

Ph.D ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

TÓKE ENIKŐ RITA

KÉMIAI ÉS ENZIMATIKUS ÁTÉSZTERESÍTÉSI REAKCIÓK VIZSGÁLATA

TÉMAVEZETŐ:

DR. POPPE LÁSZLÓ

BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM

SZERVES KÉMIA ÉS TECHNOLOGIA TANSZÉK

2008

1. BEVEZETÉS

Napjainkban egyre nagyobb a fogyasztói igény olyan termékek előállítására amelyek a szervezetre nem károsak, természetes alapanyagokból készültek valamint a gyártási technológia is lehetőleg környezetbarát, vagy az egyes gyártási folyamatok melléktermékeit hasznosítja.

Az ipar számára természetesen nem közömbös egyes folyamatok kivitelezési költsége valamint a keletkező melléktermékek minősége és mennyisége sem. Ilyen esetekben általában az alapfolyamat paramétereinek megváltoztatása, katalizátorok cseréje a megfelelő eszköz, de gyakran a kísérleti megfigyelések valamint a reakció mechanizmusának mélyebb értelmezésének segítségével jutunk el a megoldáshoz.

A szerves kémia másik megoldandó feladata a mind nagyobb számú összetett, biológiailag aktív anyag gazdaságos szintézise, sztereoizomerek, királis molekulák optikailag aktív formában történő előállítása. Napjainkban ezért a királis vegyületek előállítására alkalmas szelektív szintézismódszereket intenzíven kutatják.

Ph.D munkám során olyan kémiai és enzimatiszterésítési reakciókkal foglalkoztam amelyeket az iparban már alkalmaznak, vagy olyanokkal amelyek hatékonyságuk miatt az ipar számára is megfontolandó eljárást jelenthetnek. Egy adott átészterezési folyamat kémiai vagy enzimatiszterikus megoldásának előnyeit és hátrányait részletesen elemzem, kitérve a folyamatok olyan apró részleteire is amelyek a gyártás szempontjából nem elhanyagolhatóak.

A tanulmányozott átészterésítési reakciók mindegyikénél, a kísérleti megfigyelések hasznosításával, a folyamatok molekuláris értelmezésével a reakciók optimálhatóak voltak, így ipari alkalmazásra is megfelelő eljárások születtek.

2. MÓDSZEREK

2.1. Trigliceridek alacsony hőmérsékletű báziskatalizált átészteresítési reakciójának kivitelezése:

Az alacsony hőmérsékletű átészteresítési reakciókat a trilaurin (L3) és triolein (O3) egyenlő mennyiségű kiinduló trigliceridegyén tanulmányoztam (1. ábra). Mivel a kiindulóanyagok (L3 és O3) és a termékek (L2O és LO2) különböző C atom számúak, ezért gázkromatográfiás módszerrel (GC) egyszerűen nyomon követhetőek. A trigliceridegy alapos szárítása után (kevertetés 90°C, 0,01 Hgmm) „sebességnövelőt” (2 %, ha alkalmaztam) és katalizátort (0,2 %) adtam a rendszerhez, a reakciókat argon alatt vezetem. A reakcióegyensúly beálltát, a közbeeső minták és a végső reakcióelegy analízise alapján határoztam meg.

2.2. Növényi β -szitoszterin észterezési reakciója szilárd fázisú fermentációval (SSF) előállított készítményekkel:

A sziládfázisú fermentációból származó fermentációs terméket levegőn való szárítás után közvetlenül használtam a szterinészter képzési reakcióban. Az SSF készítményt a növényi β -szitoszterin és a megfelelő sav toluolos elegyéhez adtam.. A reakció végén az enzimet kiszűrtem és a terméket oszlopkromatográfiásan izoláltam. Az szterin észterezési reakció VRK-n és GC-s módszerrel követhető nyomon

2.3. Racém alkoholok enantiomerszelektív átészterezése vinilacetáttal:

A szubsztrátum és hexán:THF:vinil-acetát 2:1:1 elegyéhez adtam a megfelelő enzimet (lipázt). Az átészterezések általában szobahőmérsékleten 1-48 óra alatt játszódnak le, az enzim kiszűrése után a termékek extrakcióval, kristályosítással vagy kromatográfia segítségével választhatóak el. A kiszűrt enzim többszöri acetonos mosással regenerálható és száradás után újra felhasználható.

2.4. Enantiomer szelektív reakciók konverziójának és a termékek enantiomer összetételének meghatározása GC-s módszerrel:

Az enantiomer szelektív reakciók konverzióját, illetve a termékek enantiomerösszetételét (*ee* %) királis kolonnával ellátott gázkromatográfiás módszerrel határoztam meg, sztenderdként mindig a kémiaileg előállított racém anyagot használva.

2.5. Optikailag tiszta anyagok enantiomer összetételének meghatározása ¹H-NMR-el shift reagens segítségével

Az enantiomer összetételt egyes esetekben ¹H-NMR-rel prazeodimium-(D-3-heptafluorobutiril-kámforát) shift reagens segítségével határoztam meg. Az optikailag aktív, vagy racém anyagok (10 mg) ¹H-NMR spektrumát CDCl₃-ban (600 μl) növekvő mennyiségű shift reagens (2-25 mg) jelenlétében vettük fel.

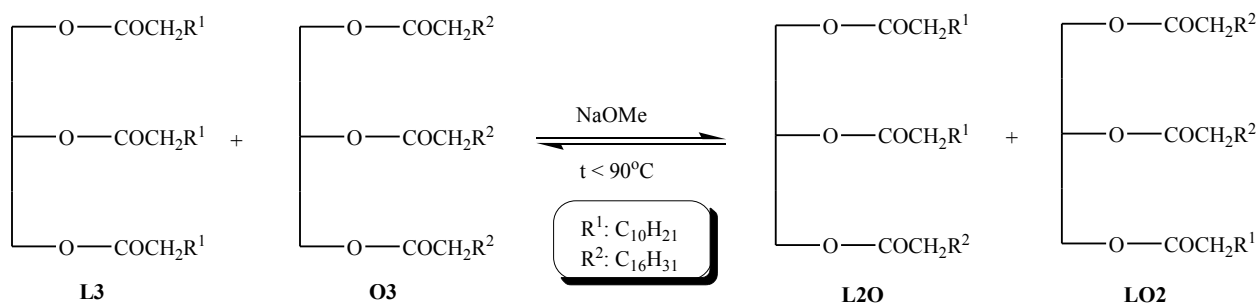
3. EREDMÉNYEK

3.1. Trigliceridek alacsony hőmérsékletű báziskatalizált átészterezésének mechanizmus vizsgálata

Izotópjelzéses technikát is alkalmazva vizsgáltam a trigliceridek alacsony hőmérsékletű báziskatalizált átészterezésének mechanizmusát.

A trigliceridek alacsony hőmérsékletű báziskatalizált átészterezésére az irodalomban javasolt három mechanizmus, a diacilglicerolát köztitermékeken keresztül lejátszódó B_{Ac}2-mechanizmus, az enolát-mechanizmus és a Claisen-kondenzációt feltételező mechanizmus közül az utolsó kizárható, mivel a nátrium-(4-etoxi-4-oxobut-2-en-2-olát), egy β-ketoészter, 90°C-on nem rendelkezik katalitikus aktivitással.

Az enolátképződést kísérleti adatok igazolják: az aceton sebességnövelő hatása, deutérium beépülés az aceton-d₆ molekulákról a trigliceridek α-pozíciójába (Dijkstra et al, 2005).



1. ábra: Trigliceridek alacsony hőmérsékletű báziskatalizált átészterítési reakciója

Az α-deutérium kicserélődés mértékének vizsgálatára végzett további tömegspektroszkópiás és ²H-NMR vizsgálatok egyértelműen bizonyítják, hogy az átészterítés reakcióját a diacilglicerolát mechanizmuson keresztül történik, a bizonyítottan létező, a

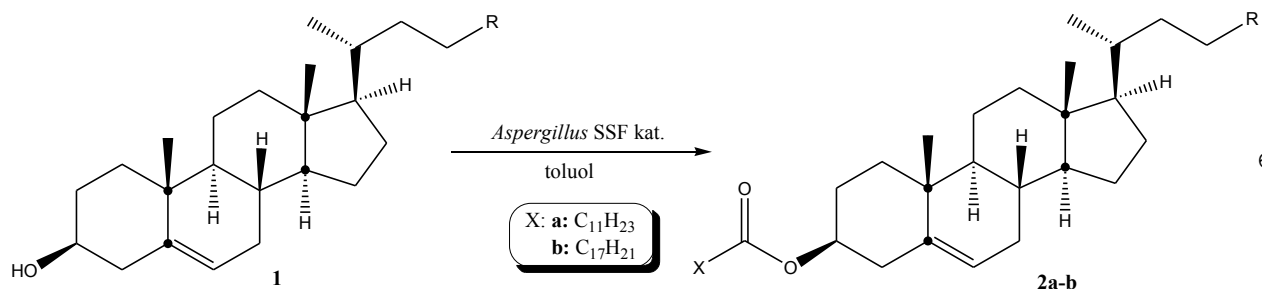
folyamatban keletkező enolátok pedig a katalizátor egy részét hosszú élettartamú, de inaktív részecskék formájában tárolja, amelyekből különböző egyensúlyi lépésekben rövid élettartamú, de aktív részecskék szabadíthatók fel (*nem publikált adatok, közleményre előkészítve*).

3.2. Új szterinészterázok előállítása szilárd fázisú fermentációval (SSF) és szintetikus alkalmazása növényi β -szitoszterin észterezési reakciójában

Szilárd fázisú fermentációval új szterinészteráz aktivitású enzim készítményeket állítottam elő, és élelmiszeripari fontosságú szterin észterek előállítására használtam. Az új *Aspergillus* SSF készítmények az eddigiéknél hatékonyabb aktivitásúak, élelmiszeriparilag teljesen biztonságosak, valamint olcsó és egyszerű előállításuknál fogva ipari felhasználásra is alkalmasak lehetnek.

A hat *Aspergillus* fajból származó 24 enzimekészítmény közül, a fermentációs körülményeket változtatva, két törzs (*Aspergillus oryzae* NRRL 6270 és *Aspergillus sojae* NRRL 6271) szterinészteráz-aktivitását sikerült hangsúlyozni a lipáz-aktivitással szemben, ezzel is – és genom analízissel is – bizonyítva, hogy az *Aspergillus* fajban a szterinészteráz-aktivitás és lipáz-aktivitás különböző enzimekhez tartoznak.

Az előállított enzimekészítmények a növényi β -szitoszterin és laurinsav észterezési tesztreakcióban 48 óra alatt 45 % konverzióval termelték a β -szitoszterin-lauril-észtert a kezdeti 240 órához képest (2.ábra).



2.ábra: Növényi β -szitoszterin észterezése *Aspergillus* SSF készítmények jelenlétében

Az előállított SSF enzimek készítmények szintetikus alkalmazhatóságát a növényi β -szitoszterin lauril és CLA (konjugált linolsav) észter preparatív léptékű előállítása bizonyítja. Ez utóbbi esetben, az *A. oryzae* NRRL 6270 izomer preferenciájára is rámutattam a 10*E*,12*Z*-CLA izomerrel szemben (Tőke et al, 2007).

3.3. A 4-aryl- és 4-heteroarylbut-3-én-2-olok kinetikus rezolválása

A racém (3*E*)-4-fenilbut-3-én-2-ol (*rac*-**3a**) és (3*E*)-4-(furán-2-il)but-3-én-2-ol (*rac*-**3b**) lipázkatalizált kinetikus rezolválását, acilezési reakcióban, vinil-acetáttal, egy termofil fonalgomba rázatott lombikos fermentációjával előállított lipáz jelenlétében, néhány mezofil fonalgomba szilárdfázisú fermentációjával előállított enzimek készítmény valamint kereskedelmi lipázok jelenlétében vizsgáltam (3.ábra). Az enantiomer szelektivitás mértékét királis kolonnával ellátott GC-vel határoztam meg.

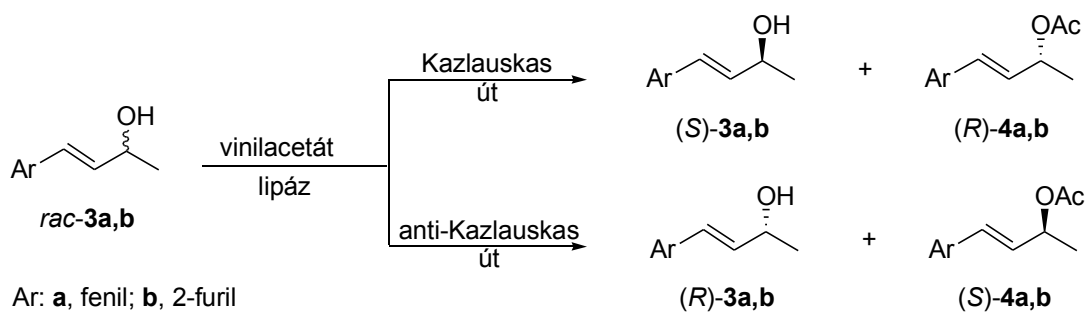
Az enzimeszt során, a már tanulmányozott vagy még nem ismert kereskedelmi lipázok többsége esetében az enantiomer szelektivitás értékek magasabbak voltak mint az irodalomban közölt értékek.

Az újonnan tesztelt enzimek készítmények többsége is hatékonynak bizonyult, ezek közül a BUTE-3b (*Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*) és SSF-9 (*Gliocladium catenulatum* NRRL 1093)

enzimkészítmények emelkednek ki, amelyek magasabb enantiomer szelektivitással és nagyobb konverzióval vezették a reakciót, mint a legjobb kereskedelmi enzimek.

A racém szekunder allil-alkohol 4-helyzetében a fenilcsoport helyettesítése egy hasonlóan nagy, de polárisabb furán-2-il-csoportra (*rac-3b*) jelentős enantiomer szelektivitás csökkenést okozott mind a kereskedelmi mind a sajátkészítésű lipázok körében.

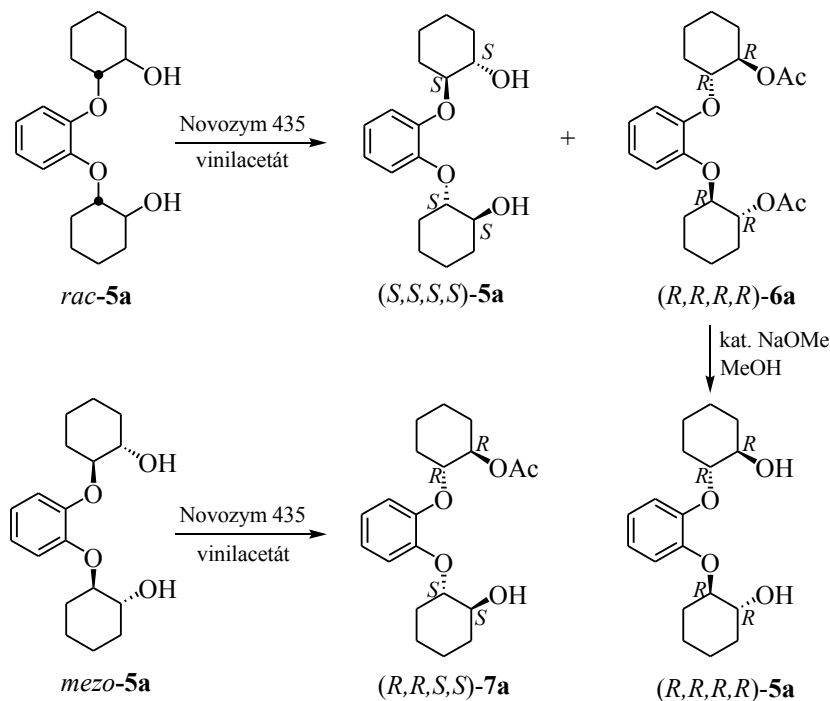
Míg a tesztelt kereskedelmi lipázok és a sajátkészítésű enzimek többsége magas, ám “Kazlauskas típusú” szelektivitást mutatott, addig néhányan a saját enzimkészítményeink közül “anti-Kazlauskas típusú” enzimnek bizonyult, és fordított szelektivitással működött (Szigeti et al, 2008).



3.ábra: A racém (3*E*)-4-fenilbut-3-én-2-ol (*rac-3a*) és (3*E*)-4-(furán-2-il)but-3-én-2-ol (*rac-3b*) lipázkatalizált kinetikus rezolválása

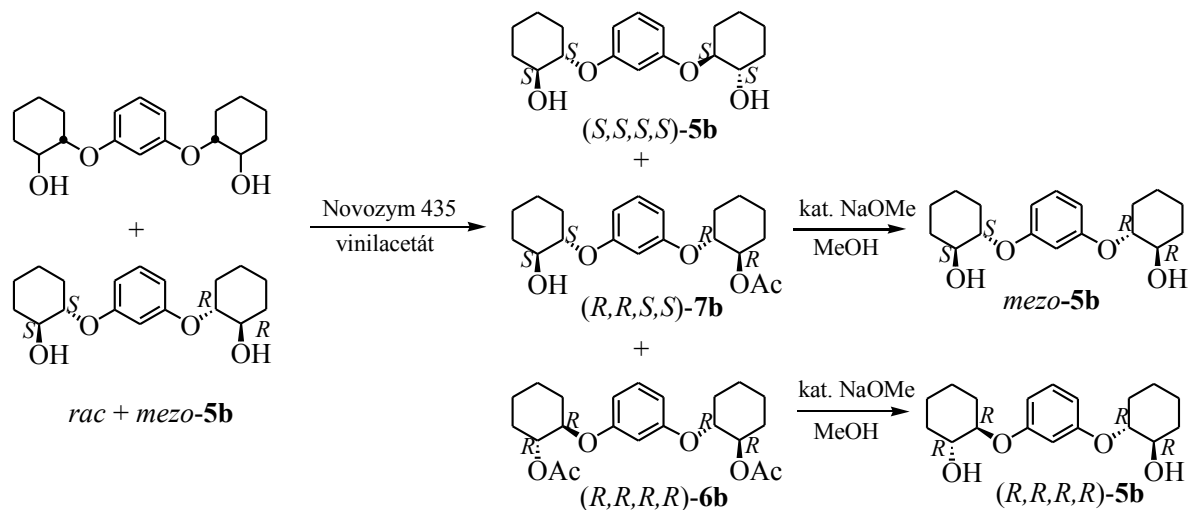
3.4. A 2,2'-[1,2- és 1,3-fenilénbisz(oxi)]diciklohexanolok lipáz katalizált enantiomer és diasztereomer elválasztása

Magas sztereoszelektívusú enzim által katalizált acilezési reakciót használtam az 2,2'-[1,2- és 1,3-fenilénbisz(oxi)]diciklohexanolok enantiomer és diasztereomer elegyének szétválasztására. A Novozym 435 nevű kereskedelmi enzim nagy sztereoszelektivitással reagált el a racém, illetve a mezo-diasztereomerek (*R,R*)-konfigurációjú *transz*-ciklohexándiol részével.



4.ábra: A racém és mezo 2,2'-[1,2-fenilénbisz(oxi)] diciklohexanol *rac*-**5a** és *mezo*-**5a** enantiomer szelektív acilezése

A racém 2,2'-[1,2-fenilénbisz(oxi)] diciklohexanol *rac*-**5a** Novozym 435 katalizált enantiomer szelektív acetilezése virtuálisan enantiomertiszta (*S,S,S,S*)-**5a** diolt (*ee* 96,5 %) és (*R,R,R,R*)-**6a** diacetátot eredményezett. Az (*R,R,R,R*)-**6a** enzimátikus hidrolízise enantiomertiszta (*R,R,R,R*)-**5a** diolhoz (*ee* >99 %) vezetett. A mezo diasztereomer *mezo*-**5a** enantiotóp szelektív acetilezése során, kizárólagosan az (*R,R,S,S*)-**7a** monoacetát keletkezett (*ee* >99 %) (4.ábra).



5.ábra: A 2,2'-[1,3-fenilénbisz(oxi)] diciklohexanol *rac*-5b + *mezo*-5b sztereomerjeinek előállítása

A 2,2'-[1,3-fenilénbisz(oxi)] diciklohexanol *rac*-5b + *mezo*-5b sztereomerkeverék szétválasztását, egy lépésben, a Novozym 435 által katalizált enzimátikus acilezésével oldottam meg (5.ábra). A reakcióban enantiomertiszta diol (*S,S,S,S*)-5b (*ee* >98%) és diacetát (*R,R,R,R*)-6b keletkezett a *rac*-5b-ből, valamint a *mezo*-5b (*R,R,S,S*)-7b monoacetáttá alakult (5.ábra).

A 2,2'-[1,2-fenilénbisz(oxi)]diciklohexanol *rac*-5a molekula mechanikai modellezése egyértelműen igazolta az enzim (*R,R*) sztereopreferenciáját, mivel gyakorlatilag csak ez a térbeli elrendeződés kerülhet az aktív centrum közelébe ütközés nélkül. A szokatlanul magas reakcióidő magyarázatára azt találtam, hogy a reakció során a diciklohexanol molekula az energetikailag kedvezőbb *transz*-diekvatoriális helyzetből a sokkal kedvezőtlenebb *transz*-diaxiális helyzetbe megy át (Tőke et al, 2006).

4. KÖZLEMÉNYEK

I. A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények és előadások

1. DIJKSTRA, A.J.; TŐKE, E. R.; KOLONITS, P.; RECSEG, K.; KÖVÁRI, K.; POPPE, L.: The Base-Catalysed, Low-Temperature Interesterification Mechanism Revisited, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 107, **2005**, 912 – 921.

(I.F.: 0.92)

2. TŐKE, E. R.; KOLONITS, P.; NOVÁK, L., POPPE, L.: Lipase mediated enantiomer and diastereomer separation of 2,2'-[1,2-and 1,3-phenylenebis(oxy)]dicyclohexanols, *Tetrahedron: Asymmetry*, 17, **2006**, 2377 – 2385.

(I.F.: 2.38)

3. TŐKE, E. R., NAGY, V.; RECSEG, K.; SZAKÁCS, GY.; POPPE, L.: Production and application of novel sterol esterases from *Aspergillus* strains by solid state fermentation, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 84, **2007**, 907-915.

(I.F.: 1.29)

4. SZIGETI, M.; TŐKE, E. R.; TURÓCZI, M.C.; NAGY, V.; SZAKÁCS, GY.; POPPE, L.: Lipase-catalysed kinetic resolution of 4-aryl- and 4-heteroarylbut-3-en-2-ols, *Issue in Honor of Prof Csaba Szántay, Arkivoc*, (iii), **2008**, 54-65.

(I.F.: 0.69)

5. SZATZKER, G.; PILBÁK, S.; TŐKE, E.R.; BÓDAI, V.; POPPE, L.: Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B reaction: transition states calculated by QM/MM methods, *30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, FEBSJ.*, 272, **2005**, 114.

6. TŐKE, E. R.; SZATZKER, G.; HUSZTHY, P.; POPPE, L.: Preparation of Highly Enantiopure Bis-Cyclohexanediol Derivatives Using Enzymatic Methods, *10th International Conference of Chemistry*, (ISBN 973-7840-00-3), pp 234-236, **2004** november 12-14., Kolozsvár, Románia. KONFERENCIA KIADVÁNY

7. TŐKE E. R., NAGY V., RECSEG K., SZAKÁCS GY., POPPE L.: Új szterinészterázok előállítása szilárd fázisú fermentációval, *12th International Conference of Chemistry*, (ISBN 973-7840-14-3), pp. 82, **2006** október 3-8., Csíkszereda, Románia. KONFERENCIA KIADVÁNY

8. TŐKE, E.R.; SZATZKER, G.; HUSZTHY, P.; POPPE, L.: Magas enantiomertisztaságú bisz-ciklohexándiol származékok előállítása enzimátikus módszerekkel, *XXVII. Kémiai Előadói Napok*, **2004**, október 25., Szeged, Magyarország. MAGYAR NYELVŰ ELŐADÁS
9. TŐKE, E.R., PILBÁK, S., SZATZKER, G., BÓDAI, V., POPPE, L.: Stereoselectivity of *Candida antarctica* lipase B: calculations for enantiomeric pairs of alcohols, *Molecular Modeling in Chemistry and Biochemistry, Workshop*, **2005**, április 21-23, Kolozsvár Románia. ANGOL NYELVŰ ELŐADÁS
10. PILBÁK, S., SZATZKER, G., TŐKE, E.R., BÓDAI, V., POPPE, L.: Stereoselectivity of *Candida antarctica* lipase B: QM/MM calculations for trans-cyclohexane-1,2-diol derivatives, *Biotrans Conference* **2005**, július 3-8, Delft, Hollandia. POSZTER
11. TŐKE, E.R.; DIJKSTRA, A.J.; KOLONITS, P.; RECSEG, K.; KÖVÁRI, K.; POPPE, L.: A trigliceridek alacsony hőmérsékletű báziskatalizált átészterezése: új mechanizmus, *MTA Terpenoidkémiai és Elemorganikus Munkabizottság előadóülése*, **2005** szeptember 9, Budapest, Magyarország. MAGYAR NYELVŰ ELŐADÁS
12. TŐKE, E.R.: A trigliceridek alacsony hőmérsékletű báziskatalizált átészterezése: új mechanizmus, *Doktoráns Konferencia, BME Vegyészmérnöki Kar*, **2006** február 7, Budapest, Magyarország. MAGYAR NYELVŰ ELŐADÁS

II. A dolgozat témájához szervesen nem kapcsolódó közlemények és előadások

1. CSAJÁGI, Cs.; SZATZKER, G.; TŐKE, E.R.; ÜRGE, L.; DARVAS, F.; POPPE, L.: Enantiomer selective acylation of racemic alcohols by lipases in continuous-flow bioreactors, *Tetrahedron: Asymmetry*, **19**, **2008**, 237-246.

(I.F.: 2.38)

2. NAGY, V.; TŐKE, E. R.; KEONG, L.CH.; SZATZKER, G.; IBRAHIM, D.; CHE OMAR, I.; SZAKÁCS, GY.; POPPE, L.: Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **39**, **2006**,

141-148.

(I.F.: 1.45)

3. KMECZ, I.; SIMÁNDI, B.; POPPE, L.; JUVANCZ, Z.; RENNER, K.; BÓDAI, V.; TŐKE, E. R.; CSAJÁGI, Cs.; SAWINSKY, J.: Lipase-catalyzed Enantioselective Acylation of 3-Benzyloxypropane-1,2-diol in Supercritical Carbon Dioxide, *Biochem. Eng. J.*, 28, **2006**, 275-280.

(I.F.: 1.22)

4. SZATZKER, G., TŐKE, E. R., NAGY, V., SZAKÁCS, Gy., POPPE, L.: Biocatalysis Using Novel Hidrolase Enzymes Produced by Solid State Fermentation, *11th International Conference of Chemistry*, (ISBN 973-7840-07-0), pp 312-315, **2005** november 11-13., Kolozsvár, Románia
KONFERENCIA KIADVÁNY

5. SZATZKER, G., TŐKE, E. R., KOLONITS, P., POPPE, L.: Using Enzyme-catalysis and Ketalization of Dihydroxyacetone with Rearrangement, for the Preparation of New, Highly Enantiopure Lactaldehyde Derivatives, *10th International Conference of Chemistry*, (ISBN 973-7840-00-3), pp 230-233, **2004** november 12-14., Kolozsvár, Románia. KONFERENCIA KIADVÁNY

6. NAGY, V., TŐKE, E.R., KEONG, L.CH., SZATZKER, G., IBRAHIM, D., CHE OMAR, I., SZAKÁCS, Gy., POPPE, L.: Production of novel highly enantioselective lipases by solid state fermentation, *Biotrans Conference 2005*, július 3-8, Delft, Hollandia. POSZTER

7. SZATZKER, G., TŐKE, E.R., KOLONITS, P., NOVÁK, L., HUSZTHY, P., POPPE, L.: Optikailag aktív mono- és bifunkciós piridin-alkoholok kemoenzimatikus előállítása, *MTA Terpenoidkémiai és Elemorganikus Munkabizottság előadóülése*, **2004**, április 2., Budapest, Magyarország.
ELŐADÁS-TÁRSSZERZŐ