



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

Biokatalízis: modellezéstől az alkalmazásig

Tézisfüzet

Szerző: Tomin Anna
Témavezető: Dr. Poppe László

Szerves Kémia és Technológia Tanszék

2010

Boros Z., Csajági C., Szatzker G., Szigeti M., Tomin A., Ürge L., Darvas F., Poppe L.: Selective biotransformations in continuous flow reactors, *15th International Conference in Chemistry*, **2009**, november 12-15. Marosvásárhely, Románia, ISSN 1843-6293 (Előadás-társszerző)

Csajági C., Szatzker G., Szigeti M., Tomin A., Tőke ER., Pilbák S., Ürge L., Darvas F., Poppe L.: Selective biotransformations in continuous flow reactors, *4th Central European Conference: Chemistry towards Biology*, **2008**, szeptember 8-11. Dobogókő, Magyarország (Előadás-társszerző)

Tomin A., Corici L., Ósze M., Wootsch A., Peter F., Poppe L.: Investigation of esterification reaction catalysed by sol-gel immobilized enzymes, *International Congress on Biocatalysis*, **2008**, augusztus 31 – szeptember 4. Hamburg, Németország, ISBN: 978-3-930400-74-4 (Poszter)

Csajági C., Szatzker G., Szigeti M., Tomin A., Tőke ER., Pilbák S., Ürge L., Darvas F., Poppe L.: Selective biotransformations in continuous flow reactors, *International Congress on Biocatalysis*, **2008**, augusztus 31 – szeptember 4. Hamburg, Németország, ISBN: 978-3-930400-74-4 (Előadás-társszerző)

Pilbák S., Holczinger A., Sztancsik K., Tomin A., Rétey J., Poppe L., Phenylalanine and tyrosine ammonia-lyase. Enzyme mechanism and stability, *International Congress on Biocatalysis*, **2008**, augusztus 31 – szeptember 4. Hamburg, Németország, ISBN: 978-3-930400-74-4 (Poszter)

Tomin A., Holczbauer T., Tőke E., Bara N., Poppe L.: L-Fenilalanin aminoxi analogonjainak új szintézise, *MKE Vegyészkonferencia*, **2008**, június 19-21. Hajdúszoboszló, Magyarország, ISBN: 978-963-9319-76-9 (Poszter)

Tomin A., Tőke E., Bara N., Poppe L.: Aminoxi csoportot tartalmazó átmeneti állapot analogonok szintézise PAL és TAL enzimekhez, *13rd International Conference of Chemistry*, **2007**, november 11-13. Kolozsvár, Románia, ISSN: 1843-6293 (Poster)

Tomin A., Kupai K., Hornyánszky G., Poppe L.: Enantiomer szelektív enzimatis acilezés vizsgálata gyűrűs alkoholokon, *Centenáriumi Vegyészkonferencia*, **2007**, május 29 – június 1. Sopron, Magyarország (Poszter)

Poppe L., Pilbák S., Tomin A., Paizs Cs., Rétey J.: A MIO-csoportot tartalmazó ammónia-liáz /aminomutáz család. Mechanizmusvizsgálat és biokatalitikus felhasználás, *Centenáriumi Vegyészkonferencia*, **2007**, május 29 – június 1. Sopron, Magyarország (Előadás-társszerző)

Tomin A.: Enantiomer szelektív enzimatis acilezés vizsgálata gyűrűs alkoholokon, *Doktoráns Konferencia, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem*, **2007**, február 7. Budapest, Magyarország (Előadás)

Pilbák S., Tomin A., Rétey J., Poppe L.: A fenilalanin ammónia-liáz vizsgálata számítógépes módszerekkel, *11th International Conference of Chemistry*, **2005**, november 11-13. Kolozsvár, Románia, ISBN: 973-7840-07-0 (Előadás-társszerző)

Poppe L., Pilbák S., Tomin A.: Conformation of the Y100 loop in phenylalanine ammonia-lyase. Loop correction of the x-ray structures by modeling and molecular dynamics, *Molecular Modeling in Chemistry and Biochemistry, Workshop*, **2005**, április 21-23. Kolozsvár, Románia (Előadás-társszerző)

Poppe L., Pilbák S., Tomin A.: A fenilalanin ammónia liáz enzim Y110 bejárati hurok és a szubsztrát kötődés modellezése, *MKE QSAR, Kemometria és Molekulamodellézési Szakcsoportok Előadói ülése*, **2005**, április 7-8. Szeged, Magyarország (Előadás-társszerző)

Pilbák S., Tomin A., Poppe L., Rétey J., Lerchl A.: Homológia modellezés enzimmechanizmusok vizsgálatára, *MTA Terpenoidkémiai és Elemorganikus Munkabizottság előadói ülése*, **2004**, április 2. Budapest, Magyarország (Előadás-társszerző)

1. Bevezetés

Napjainkban az egyik legnagyobb kihívás amivel a szerves kémia szembenéz, az egyre nagyobb számú összetett, biológiailag aktív anyag gazdaságos szintézise. A különböző iparágak (főként gyógyszeripar, emellett műanyag-, kozmetikai- és élelmiszeripar) számára egyértelműen szükségessé vált az enantiomerek nagytisztaságú előállítása és felhasználása.^{1,2,3,4} Valós veszély egy hatékony gyógyszer aktív enantiomer formája mellett a másik enantiomer jelenléte. Erre az egyik legismertebb példa az (R)-thalidomide (α -fálimido-glutarimid, Contergan), amely altató, nyugtató hatású, viszont enantiomer párja – az (S)-thalidomide – kis mennyiségben is teratogén hatású.⁵

A sztereoszzelektív szintézismódszerek iránti megnövekedett igény és a környezetvédelmi kérdések fokozatos előtérbe kerülése könnyen érthetővé teszi a "hagyományos" kémiai módszerek mellett a biokatalitikus eljárások iránti érdeklődés robbanásszerű fejlődését mind laboratóriumi, mind ipari méretekben. Az enantiomerek eltérő biológiai hatásainak és a környezeti kérdések súlyát bizonyítja, hogy a világ vezető gyógyszergyárai óriási pénzösszegeket fordítanak e kérdések megoldását kereső kutatási és fejlesztési projektekbe. A Novartis például 65M \$-os kutatás-fejlesztési szerződést írt alá a bostoni MIT-val a folyamatos üzemmódú gyógyszergyártási technológiák kifejlesztésére, vagy a Degussa, a világ egyik vezető vegyipari cége új kísérleti üzemű épített folyamatos üzemű reaktorokra alapozva. A biokatalízis jelentősére utal az enzimek ipari léptékben történő felhasználása, például a BASF (S)-1-feniletilamin vagy a DSM oxiranil metanol gyártása során.⁶

Doktori disszertációm a biokatalízis lehetőségeit felhasználva új és jól hasznosítható sztereoszzelektív folyamatok széleskörű tanulmányozására épül. Célunk volt az ammónia-liázok működésének értelmezéséhez egyrészt modellezési munkával, másrészt szubsztrát analogonok és inhibitorok szintézisével és ezen származékok enzimkinetikai vizsgálatával hozzájárulni. A nagy szelektivitású biokatalizátor-rendszerek új szintetikus alkalmazásaiként főként lipázokkal katalizált sztereoszzelektív acilezési folyamatok szakaszos és folyamatos üzemű vizsgálatát terveztük. A folyamatos üzemű kinetikus rezolválásokat tovább fejlesztve célul tűztük ki új eljárás kidolgozását racém vegyületek dinamikus kinetikus rezolválására folyamatos átfolyósos üzeműben. Végül az eddigi kísérletekben alkalmazott lipázok stabilitás, aktivitás és szelektivitás javulását eredményező szol-gél enzimrögzítési módszerrel is foglalkoztunk.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Ammónia-liázok működése

Az ammónia-liázok aromás α -aminosavak dezaminálási reakciójával α,β -telítetlen kötések kialakulását katalizálják (1. ábra). A fenilalanin ammónia-liáz (PAL, EC 4.3.1.24)⁷ a

¹ Poppe, L., Novák, L. *Biokatalízis a szintetikus szerves kémiában: A kémia újabb eredményei 1991* (Akadémia Kiadó: Budapest)

² Bull, A. T., Bunch, A. W., Robinson, G. K. *Curr. Opin. Microbiol.* **1999**, *2*, 246–251.

³ Poppe, L., Novák, L. *Selective Biocatalysis: A Synthetic Approach 1992* (VCH: Weinheim-New York).

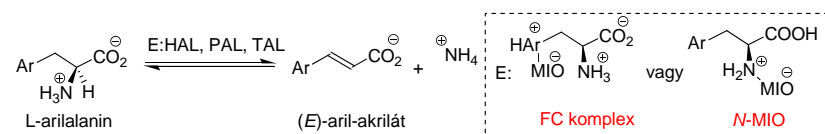
⁴ Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry* 4. kiadás (Springer: Berlin) **2004**.

⁵ Nishimura, H., Tanimura, T. *Clinical Aspects of The Teratogenicity of Drugs 1976* (American Elsevier Publishing Company - New York).

⁶ Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. *Industrial Biotransformations 2000* (Wiley-VCH: Weinheim - New York).

⁷ Ritter, H., Schulz, G. E. *Plant Cell* **2004**, *16*, 3426-3436.

növények fenilpropanoid metabolizmusának kulcsenzime, míg a vele rokon hisztidin ammónia-liáz (HAL, EC 4.3.1.3) az L-hisztidin nem oxidatív lebontását katalizálja.⁸ Ezen enzimek működési mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, két eltérő mechanizmus javaslat született. Az egyik (Rétey és munkatársai) a katalízisben fő szerepet betöltő elektrofil prosztetikus csoportnak (MIO) a szubsztrát aminosavak aromás gyűrűjére történő Friedel-Crafts típusú addícióját feltételezi (FC út).⁹ A másik (Hanson és Havir) elmélet a szubsztrát α -NH₂ csoportjának a MIO-ra történő Michael-addíciójával (N-MIO út) magyarázza a mechanizmust.¹⁰



I. ábra Az ammónia-liázok működése és lehetséges mechanizmusai

Nem természetes aromás α -aminosavak sztereoselektív előállítására történő alkalmazhatóságuk mellett az ammónil-liázoknak emberi vonatkozásokban is nagy jelentőségük van, hiányuk vagy rendellenes működésük esetén veleszületett betegségek okozói lehetnek.

2.2. Kinetikus rezolválás lipázokkal szakaszos és folyamatos üzemmódban

Az elérhető biokatalizátorok közül a hidrolázokat szelektivitásuk és hatékonyságuk teszi hasznossá olyan szintetikus biotranszformációkban,^{11,12} mint például kinetikus rezolválás, deracemiáció és dinamikus kinetikus rezolválás.¹³ Kutatási fázisban a reakciók nagy része szakaszos („batch”) üzemmódban valósul meg. Miután az enzimek szelektivitását a felhasználás módja nem befolyásolja, az átfolyós rendszerek előnyösen alkalmazhatók kinetikus rezolválások során, ezáltal jobb enzimviszanyerés és reprodukálhatóság ill. jelentős fajlagos produktivitás növekedés érhető el.¹⁴

Az észterezési reakciókat tekintve ipari körülmények savas katalízist, nagy nyomást és magas hőmérsékletet (100-300°C) igényelnek, melynek következtében alacsony szelektivitással és melléktermékek képződésével játszódnak le a reakciók. Triacilglicerol lipázokkal tisztá termékek állíthatók elő környezetkímélő módon, magas szelektivitással.¹⁵

2.3. Dinamikus kinetikus rezolválás folyamatos átfolyós üzemmódban

Rezolválás szempontjából korszerű és hatékony megoldások közé tartozik a dinamikus kinetikus rezolválás (DKR), mely tulajdonképpen egy rezolválás és egy *in-situ* racemizáció

5. Alkalmazási lehetőség

Biokatalizátorok alkalmazásával elkerülhető a mérgező, vagy a környezetet súlyosan terhelő melléktermékek képződése. A hidrolázok gyakran széles szubsztrát specifitással rendelkeznek és változatos szintézis intermediereket fogadnak el szubsztrátként, így kiválthatók velük egyes klasszikus szerves szintézis lépések.

Az átfolyós rendszerek fő előnyei a könnyű automatizálhatóság, a reprodukálhatóság, biztonság és rendszer megbízhatóság. Ezen tulajdonságok alapján a folyamatos rendszerek fejlesztése ipari alkalmazás lehetőségét is magában foglalja.

6. Közlemények

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

- I. Viergutz S., Poppe L., Tomin A., Rétey J., Mechanistic Investigation of Phenylalanine Ammonia Lyase by Using N-Methylated Phenylalanines, *Helv. Chim. Acta*, **2003**, *86*, 3601-3612. (IF: 1,861)
- II. Pilbák S., Tomin A., Rétey J., Poppe L.: The essential Tyr-containing loop conformation and the role of the C-terminal multihelix region in eukaryotic phenylalanine ammonia-lyases, *FEBS J.*, **2006**, *273(5)*, 1004-1019. (IF: 3,033)
- III. Poppe L., Tomin A., Boros Z., Varga E., Üрге L., Darvas F.: Új dinamikus kinetikus rezolválási eljárás, *Magyar Szabadalmi Bejelentés*, P0900720, **2009**.
- IV. Tomin A., Hornyánszky G., Kupai K., Dorkó Z., Üрге L., Darvas F., Poppe L.: Lipase-catalyzed kinetic resolution of 2-methylene-substituted cycloalkanols in batch and continuous-flow modes, *Process Biochem.*, **2010**, *45*, 859-869. (IF: 2,444)
- V. Tomin A., Weiser D., Hellner G., Bata Zs., Corici L., Péter F., Koczka B., Poppe L. Fine tuning the second generation sol-gel lipase immobilization with ternary alkoxy silane precursor systems, *Process Biochem.*, **2010**, nyomdában. (IF: 2,444) (doi:10.1016/j.procbio.2010.07.02)
- VI. Tomin A., Weiser D., Bata Zs., Corici L., Péter F., Poppe L. Entrapment of lipases in novel sol-gel systems, *Stud. Univ. Babeş-Bolyai Ser. Chem.*, **2010**, nyomdában. (IF: 0,086)

Egyéb közlemények:

Molnár P., Thorey P., Bánsághi Gy., Székely E., Poppe L., Tomin A., Kemény s., Fogassy E., Simandi B.: Resolution of racemic *trans*-1,2-cyclohexanediol with tartaric acid, *Tetrahedron: Asymmetry*, **19**, **2008**, 1587-1592. (2,796)

Előadások és poszterek:

Tomin A., Boros Z., Szigeti M., Weiser D., Kovács P., Darvas F., Üрге L., Poppe L.: Lipase-catalyzed asymmetric acylation of prochiral 1,3-diols in continuous-flow bioreactors, *BioTrans*, **2009**, július 5-9. Bern, Svájc (Poszter)

Tomin A., Dorkó Z., Hornyánszky G., Weiser D., Darvas F., Üрге L., Poppe L.: Lipase-catalyzed kinetic resolution of cyclic secondary alcohols in continuous-flow bioreactors, *BioTrans*, **2009**, július 5-9. Bern, Svájc (Poszter)

Tomin A., Weiser D., Bata Z., Corici L., Péter F., Poppe L.: Entrapment of lipases in novel sol-gel systems, *15th International Conference in Chemistry*, **2009**, november 12-15. Marosvásárhely, Romania, ISSN 1843-6293 (Előadás)

⁸ Poppe L., Rétey, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3668-3688.

⁹ a) Rétey, J. *Naturwissenschaften* **1996**, *83*, 439-447.; b) Langer, M., Pauling, A., Rétey, J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1464-1465.; c) Schuster, B., Rétey, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 8433-8437.

¹⁰ a) Givot, J. L., Smith, T. A., Abeles, R. H. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6341-6353.; b) Hanson, K. R., Havir, E. A. *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, *141*, 1-17.; c) Hodgins, D. S. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 2977-2985.

¹¹ Bornschauer, U. T., Kazlauskas, R. *J. Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations* **2006** (Wiley-VCH: Weinheim-New York).

¹² Ghanem, A., Aboul-Enein, H. Y. *Chirality* **2005**, *17*, 1-15.

¹³ Turner, N. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 114-119.

¹⁴ Csajági, C., Szatzker, G., Töke, E. R., Üрге, L., Darvas, F., Poppe, L. *Tetrahedron:Asymmetry* **2008**, *19*, 237-246.

¹⁵ Dossat, V., Combes, D., Marty, A. *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25*, 194-200.

A hordozó porozitásának hatását két különböző inert szilárd hordozón (Celite® 545 és szilikagél), két különböző enzimet (lipáz AK és PS) alkalmazva vizsgáltuk.²⁹ Az enzimek szol-gél mátrixba zárását a tapasztalatok alapján biner, oktiltrietoxiszilán (OcTEOS) és tetraetoxiszilán (TEOS) prekursorok 1:1 molarányú keverékkel végeztük. Az aktivitásokat két különböző enzim:hordozó aránynál vizsgáltuk (1:5 és 1:10 enzim:hordozó arányok). Lipáz AK esetében a két különböző enzim:hordozó arány nem befolyásolja a konverzió, a szelektivitás és a specifikus biokatalizátor aktivitás értékeit. Az enzim mennyiségét felére csökkentve a specifikus enzim aktivitás duplájára növekszik. Lipáz PS enzimmel ez a hatás jóval mérsékelt. A enzim optimális felületi megkötődését Celite® 545 hordozó esetében 1:5, míg szilikagél esetében 1:10 enzim:hordozó aránynál értük el.

Bármely katalitikus tulajdonságot jellemző paramétert vizsgáltuk, az általunk előállított enzimkészítmények sok esetben jóval meghaladják a kereskedelmi forgalomban lévő szol-gél immobilizált enzimek produktivitás, szelektivitás vagy konverzió értékeit.

4. Tézisek

1. Igazoltuk, hogy fenilalanin ammónia-liáz által katalizált reakcióban az *N*-metil-*L*-fenilalanin (5) gyenge szubsztát, az *N*-metil- és *N,N*-dimetil-4-nitro-*L*-fenilalaninok (6 és 7) erős kompetitív inhibitorok.^I
2. Értelmeztük a tirozin hurok-régió szerepét és katalitikusan aktív konformációját a PAL reakciójában. Molekulamechanikai / molekuladinamikai számításokkal értelmeztük a bakteriális PAL nagyobb stabilitását.^{II}
2. Kimutattuk, hogy gyűrűs racém szekunder alkoholok lipáz-katalizált acilezési reakciója során az enantiomer szelektivitást a gyűrű tagszáma, az aszimmetriacentrummal szomszédos szénatom hibridállapota és az ahhoz kapcsolódó szubsztituens mérete is befolyásolja.^{IV}
3. Bizonyítottuk, hogy lipázokkal katalizált acilezési reakció során a folyamatos üzemmód nem befolyásolja az enantiomer szelektivitást a szakaszos üzemi reakciókhoz képest. Kimutattuk, hogy a gyűrűs szekunder alkoholok kinetikus rezolválása során a folyamatos üzemmódban a biokatalizátor fajlagos termelékenysége mindig magasabb, mint szakaszos reakciókban.^{IV}
4. Egy aromás szekunder alkohol illetve amin (1-feniletanol illetve 1-feniletilamin) példájával bizonyítottuk, hogy új dinamikus kinetikus rezolválás valósítható meg alternáló sorba kötött folyamatos átfolyós üzemmódban működő reaktorok kombinációjával.^{III}
5. Eredményesen fejlesztettük tovább egyes lipázok szol-gél rendszerbe történő immobilizálását. Az általunk elkészített, új, rögzített enzimkészítmények katalitikus tulajdonságai meghaladják a kereskedelmi forgalomban kapható hasonló módon rögzített biokatalizátorokét.^{V, VI}

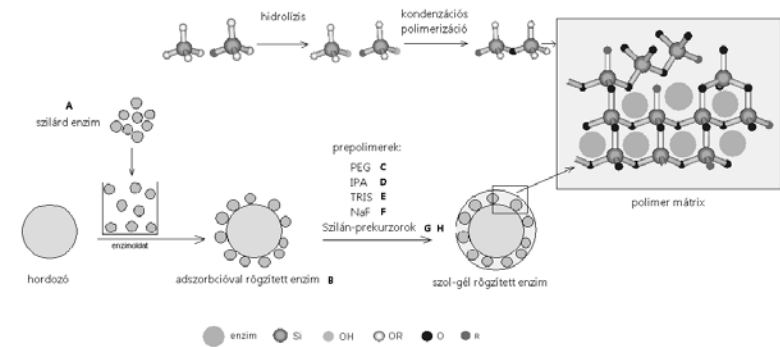
²⁹ Tomin A., Weiser D., Bata Zs., Corici L., Péter F., Poppe L. *Stud. Univ. Babeş-Bolyai Ser. Chem.*, **2010**, nyomdában.

kombinációja, amellyel a kívánt enantiomer elméletileg 100% termeléssel előállítható. Mindezt folyamatos üzemben végezve, az optimális paraméterek (például hőmérséklet, nyomás, katalizátor mennyisége, reakcióidő, keveredési paraméterek, anyagátadás) nagymértékben különbözhetnek. Az egy reaktortérben végzett eljárások csak részben optimalizálhatók (egy közös optimum eléréséig), a katalizátorok csak egyidejűleg cserélhetőek (katalizátorok élettartama nagymértékben különbözhet).

Folyamatos üzemi dinamikus kinetikus rezolvásokat oly módon végeztek, hogy az elemi lépések (rezolválás és racemizáció) az átfolyós reaktorban azonos körülmények között működtek, egy reaktortérben.^{16,18} Ebben az esetben mindkét folyamat optimalizálási lehetőségei erősen korlátozva vannak a másik által. DKR két lépésének térben szétválasztott módon történő megvalósításával szintén próbálkoztak, ám ebben az esetben csak a racemizáció során alkalmaztak átfolyós rendszert, a rezolválást a visszafolyós reaktorban végezték.¹⁹

2.4. Lipázok szol-gél immobilizálásának fejlesztése

Enzimek, egész sejtek és fehérjék hő- és tárolási stabilitásának, illetve aktivitásának növelése több úton is megvalósítható, melyek közül a szol-gél immobilizálás hatékony és egyszerű módszer (2. ábra).^{20,21,22,23}



2. ábra A szol-gél mátrix kialakulásának mechanizmusa

A folyamat első lépésében stabil kolloid rendszert, azaz szolt állítunk elő a prekursor alkoxiszilánok sav- vagy báziskatalizált hidrolízise és az ezt követő kondenzációk eredményeképpen. A második lépésben ebből képződik egy még jelentős folyadékmennyiséget tartalmazó (nedves) polimer mátrix, melyből megfelelő szárítási eljárást alkalmazva alakítjuk ki

¹⁶ Itoh, N., Nakamura, M., Inoue, K., Makino, Y. *Appl. Microbiol. Biotech.* **2007**, *75*, 1249-1256.

¹⁷ Lozano, P., De Diego, T., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J. L. *Int. J. Chem. React. Eng.* **2007**, *5*, A53.

¹⁸ Truppo, M. D., Pollard, D. J., Moore, J. C., Devine, P. N. *Chem. Eng. Sci.* **2008**, *63*, 122-130.

¹⁹ Roengpithya, C., Patterson, D. A., Livingston, A. G., Taylor, P. C., Irwin, J. L., Parrett, M. R. *Chem. Comm.* **2007**, 3462-3463.

²⁰ Hench, L. L., West, J. K. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 33-72.

²¹ Avnir, D., Braun, S., Lev, O., Ottolenghi, M. *Chem. Mater.* **1994**, *6*, 1605-1614.

²² Avnir, D. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 328-334.

²³ Gill, I. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 3404-3421.

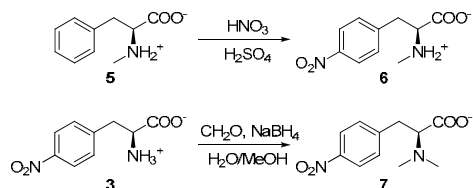
a szol-gél fázis végső állapotát (2. ábra). E technikát kutatócsoportunk sikeresen fejlesztette tovább.²⁴

3. Eredmények

3.1 Az ammónia-liázok működésének értelmezése kísérleti és számítási kémiai módszerekkel

E munka célja volt a PAL aktív helyén kovalensen kötődő szubsztrát analogonok ill. inhibitorok szintézise és ezen származékok enzimkinetikai vizsgálata a mechanizmus működésének tanulmányozása céljából.

Az *N*-metil-L-fenilalanin (5), *N*-metil-4-nitro-L-fenilalanin (6) és az *N,N*-dimetil-4-nitro-L-fenilalanin (7) előállítását nitrálással ill. redukzív alkilezéssel végeztük (3. ábra).



3. ábra *N*-Metil-4-nitro-L-fenilalanin (6) és az *N,N*-dimetil-4-nitro-L-fenilalanin (7) szintézise

Az *N*-metil-L-fenilalanin (5) gyenge szubsztrátnak, az *N*-metil- és *N,N*-dimetil-4-nitro-L-fenilalaninok (6 és 7) erős kompetitív inhibitorok mutatkoztak.²⁵ Bár az enzimkinetikai érdekes eredményeket szolgáltatottak, azonban ezek nem perdöntöek a mechanizmus tekintetében.

A PAL szerkezetét és működését molekulamechanikai / molekuladinamikai számításokkal is vizsgálni kívántuk.²⁶ Feltételeztük, hogy az enzimen belül a katalízis szempontjából fontos régió (110-es tirozint tartalmazó hurok/loop) egy korábbiakban meghatározott petrezselyem PAL (*Pc*-PAL) kristályszerkezetben inaktív konformációt vesz fel („kifelé áll”) (4. ábra, A,B).⁷ Ezt a szerkezetet alapul véve homológia modellezéssel felépítettük, majd módosítottuk a PAL modellt úgy, hogy a „hurok-régió” az általunk aktív konformációt vegye fel („befelé áll”) (4. ábra, B). A így nyert módosított PAL szerkezet alkalmas volt arra, hogy az L-fenilalanin különböző kötődési lehetőségeit vizsgáljuk (*N*-MIO vagy *Ar*-MIO). A hurok-régió mozgékonyaságáról molekuladinamikai számításokkal is próbáltunk további adalékokhoz jutni: a *Pc*-PAL esetében a „kihajló” hurok labilis és ennek megfelelően mozgékony. Ezzel ellentétben a módosított, „behajló” hurkot tartalmazó *Pc*-PAL modellben ugyanezen régió magasabb hőmérsékleten is jóval konzerváltabbnak mutatkozott. Ez is alátámasztotta eddigi feltételezéseinket, miszerint az enzim aktív konformációja az eddig meghatározott kristályszerkezetekkel ellentétben a „behajló” forma.

kombinációival hoztuk létre a polimer hálót. A kísérletek során nyolc különböző alkiltriethoxiszilán komponenst vizsgáltunk: propilTEOS (PrTEOS), hexilTEOS (HexTEOS), oktilTEOS (OctTEOS), perfluorooktilTEOS (PFOctTEOS), decilTEOS (DecTEOS), dodecilTEOS (DodTEOS), oktadecilTEOS (OctdTEOS) és fenilTEOS (PhTEOS). Szilárd hordozóval történő együtt-rögzítéssel az egységes szemcseméret eloszlás megmarad és a rögzített enzim fajlagos enzimaktivitása jelentősen megnő. Ezért az enzimeket minden esetben Celite® 545 hordozóra adszorbeáltuk majd szol-gél rögzítettük. A hordozó és a lipáz mennyiségét 10:1, 10:2.5, 10:5, 10:7.5 és 10:10 arányokban változtattuk. Az elkészült preparátumokat pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM) vizsgáltuk. A gázkromatográfiás analízis alapján az 10:1 hordozó:enzim arány az optimális, melyet a elektronmikroszkópos felvételek is alátámasztanak.

A biokatalizátorokat a legegyszerűbb aromás szekunder alkohol, racém 1-feniletanol (*rac*-20a) kinetikus rezolválási reakciójával teszteltük. Összehasonlításként egy alacsonyabb szelektivitással átalakítható alifás szekunder alkohol, a 2-heptanol (*rac*-35) acilezési reakcióját is vizsgáltuk. Az eredmények értékelésénél referenciaként minden esetben a kereskedelmi forgalomban elérhető szabad és szol-gél rögzített lipázok illetve a hordozó nélküli szol-gél rögzített lipázok szolgáltak. A készítmények biokatalitikus tulajdonságait a következő paraméterekkel jellemezhetjük: specifikus biokatalizátor aktivitás, specifikus enzim aktivitás, enantiomer szelektivitás és enantiomer tisztaság.

A szol-gél rögzítésnél trialkoxiszilán [R'-Si(OR)₃] komponensként leggyakrabban metoxiszilán származékokat [R'-Si(OR)₃, R= Me] alkalmaztunk. A metoxi (R= Me) és etoxi (R= Et) származékok hatása között jelentős különbség nincs, azonban az etoxiszilánok olcsóbban és a hosszabb gélesedési idejük kísérleti szempontból előnyösebb, így minden esetben etoxiszilán származékokkal dolgoztunk.

A biner rendszerek közül szelektivitás és produktivitás tekintetében a PhTEOS:TEOS=1:1 molarányú összetétel bizonyult a legjobbnak. A kétkomponensű rendszer eredményeit a terner rendszerek optimalizálásánál felhasználtuk. A háromkomponensű szol-gél mátrixok (alkilTEOS:fenilTEOS):TEOS 1:1 molarányú összetételeinek finomhangolása során az (alkilTEOS:fenilTEOS):TEOS rendszerek molarányát 0,1:0,9:1 és 0,9:0,1:1 között 0,1 tizedes léptékben változtattuk. A specifikus aktivitások tekintetében a közepes lánchosszúságú szilánkomponensek, mint hexil-, oktil-, perfluorooktiltriethoxiszilánok bizonyultak a legjobbnak. Az enantiomer szelektivitások tekintetében a hosszabb szénláncú alkilcsoportokat tartalmazó prekursorok (decil-, dodecil-, oktadecilTEOS) katalitikus tulajdonságra kifejtett hatása eredményesnek bizonyult. Mindhárom paraméter (specifikus aktivitás, biokatalizátor aktivitás, szelektivitás) acilezési reakcióra kifejtett hatásánál közös optimumot keresve a terner rendszerek esetében is egyértelműen a PFOctTEOS a legkiemelkedőbb prekursor. Célunk a finomhangoláson és az optimális összetétel meghatározásán felül a biokatalizátorok gazdaságos és költséghatékony módon történő előállítására és méretnövelésére. Katalitikus paraméterek és az ár együttes figyelembe vételével a közepes alkilcsoport-hosszúságú OctTEOS:PhTEOS:TEOS háromkomponensű rendszer tűnt a legalkalmasabb a szol-gél rögzítési módszer továbbfejlesztésére.

²⁴ Péter, F., Zarcula, C., Kiss, C., Csunderlik, K., Poppe, L. J. *Biotechnol.* **2007**, *109*, 131.

²⁵ Viergutz S., Poppe L., Tomin A., Rétey J. *Helv. Chim. Acta*, **2003**, *86*, 3601-3612.

²⁶ Pilbák S., Tomin A., Rétey J., Poppe L. *FEBS J.*, **2006**, *273(5)*, 1004-1019.

A rezolváló és racemizáló egységekből egymástól függetlenül termosztálható, különálló blokkokat képeztünk a jobb optimalizálhatóság érdekében. Ezen a rendszeren átfolytatva a racém kiindulási anyagok (*rac-20a*) illetve (*rac-33*) és az acilezőszerek oldatát a reaktorból távozó elegyen a főtermék ($c > 50\%$) az (*R*)-konfigurációjú acetát [(*R*)-**21a**], illetve acetamid [(*R*)-**34**] volt. A DKR-t 1-feniletanol (*rac-20a*) esetében minden összeállításnál CaLB és V_2O_4 racemizáló katalizátorral töltött oszlopokkal, míg 1-feniletanol (*rac-33*) esetében szintén CaLB-vel, azonban Ra-Ni racemizáló katalizátorral töltött oszlopokkal végeztük. Oldószerként hexán-etilacetát 9:1 arányú elegyét használtuk (az etilacetát ebben az esetben az acilezőszer szerepét is betölti).

Racém 1-feniletanol esetében olyan rendszert építettünk ki, melynek A_1 és A_3 rezolváló egysége három-három, míg A_2 , A_3 , A_4 egységei két-két sorba kötött CaLB-CatCartTM oszlopot (70°C) tartalmaztak; B_1 - B_4 egységeknél egy-egy V_2O_4 -CatCartTM (65°C) oszlopot használtunk. A 0,5 mL×perc⁻¹ átfolyási sebesség mellett a stacioner állapot beállta utáni frakciókat összegyűjtöttük, melyekből 10% visszamaradó (*S*)-1-feniletanol [(*S*)-**20a**] mellett melléktermékként legnagyobb mennyiségben bisz-(1-feniletil)étert izoláltunk (23%). A nyerstelem kromatográfiás tisztítása után a várt főtermék, az (*R*)-1-feniletil-acetát [(*R*)-**21a**, ee(*R*)-**21a**=94,5%] termelése 63%-nak adódott. Ennél a tesztnél az első rezolváló egység (három sorba kötött CaLB-oszlop) a többitől eltérően 30°C-ra volt termosztálva. Abban az esetben, ha ezek az egységek is 70°C-on működtek, a vártnak megfelelően csökkent enantiomer tisztaságú főterméket [(*R*)-**21a**] kaptunk (61% konverzió mellett ee(*R*)-**21a**=91,5%). A racém 1-feniletanol (*rac-20a*) végzett kísérletek tapasztalatai alapján a racém 1-feniletanol (*rac-33*) dinamikus kinetikus rezolválását is sikeresen végeztük el a sorba kötött rendszerrel. A rezolváló egységek közül az A_1 három, az $A_{2,5}$ két-két sorba kötött CaLB-oszlopot (70°C) tartalmaztak, racemizáló egységekként egy-egy Raney-nikkel-CatCartTM oszlopot (60°C) alkalmaztunk. Oldószerként hexán helyett toluol volt megfelelő, az előzetes tesztek alapján 0,2 mL×perc⁻¹ áramlási sebességet választottunk. A stacioner állapot beállta után gyűjtött frakciók feldolgozását követően főtermékként 61% (*R*)-*N*-(1-feniletil)acetamidot [(*R*)-**34**, ee(*R*)-**34**=94,5%] kaptunk. Abban az esetben, ha a rezolváló egységek 30°C-on üzemeltek, a főtermék alacsonyabb konverzióval képződött [(*R*)-**34**, 59%, ee(*R*)-**34**=96,5%].

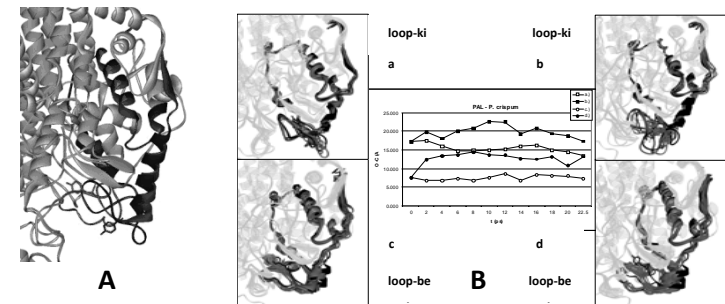
3.4 Biokatalizátor fejlesztés

A lipázok robusztus rögzítési formájaként, a kutatócsoport korábbi munkái²⁴ alapján igen alkalmasnak bizonyult szol-gél rögzítési technika további optimalizálását választottuk. A szisztematikus vizsgálatok (prekursor / hordozó / rögzítési körülmények / adalékok hatásai) összehasonlítható elvégzése érdekében a kísérleteket zömében a *Pseudomonas fluorescens* lipázon (lipáz AK) végeztük. A módszer (normál, ill. kompozit szol-gél) más lipázra (lipáz PS) és hordozóra történő kiterjesztésével is foglalkoztunk.

A szol-gél mátrix kialakítását biner és terner szilán rendszerek kialakításával végeztük.²⁸ Biner rendszerek esetében alkiltri-oxi- (alkilTEOS) és tetra-oxi-szilánok (TEOS) rögzített molarányú keverékével, míg terner rendszerek esetében alkiltri-oxi-szilán [R³-Si(OEt)₃ / alkilTEOS], feniltri-oxi-szilán [PhSi(OEt)₃ / PhTEOS] és tetra-oxi-szilán [Si(OEt)₄ / TEOS]

²⁸ Tomin A., Weiser D., Hellner G., Bata Zs., Corici L., Péter F., Koczka B., Poppe L. *Process Biochem.*, **2010**, doi:10.1016/j.procbio.2010.07.02

E számításokkal magyaráztuk az eukarióta szervezetek PAL enzimeiben a katalízisben részt nem vevő C-terminális multihélix régió szerepét és előre jeleztük az eukarióta PAL-hoz képest a bakteriális PAL nagyobb hőstabilitását.



4. ábra A) A kísérleti (fekete) és módosított (szürke) petroselyem PAL szerkezetek; B) Molekula dinamika számítások a *P. crispum* PAL modellek Tyr110-hurok régióin. A kihajló hurokkal rendelkező *P. crispum* PAL (1W27) Tyr110 régió összehasonlítása a) 300 K, b) 370 K és a behajló hurokkal rendelkező *P. crispum* PAL (1W27_{mod}) c) 300 K, d) és 370 K fokon.

A PAL katalízis további tanulmányozásához – részben biokatalitikus kinetikus rezolválást felhasználva – szintéziseket dolgoztunk ki az L-fenilalanin olyan származékainak előállítására (L-2-aminoxi-3-fenilpropionsav és az L-3-fenil-2-szulfanilpropionsav), melyek feltételezhetően az *N*-MIO intermedier analogonjai. A szintetizált analogonok enzimkinetikai és krisztallográfiai vizsgálatára a jövőben kerülhet sor, mivel más kutatócsoportokkal együttműködve több PAL klónozása és tisztítása is folyamatban van.

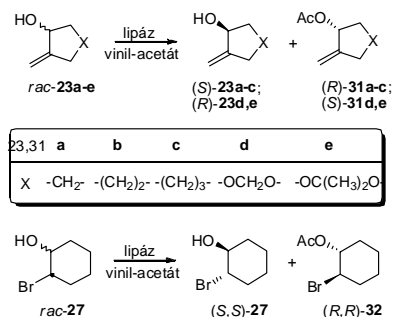
3.2 Lipáz-katalizált kinetikus rezolválások szakaszos és átfolyós rendszereken

Célunk volt új ciklusos allil-alkoholok (2-metilén-ciklopentán-1-ol, *rac-18a*; 2-metilén-ciklohexán-1-ol, *rac-18b*; 2-metilén-cikloheptán-1-ol, *rac-18c*; 6-metilén-1,3-dioxepán-5-ol, *rac-18d*; 2,2-dimetil-6-metilén-1,3-dioxepán-5-ol, *rac-18e*; *transz*-2-brómciklohexán-1-ol, *rac-20*) előállítása és a különböző szekunder alkoholok gyűrű méretének, illetve jellegének a lipáz katalizált kinetikus rezolválásra kifejtett hatásának tanulmányozása szakaszos és folyamatos üzemmódban (5. ábra).²⁷

Mivel korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az enzimreakciók szelektivitása a kivitelezés módjától nem függ,¹⁴ így a folyamatos üzemi kísérletek alapjául a szakaszos módban kapott legjobb eredmények szolgáltak. A szintetikus felhasználhatóság bemutatására a legjobbnak bizonyult enzim-szubsztrát párokkal a kinetikus rezolválást preparatív léptékben is megvalósítottuk szakaszos és folyamatos üzemmódban. A szakaszos üzemi észterezési reakciókat szobahőmérsékleten hajtottuk végre, acil-donorként vinil-acetátot, reakcióközegként hexán-THF 2:1 arányú elegyét és 1:1 enzim:szubsztrát arányt alkalmazva. A folyamatokat produktivitás (*r*) / enantiomer szelektivitás (*E*) szempontjából vizsgáltuk.

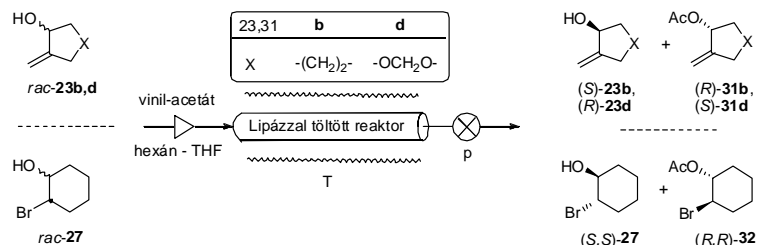
²⁷ Tomin A., Hornyánszky G., Kupai K., Dorkó Z., Úrge L., Darvas F., Poppe L. *Process Biochem.*, **2010**, *45*, 859-869.

A legmagasabb szelektivitásokat az öt- és hattagú cikloalkanok (*rac-23a,b*) kinetikus rezolválása eredményezte. A lipázok produktivitása és enantiomer szelektivitása a gyűrű tagszámának növekedésével csökken. Ezzel szemben a heterociklusos szubsztrát (*rac-23d*) esetében produktivitás és szelektivitás növekedés volt tapasztalható. A gyűrű térkitöltését tovább növelve – *rac-23e* esetében – mind a produktivitás, mind a szelektivitás jelentős csökkenését tapasztaltuk. Összevetve a C₂-pozícióban metilén szubsztituentet tartalmazó alkoholt (*rac-23b*), az α-bróm-vegyülettel (*rac-27*), a reakciósebesség a (*rac-23b*) vegyületre nézve valamivel gyorsabb, míg a szelektivitás közel hasonló a két szubsztrátra vonatkoztatva. Az eredmények arra utalnak, hogy az enzimatis reakciók lefutására nem csak az aszimmetriacentrumhoz kapcsolódó szubsztituens mérete, hanem a szomszédos szénatom hibridállapota is komoly befolyással van.



5. ábra A gyűrűs allil-alkoholok (*rac-23a-e*) és a *transz*-brómciklohexán-1-ol (*rac-27*) lipáz katalizált kinetikus rezolválása

A folyamatos üzemű kísérleteket három racém szekunder alkohollal (*rac-23b,d* és *27*) tanulmányoztuk, kereskedelmi és saját fejlesztésű lipázok felhasználásával. A folyamatos üzemű kísérletek során X-CubeTM laborreaktort és katalizátorral tölthető, hő- és nyomásálló, rozsdamentes acél CatCartTM oszlopokat használtunk, ami lehetővé tette a nyomás- és hőmérsékletfüggés tanulmányozását is (6. ábra).



6. ábra Racém 2-metilciklohexán-1-ol (*rac-23b*), 6-metilén-1,3-dioxepán-5-ol (*rac-23d*) és *transz*-2-brómciklohexán-1-ol (*rac-27*) kinetikus rezolválása folyamatos rendszerben [P: pumpa; ~: termostálható egység; ⊗: nyomás szabályzó]

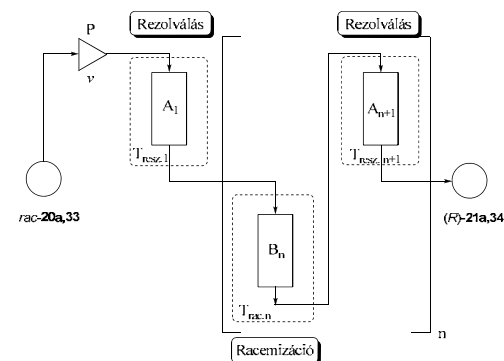
A reakciók kivitelezéséhez használt, enzimmel töltött oszlopok többször is használhatóak az aktivitás jelentősebb csökkenése nélkül. Az átfolyásos reaktorban végrehajtott kísérletek során a hőmérséklet 20-50°C között, míg az áramlási sebességet pedig 0,1-0,3 mL×perc⁻¹ között változtattuk. A módszer előnye, hogy alacsony térfogatáram esetén magas szelektivitással működő enzimmel a kinetikus rezolválás a preferált enantiomer teljes konverziójával zajlik, így néhány perc alatt analitikai célokra elegendő mennyiségű termék állítható elő. További előny, hogy a termékek tisztán keletkeznek, nincs szükség az enzim szűrésére.

Eredményeink alapján a termék enantiomer szelektivitása (*E*) és enantiomer tisztasága (*ee*) szakaszos és folyamatos reakciókban hasonló, tehát a hőmérséklet emelkedésének 20-50°C tartományon belül nincs jelentős hatása az enantiomer szelektivitásra. Ezzel szemben a produktivitás (*r*) monoton növekedése figyelhető meg a hőmérséklet függvényében. Ennek megfelelően a preparatív léptékű acilezési reakciókat 50°C-on valósítottuk meg.

Megállapítottuk, hogy folyamatos üzemmódban magasabb hőmérsékleten az áramlási sebesség növelhető, így a produktivitás növelése a szelektivitás jelentősebb változása nélkül valósítható meg.

3.3 Új dinamikus kinetikus rezolválási eljárás kidolgozása

A dinamikus kinetikus rezolválás (DKR) eltérő hőmérsékleteken ($T_{\text{rez},1} - T_{\text{rez},n+1}$ és $T_{\text{rac},1} - T_{\text{rac},n}$) am azonos átfolyási sebességgel (*v*) üzemeltetett, sorba kötött egységeket ($n=1,2, \dots, \infty$) tartalmazó, folyamatos átfolyással működő reaktor segítségével valósítottuk meg. Az A₁-A_{n+1} egységekben zajlik a rezolválás, a B₁-B_n egységekben a szubsztrát racemizációja (7. ábra). A stationer állapot beállításához a teljes holtterefogat ~8×-os átfolyása szükséges. Kísérleteinkben modellvegyületként a legegyszerűbb aromás szekunder alkoholt, az 1-feniletanol (*rac-20a*) és ennek analógiájára egy tipikus racém szekunder amint, az 1-feniletilamint (*rac-33*) választottuk. A szubsztrát (*rac-20a,33*) sztereoselektív acilezési reakcióját enzim [*Candida antarctica* lipáz B (CaLB)] katalízissal, míg a visszamaradó (*S*)-szubsztrát [(*S*)-*20a,33*] racemizációját kémiai módszerekkel valósítottuk meg.



7. ábra Folyamatos üzemű, teljes átfolyásos, sorosan kötött egységekből álló reaktorrendszer dinamikus kinetikus rezolválás megvalósításához