismert fajokhoz viszonyítva jelentősen eltér, így nem elképzelhetetlen, hogy új termofil fajok vagy törzseket képviseljenek. A lipázaktivitást olívaolaj, *p*-nitrofenil-palmitát (*p*NPP) és *p*-nitrofenil-butirát (*p*NPB) szubsztrátokkal mértük. A rázatott lombikos fermentációt követően a sejtmentes felülúszóból a további kísérletekhez **90 különböző szárított enzimek előállítását** állítottunk elő.

A magas aktivitást adó törzsek közül a legjobb **25 termofil fonalgomba törzset** kétféle szilárd fázisú táptalajon is növesztettük, majd mértük lipáz- és hidrolázaktivitásukat. Méréseink alapján megállapítottuk, hogy néhány termofil fonalgomba izolátumának esetében szilárd fázisú fermentációval magasabb lipáz/hidroláz aktivitást tudunk elérni, mint a korábban alkalmazott rázatott lombikos fermentáció során. A gombamicéliumot tartalmazó fermentációs mátrix szárításával közel **45 szárított enzimek előállítását** állítottunk elő. Ezek a készítmények olcsó, könnyen használható, megbízható biokatalizátoroknak bizonyultak, szabadalmaztatásuk lehetősége felmerült.

A termofil fonalgombákból nyert – új típusú – enzimek előállítását **enantiotóp és enantiomer szelektív szerves kémiai szintézisekben teszteltük** (acilezés, hidrolízis, alkoholízis). A kiválasztott szintézisek többségében eddig még nem vizsgált vegyületeket, vegyületcsoportokat optikailag tiszta formában sikerült előállítanunk.

Enantiotóp szelektív biotranszformációként a **2-benzoiloxipropán-1,3-diol előállítását és enzimes reakcióit vizsgáltuk**. A munka folytatásaként saját izolálású

enzimkészítményeinkkel teszteltük a 2-aciloxipropán-1,3-diol család másik jellemző vegyületének a 2-(*p*-toluolszulfonil)-oxipropán-1,3-diolnak az enzimes acilezését is. Kísérleteink során azt találtuk, hogy a termofil fonalgombákból nyert enzimkészítményeink a kereskedelmi készítményekhez képest szélesebb szelektivitástartományban, ellentétes konfigurációjú termékeket is szolgáltatottak, mind benzoil (BUTE-7b, *R*, 94 % ee — BUTE-4a, *S*, 71 % ee), mind a *p*-toluolszulfonil (BUTE-7b, *R*, 4 % ee — BUTE-4a, *S*, 52 % ee) származék esetében.

A vizsgált *enantiomer szelektív* biotranszformációk közül az **1-feniletanol** és **glicerinkarbonát** enzimátikus átalakításai az irodalomból már ismertek, így a saját enzimkészítményeinkkel kapott eredményeink összevethetőek ezekkel az adatokkal. Enzimpreparátumaink egy része a kereskedelmi enzimek szelektivitás tartományában működött, míg néhányuk a legjobb kereskedelmi enzimmél magasabb enantiomertisztaságú termékeket szolgáltatott mind az 1-feniletanol (BUTE-3a, *R*, >99 % ee; *E*>1000), mind a glicerinkarbonát (BUTE-6a, *S*, 74 % ee; *E*=10) esetében.

Enantiomer szelektív reakcióként a **transz-2-acetoxicikloalkán-1-olok** (pentán-, hexán-, heptán- és oktán-) enzimkatalizált acilezési reakcióiban teszteltünk több kereskedelemben kapható és saját, termofil fonalgombákból előállított enzimkészítményt. Kereskedelmi Lipase AK és saját izolálású BUTE-3b enzimkészítményekkel sikerült az irodalomban eddig még nem publikált, enantiomertiszta (*R,R*)-diacetátokat és (*S,S*)-monoacetátokat előállítanunk.

Az **1-(benzofurán-2-il)-etanolok** lipáz katalizált acilezését igen magas enantiomer szelektivitással tudtuk megvalósítani mind a kereskedelmi forgalomból beszerezhető immobilizált Lipozyme TL IM, mind a BUTE-3b felhasználásával. Az acilezést követően teszteltük a benzofurán származékok enzimes hidrolízisét/alkoholízisét is, lombikban, illetve szuperkritikus CO₂-ban is.

A vizsgált heterociklusos alkoholokhoz hasonlóan magas szelektivitás értékeket sikerült elérnünk az **1-(benztiazol-2-il)-etanol** enzimes acilezése során is.

A kiindulási célkitűzésnek megfelelően több általánosan felhasználható biokatalizátort állítottunk elő. A szerves szintetikus reakciókban tesztelt enzimkészítményeink között találtunk több olyan biokatalizátort, melyek a kereskedelmi enzimekhez hasonló sebességgel és szelektivitással katalizálták a folyamatokat. Néhány esetben készítményeinkkel sikerült a másik enantiomer terméket is kinyernünk. Legjelentősebb eredményként előállítottunk egy olyan enzimkészítményt is (**BUTE-3b**), amely a reakciók nagy részében a kereskedelmi forgalomban kapható enzimeknél is jobb szelektivitással katalizálta a folyamatokat. Ennek az enzimkészítménynek a szabadalmaztatása megfontolás tárgya.

5. RÖVIDÍTÉSEK

BUTE	a Budapesti Muszaki és Gazdasági Egyetemen kutatómunkánk során létrehozott hidroláz/lipáz enzimmészlete (rövidítés eredete: B udapest U niversity of T echnology and E conomics)
BK	szilárd fázisú fermentáció búzakorpás táptalaja
CcL	<i>Candida cylindracea</i> lipáz
<i>E</i>	enantiómer szelektivitás dimenzió nélküli méroszáma, melyet a Michaelis-Menten enzimkinetika két kompetitív enzimreakciójának k_{kat} és K_m értékeiből lehet kifejezni
ee %	enantiómer tisztaság
LIP1; LIP2	rázatott lombikos táptalajok
?	Konverzió
<i>p</i> NP	<i>p</i> -nitrofenil
<i>p</i> NPB	<i>p</i> -nitrofenil-butirát
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrofenil-palmitát
PDA	potato-dexrose-agar, burgonya-dextróz-agar, Petri-csészés táptalaj
PLE	porcine liver esterase, sertés máj észteáz
PPL	porcine pancreatic lipase, sertés-hasnyálmirigy lipáz
R	szilárd fázisú fermentáció repcemagos táptalaja
SSF	szilárd fázisú fermentáció
THF	tetrahidrofurán
TUB	a Budapesti Muszaki és Gazdasági Egyetem Dr. Szakács György által létrehozott törzsgyűjteménye (rövidítés eredete: T echnical U niversity of B udapest)
VRK	vékony réteg kromatográfia