

**Ph.D. értekezés tézisei**

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

KÉSZÍTETTE:

**BÓDAI VIKTÓRIA**

TÉMAVEZETOK:

**DR. POPPE LÁSZLÓ**

**DR. SZAKÁCS GYÖRGY**

BUDAPESTI MVSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM

SZERVES KÉMIA TANSZÉK

MEZOGAZDASÁGI KÉMIAI TECHNOLÓGIA TANSZÉK

*BUDAPEST, 2003*

## 1. BEVEZETÉS, CÉLKITUZÉSEK

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 életképpé, 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 alkalmaznak. Felhasználják gyógyszer-hatóanyagok, 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/karboxilészteráz aktivitással rendelkező, a szerves szintetikus gyakorlatban általános biokatalizátorként jól használható enzimkészítmények előállítása volt, vizsgáltam ezek alkalmazhatóságát ismert, illetve eddig még nem vizsgált enzimek katalizált folyamatokban.

## 2. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

### 2.1. *Termofil fonalgombák rázatott lombikos fermentációja*<sup>1</sup>

Összesen 45 termofil fonalgombát növesztettünk kétféle rázatott lombikos táptalajon, majd a felülúszóból mértük lipáz- és hidrolázaktivitásukat. A rázatott lombikos fermentáció a leggyakrabban alkalmazott laboratóriumi mikroba szaporítási módszer, eredményei általában jó korrelációban vannak az iparban széles körben használt süllyesztett fermentáció adataival. A vizsgált fajok egy részéről már leírták, hogy termelnek lipáz/karboxilészteráz aktivitással rendelkező enzimeket, azonban ezen fonalgombák közül csak néhányat

alkalmazták az iparban lipáz termelésre. Többségüket eddig még nem tesztelték biokatalitikus folyamatokban sem. Legjobb tudomásunk szerint az általunk vizsgált *Myceliophthora thermophila*, *Thielavia terrestris* és *Thermomucor indicae-seudaticae* lipáz/karboxilészteráz aktivitását ez idáig még nem közölték. Kísérleteink során 18 nem azonosított termofil fonalgombát is teszteltünk, melyek a TUB törzsgyűjteményből származtak. A TUB F-987, TUB F-914, TUB F-1003 és TUB F-1060 jelu izolátumok makroszkópikus telepmorfológiája az ismert fajokhoz viszonyítva jelentősen eltér, így nem elképzelhetetlen, hogy új termofil fajokat vagy törzseket képviselnek. A lipáz/karboxilészteráz aktivitást 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 enzimmészítményt állítottunk elő.

## **2.2. Termofil fonalgombák szilárd fázisú fermentációja**

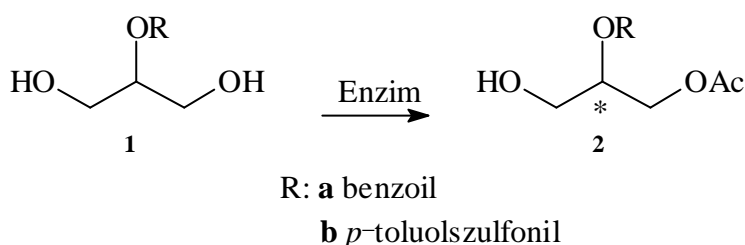
A magas aktivitást adó törzsek közül a legjobb 25 termofil fonalgomba törzset kétféle szilárd fázisú táptalajon is növesztettük, majd mértük lipáz/karboxilészteráz aktivitásukat. Méréseink alapján megállapítottuk, hogy néhány termofil fonalgomba izolátumának esetében szilárd fázisú fermentációval magasabb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

### 2.3. Biokatalizátorok tesztelése szerves kémiai szintézisekben

A termofil fonalgombákból rázatott lombikos fermentációval és a szilárd fázisú fermentációval előállított – új típusú – enzimek készítményeinket enantiotóp és enantiomer szelektív szerves kémiai szintézisekben teszteltük (acilezés, hidrolízis, alkoholízis). A kiválasztott reakciók többségében, számos eddig még nem vizsgált vegyületcsaládot, illetve vegyületet sikerült optikailag aktív, az esetek többségében enantiomertiszta formában előállítanunk.

#### 2.3.1. Enantiotóp szelektív biotranszformációk vizsgálata

##### 2.3.1.1. 2-Substituált-1,3-propándiolok előállítása és enzimikus reakciói(1) <sup>1, 2,</sup>

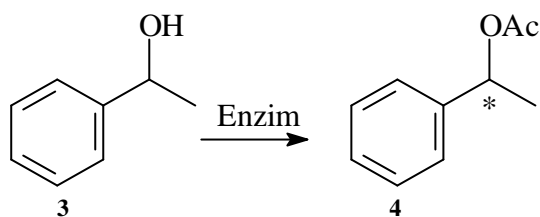


Tudomásunk szerint a 2-es helyzetben aciloxisubstitúált-1,3-propándiolok (tk. 2-*O*-acil-glicerín származékok) enzimikus átalakításait előttünk még senki sem tanulmányozta, holott az így nyerhető királis származékok szintetikus célokra általánosan felhasználható vegyületeknek ígérkeznek. Doktori munkám során előállítottuk a 2-benzoiloxipropán-1,3-diól (**1a**), mint e család első képviselőjét és teszteltük kereskedelmi forgalomban kapható enzimekkel<sup>2</sup>. A munka folytatásaként saját izolálású enzimek készítményeinkkel teszteltük a 2-aciloxipropán-1,3-diol család másik jellemző vegyületének a 2-(*p*-toluolszulfonil)-oxipropán-1,3-diólnak (**1b**) az enzimikus acilezését is<sup>1</sup>. Kísérleteink során azt találtuk, hogy a termofil fonalgombákból nyert enzimek készítményeink a kereskedelmi készítményekhez képest szélesebb szelektivitástartományban, ellentétes konfigurációjú termékeket is szolgáltatnak, mind benzoil (**1a**, BUTE-7b, *R*, 94 % ee — BUTE-4a, *S*, 71 % ee), mind

*p*-toluolszulfonil (**1b**, BUTE-7b, *R*, 4 % ee — BUTE-4a, *S*, 52 % ee) származék esetében.

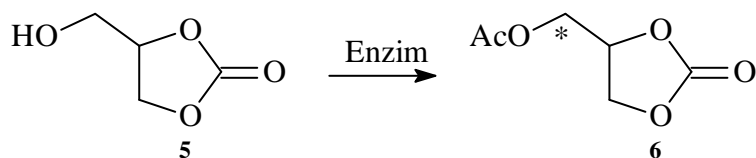
### 2.3.2. Enantiomer szelektív biotranszformációk vizsgálata

#### 2.3.2.1. Az 1-feniletanol enzimes acilezése(**3**)<sup>1</sup>



A *rac*-1-feniletanol (*rac*-**3**) és észtereinek enzimes átalakításai az irodalomból már jól ismertek, így a *rac*-1-feniletanol (*rac*-**3**) az általunk előállított enzimek készítmények biotranszformációjához jó tesztsubstrátnak bizonyult. Királis állófázison végzett GC méréssel sikerült mind a kiindulási 1-feniletanol mind az acilezési reakcióban keletkező acetátok enantiomerjeit elválasztanunk. Enzimek készítményeink egy része a kereskedelmi enzimek szelektivitás tartományában működött, míg néhányuk a legjobb kereskedelmi enzimmél magasabb enantiomertisztaságú termékeket szolgáltatott (**3**, BUTE-3a, *R*, >99% ee; E>1000).

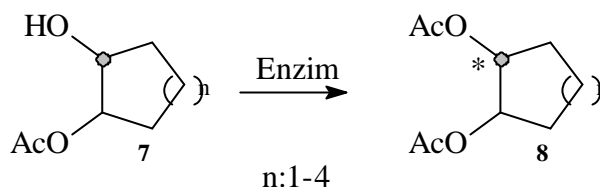
#### 2.3.2.2. A glicerín-karbonát enzimes reakciói(**5**)



A *racém* glicerín-karbonát (*rac*-**5**) kereskedelmi enzimekkel katalizált acilezése és hidrolízise ismert folyamatok. Közel harminc kereskedelmi, kilencven rázatott lombikos fermentációval, valamint tizenhárom szilárd fázisú fermentációval kapott enzimek készítményt teszteltünk. A vizsgált készítmények közül a legjobb szelektivitással rendelkező kereskedelmi Lipase PS (*S*, 52 % ee,

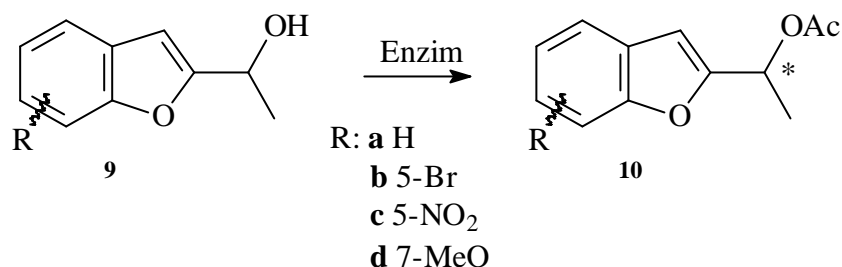
$E=5,1$ ) enzimhez képest a saját BUTE-6a ( $S$ , 74 % ee,  $E=10$ ) enzim szelektívebbnek bizonyult. A reakciókat királis állófázison végzett GC méréssel követtük nyomon.

### 2.3.2.3. A *transz*-2-acetoxicikloalkán-1-ol enzimes reakciói(7)<sup>3</sup>



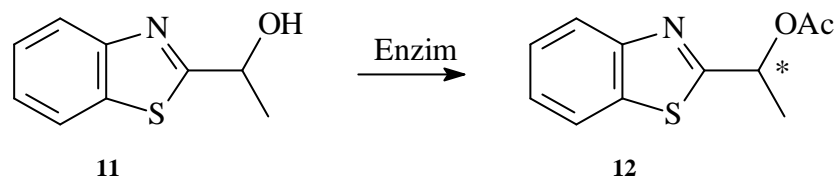
A *transz*-2-acetoxicikloalkán-1-olok (**7**) (ciklopentán, -hexán, -heptán és -oktán származékok) enzimkatalizált acilezését több kereskedelemben kapható, valamint termofil fonalgombából általunk preparált enzimkészítménnyel teszteltük. Végtermékként enantiomertiszta ( $R,R$ )-diacetátokat ( $(R,R)$ -**8**) és az eddig enantiomertiszta formában nem ismert ( $S,S$ )-monoacetátokat ( $(S,S)$ -**7**) sikerült előállítanunk. Az öt-, hat- és hétagú származékok enzimes acilezésénél a termofil fonalgombából általunk előállított BUTE-3b enzimkészítmény a kereskedelmi enzimeknél gyorsabban és kimagaslóan jó szelektivitással katalizálta a reakciókat, míg a nyolctagú gyururendszeren készítményeink kevésbé szelektívnek bizonyultak. A legjobb három enzimmal preparatív léptéku enzimes acilezést és hidrolízist végeztünk. A preparatív léptéku reakciók könnyebb feldolgozása és a tiszta enantiomerek előállítása céljából extrakciós lépéssel váltottuk ki a végso kromatográfiás eljárást. A reakciókat királis állófázisú GC-n követtük nyomon.

2.3.2.4. Az 1-(benzofurán-2-il)-etanol (**9**) származékok előállítása és enzimés reakciói<sup>4, 5</sup>



Új, enzimés alkoholízist magába foglaló eljárást dolgoztunk ki hidroximetil és acetoximetil ketonok előállítására<sup>4</sup> sütőésztovell végezhető redukciók tanulmányozásához. A módszer intermedierjeként nyerhető ketonok kémiai redukciójával racém 1-(benzofuran-2-il)etanoloikat (**9**) állítottunk elő, és vizsgáltuk lipáz katalizált acilezési reakcióikat<sup>5</sup>. A *racém* 1-(benzofuran-2-il)etanoloik (*rac*-**9**) lipáz-katalizált acilezését igen magas enantiomer szelektivitással tudtuk megvalósítani több enzimmel, mint például a kereskedelmi forgalomból beszerezhető immobilizált Lipozyme TL IM enzimmel, vagy a saját fejlesztésű BUTE-3b biokatalizátorral. Az acilezést követően teszteltük a benzofurán származékok enzimés hidrolízisét/alkoholízisét is különböző körülmények között, beleértve szuperkritikus CO<sub>2</sub>-ban történt átalakításokat is<sup>5, 7</sup>, ám e folyamatok szelektivitása minden esetben alatta maradt az acilezéssel elérhetőnek. Az enantiomerösszetételt királis fázison GC-vel és HPLC-vel határoztuk meg.

### 2.3.2.5. Az 1-(benzotiazol-2-il)etanol (**11**) előállítása és enzimés reakciói



A vizsgált benzofurán származékokhoz hasonlóan magas szelektivitás értékeket sikerült elérnünk az 1-(benzotiazol-2-il)-etanol (**11**) enzimés acilezése során is.

## 2.4. Összefoglaló értékelés

A kiindulási célkitűzésnek megfelelően több általánosan felhasználható biokatalizátort állítottunk elő. A szintetikus reakciókban tesztelt enzimek készítményeink között találtunk több olyan biokatalizátort, melyek a kereskedelmi enzimekhez hasonló sebességgel és szelektivitással katalizálták a folyamatokat. Néhány készítményünk, a többi enzimek készítményéhez viszonyítva ellentétes sztereoszelektivitásúnak bizonyult. Legjelentősebb eredményként előállítottunk egy olyan enzimek készítményt is (BUTE-3b), amely a reakciók nagy részében a kereskedelmi forgalomban kapható enzimeknél is jobb szelektivitással katalizálta a folyamatokat. Ennek az enzimek készítménynek a szabadalmaztatása megfontolás tárgya.



### 3. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

#### 3.1. Cikk

1. Bódai, V., Peredi, R., Bálint, J., Egri, G., Novák, L., Szakács, Gy., Poppe, L.: Novel Hydrolases from Thermophilic Filamentous Fungi for Enantiomer and Enantiotopic Selective Biotransformations, *Adv. Synth. Catal.*, 345, **2003**, (6-7), 811-818. [2.18]
2. Bódai, V., Novák, L., Poppe, L.: Synthesis and lipase-catalyzed enantioselective acetylation of 2-benzoyloxy-1,3-propanediol, *SynLett*, **1999**, 759-761. [2.75]
3. Bódai, V., Orovecz, O., Szakács, Gy., Novák, L., Poppe, L.: Kinetic resolution of trans-2-acetoxycycloalkan-1-ols by lipase-catalysed enantiomer selective acylation, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 14, **2003**, 2605-2612. [2.80]
4. Paizs, Cs.; Tosa, M.; Majdik, C.; Bódai, V.; Novák, L.; Irimie, F.-D.; Poppe, L.: Chemo-enzymic preparation of hydroxymethyl ketones, *J. Chem. Soc., Perkin 1*, 21, **2002**, 2400-2402. [2.18]
5. Paizs, Cs., Tosa, M.; Bódai, V.; Szakács, Gy.; Kmecz, I.; Simándi, B.; Majdik, C.; Novák, L.; Irimie, F.D.; Poppe, L.: Kinetic resolution of 1-(benzofuran-2-yl)ethanols by lipase-catalysed enantiomer selective reactions, *Tetrahedron: Asymmetry*, 14, **2003**, 1943-1949. [2.80]
6. Bódai, V.: Mikroorganizmusok alkalmazása a kémiában, *Környezetvédelem* **2002**, (3-4), 41.

#### További megjelent publikációk

7. Poppe, L.; Paizs, Cs.; Tosa M.; Majdik C.; Pilbák, S.; Bódai, V.; Szakács, Gy. Novák L.; Irimie, F.-D.: Magas enantiomertisztaságú heterociklusos vegyületek előállítása biokatalitikus módszerekkel; **VIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, 2002** november 15-17, Kolozsvár, Románia, *Erdélyi Magyar Muszaki Tudományos Társaság* 250-253; ELOADÁS-kiadvány (ISBN 973-85809-8-6)
8. Bódai, V.; Paizs, Cs., Tosa M., Majdik C., Peredi, R.; Egri G.; Bálint, J.; Novák L.; Szakács, Gy., Poppe, L.: Termofil fonalgomba lipázok szintetikus alkalmazásának lehetőségei; **VIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, 2002** november 15-17, Kolozsvár, Románia, *Erdélyi Magyar Muszaki Tudományos Társaság* 62-65; ELOADÁS-kiadvány (ISBN 973-85809-8-6)

9. Bódai, V.; Paizs, C.; Tosa, M.; Majdik, C.; Pilbák, S.; Novák, L.; Florin-Dan Irimie; Szakács, G.; Poppe, L.: Novel hydrolases from thermophilic fungi for stereoselective biotransformations; **BioTrans Olomouc 2003**, jun. 28- jul. 3, 2003, 6th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, Olomouc, Czech Republic, CHLSAC 97; *Chemické listy* 6, 486; 487; ELOADÁS-kiadvány (ISSN 0009-2770)
10. Bódai, V.; Szakács, G.; Paizs, C.; Pilbák, S.; Peredi, R.; Bálint, J.; Egri, G.; Novák, L.; Dukai, J.; Poppe, L.: Novel hydrolases from thermophilic filamentous fungi for enantiomer and enantiotopic selective biotransformations; **BioTrans Olomouc 2003**, jun. 28- jul. 3, 2003, 6th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, Olomouc, Czech Republic, CHLSAC 97; *Chemické listy* 6, 487; ELOADÁS-kiadvány (ISSN 0009-2770)

### 3.2. Eloadások

11. Bódai, V.; Paizs, Cs., Tosa M., Majdik C., Peredi, R.; Egri G.; Bálint, J.; Novák L.; Szakács, Gy. Poppe, L.: Termofil fonalagomba lipázok szintetikus alkalmazásának lehetőségei; **VIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia**, 2002. November 15-17, Kolozsvár, Románia, *MAGYAR NYELVU*
12. Bódai, V., Peredi, R., Bálint, J., Novák, L., Poppe, L., and Szakács, Gy.: Termofil fonalagombák hidroláz (lipáz) aktivitásának vizsgálata. **XXIII. Kémiai Eloadói Napok, 2000**. November. 20-22. Szeged, *NÍVÓDÍJAS-MAGYAR NYELVU*
13. Poppe, L.; Paizs, Cs.; Tosa M.; Majdik C.; Pilbák, S.; Bódai, V.; Szakács, Gy Novák L.; Irimie, F.-D.: Magas enantiomertisztaságú heterociklusos vegyületek előállítása biokatalitikus módszerekkel; **VIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, 2002** november 15-17, Kolozsvár, Románia,
14. Poppe L.; Egri, G.; Bálint, J.; Bódai, V.; Szakács, Gy.; Fogassy, E.; Novák, L.: Biocatalytic preparation of chiral glycerol derivatives, **Biotrans'99, 1999**. szeptember 26 - október 1., Giardini Naxos, Olaszország

### 3.3. Poszterek

15. Bódai, V.; Paizs, C.; Tosa, M.; Majdik, C.; Pilbák, S.; Novák, L.; Florin-Dan Irimie; Szakács, G.; Poppe, L.: Novel hydrolases from thermophilic fungi for stereoselective biotransformations; **BioTrans Olomouc 2003**, 6<sup>th</sup> International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, Olomouc, jun. 28- jul. 3, **2003**, Czech Republic.

- 
16. Bódai, V.; Szakács, G.; Paizs, C.; Pilbák, S.; Peredi, R.; Bálint, J.; Egri, G.; Novák, L.; Dukai, J.; Poppe, L.: Novel hydrolases from thermophilic filamentous fungi for enantiomer and enantiotopic selective biotransformations; **BioTrans Olomouc 2003**, 6<sup>th</sup> International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, jun. 28- jul. 3, 2003, Olomouc, Czech Republic.
  17. Bódai, V.; Paizs, Cs.; Tosa, M.; Majdik, C., Kmecz I.; Simándi B.; Szakács Gy.; Poppe L.: Új lipázok heterociklusos vegyületek sztereoszelektív átalakításában **Magyar Mikrobiológiai Társaság 2002 évi nagygyűlése**, 2002 október 8-10, Balatonfüred.
  18. Kósa R.; Juhász R.; Bódai, V.; Szakács Gy.: Lipáztermelő termofil fonalgombák szurovizsgálata szilárd fázisú fermentációban **Magyar Mikrobiológiai Társaság 2002 évi nagygyűlése**, 2002 október 8-10, Balatonfüred.
  19. Bódai, V.; Peredi, R.; Bálint, J.; Novák L.; Poppe, L.; Szakács, Gy.: Termofil fonalgombák hidroláz (lipáz) aktivitásának vizsgálata; **II. Magyar Mikológiai Konferencia, 2002**. május 29-31. Szeged.
  20. Kmecz, I.; Simándi, B., Poppe, L.; Renner, K.; Bódai, V.; Csajági, Cs.: Enzimkatalizált észterezési és hidrolitikus reakciók vizsgálata Szuperkritikus széndioxidos közegben **Szuperkritikus oldószerek analitikai és műveleti alkalmazása konferencia**, BME, 2002. május 23.
  21. Bódai, V., Poppe, L., and Szakács, G.: Hydrolases from thermophilic filamentous fungi. **BioTrans 2001**, 2001. szeptember 2-7. Darmstadt, Germany.
  22. Bódai, V.; Peredi, R.; Bálint, J.; Novák, L.; Poppe, L.; Szakács, G.: Screening of thermophilic fungi for hydrolase activity and enantiotopic selective acylation of 2-substituted-1,3-diols. **International Conference on New Horizons in Biotechnology**, 2001. április 18-21. Trivandium, India.
  23. Szakács, G.; Poppe, L.; Bódai, V.; Peredi, R.; Bálint, J.; Novák, L.: Screening of thermophilic fungi for hydrolase activity and enantiotopic selective acylation of 2-substituted-1,3-diols., **Pacificchem 2000**, 2000. december 9-14. Honolulu, Hawaii.
  24. Bódai, V.; Peredi, R.; Bálint, J.; Novák, L.; Poppe, L.; Szakács, Gy.: Termofil fonalgombák hidroláz aktivitásának mérése és tesztelése a 2-aciloxi-1,3-propándiolok enantiotóp szelektív acilezésénél **IX. Fermentációs Kollokvium, 2000**. október 5-8. Debrecen.

25. Bócai, V.; Peredi, R.; Bálint, J.; Novák, L.; Poppe, L.; Szakács, Gy.: Termofil fonalalgombák hidroláz aktivitásának mérése és tesztelése a 2-aciloxi-1,3-propándiolok enantiotóp szelektív acilezésénél **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** 2000. augusztus 23-27. Keszthely.
26. Bócai, 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 1999** augusztus 15-19., Németország, Berlin.

#### **4. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBE KÖZVETLENÜL NEM ILLESZKEDO PUBLIKÁCIÓK**

27. Kmecz, I.; Simándi, B.; Poppe, L.; Renner, K.; Bócai, V.; Csajági, Cs.: Study of enzyme-catalyzed esterification and hydrolysis in supercritical carbon dioxide, *Olaj Szappan, Kozmetika*, **51**, **2002**, 78-80.
28. Bócai, V.; Kratky, C.; Rétey, J.; Poppe, L.: Crystallization trials and homology model for Sleeping beauty mutase of *Escherichia coli* Synthesis for Solving Biological Problems, Newcastle upon Tyne, Anglia 3 - 10 August **2002**. *ANGOL NYELVU ELOADÁS*
29. Bócai, V.; Kratky, C.; Rétey, J.; Poppe, L.: Az Sbm fehérje tisztítása, kristályosítása és homológia modellje Az MTA Terpenoidkémiai és Elemorganikus Munkabizottság szakmai előadójelentése November 23. **2001**. *MAGYAR NYELVU ELOADÁS*
30. Poppe, L.; Bócai, V.; Rétey, J.; Kratky, C.: Crystallization trials and homology model for Sleeping beauty mutase of *Escherichia coli*, Working meeting of COST, **2001-2002**, Action D21, Group 8: "Chemistry and biochemistry of the B12 coenzymes" 2001 augusztus 29-30, Firenze, Olaszország. *ANGOL NYELVU ELOADÁS*
31. Bócai V.: Kell-e nekünk biodízel? BME Ipari nyílt nap, 2001. február 28. *MAGYAR NYELVU ELOADÁS*