



A humán szénsavanhidráz II enzim szelektivitásának vizsgálata diketonok és hidroxiketonok redukálása esetén

TÖKÉS Bence,

Prof. Habil. Dr. PAIZS Csaba, Drd. BARABÁS Laura-Edit

Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutatóközpont

***Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kémia és Vegyészmérnöki kar, Arany János utca 11, 400028,
Kolozsvár, Románia***

bence.tokes@stud.ubbcluj.ro

Kolozsvár

2024

Tartalom

1.Bevezető	4
1.1.A Zöldkémia fontossága.....	4
1.2. A biokatalízis jelentősége	5
1.3. A biokatalízis formái – Enzimek	6
1.4. A kiralitás fontossága	7
1.5. Enantiomertiszta alkoholok.....	8
1.6. A humán-szénsavanhidráz II (hCAII) enzim.....	9
1.7. hCAII – karbonil vegyületek redukálására?	11
1.8. Lipázok.....	15
2. Gyakorlati rész	17
2.1. Bevezető	17
2.2. Analitikai módszerek.....	18
2.2.1. Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia	18
2.2.2 Alkalmazott módszerek	19
2.3. Enantiomertiszta hidroxiketonok előállítása.....	20
2.3.1. Enantiomertiszta 1-hidroxil-1-fenilpropán-2-on és 2-hidroxil-1-fenilpropán-1-on előállítása.....	20
2.3.2. Az 1-hidroxil-1-fenilpropán-2-on és 2-hidroxil-1-fenilpropán-1-on racemátjának kinetikus rezolválása	21
2.3.3. Oszlopkromatográfiás elválasztás	22
2.3.4. Az (S)-2-oxo-fenilpropán-1-il acetát és az (R)-1-oxo-fenilpropán-2-il acetát hidrolízise	22
2.3. Redukálási reakciók	23
2.3.2. Nátrium-borohidriddel való redukálás	23
2.3.3. Redukálás humán szénsavandhidráz II-vel, fenilszilán jelenlétében	24
3.Eredmények.....	25
3.1. 1-fenilpropán-1,2-dion redukciója	25
3.1.1. NaBH ₄ -el történő redukció.....	25
3.1.2. hCAII-vel történő redukció	27
3.2. Prekonfigurált 1-hidroxil-1-fenilpropán-2-on redukciója hCAII-vel.....	28
3.2.2. (R)-1-hidroxil-1-fenilpropán-2-on redukciója.....	28
3.2.3. (S)-1-hidroxil-1-fenilpropán-2-on redukciója	29

3.3. Prekonfigurált 2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on redukciója hCAII-vel.....	30
3.3.2. (<i>R</i>)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on redukciója	30
3.3.3. (<i>S</i>)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on redukciója	31
3.4. Reakciólépések.....	31
3.5. Eredmények kiértékelése.....	32
4. Konklúzió	33
5. Függelék	34
6. Bibliográfia.....	38

1.Bevezető

1.1.A Zöldkémia fontossága

A kémia jelentősége a modern mindennapokban elengedhetetlen, az üzemanyaggyártástól kezdve az élelmiszer- és gyógyszeriparon keresztül, a tisztítószeres, higiéniai és egyéb termékek gyártásáig a mindennapjaink szerves részét képezi. A vegyipar ezáltal jelentősen hozzájárul az életszínvonal emelkedéséhez, hiszen az műtrágyák és agrokémiai termékek biztosítják a megfelelő élelmiszerellátást, míg a gyógyszerek a várható élettartam és az életminőség emelkedésében játszanak fontos szerepet.[1]

A vegyipar emellett fontos mozgatórugója a gazdaságnak, nemrég közlemények szerint a vegyipar 5,7 billiárd dollárral járul hozzá a világ GDP-jéhez, amely az össz-GDP 7,1%-át képezi, munkahelyeket és megélhetést biztosítva 120 millió embernek. A megkérdőjelezhetetlen gazdasági fontosság mellett viszont a környezetre gyakorolt negatív hatásai a legszennyezőbb iparágak közé helyezik a vegyipart. A vegyipari szektor a legnagyobb gáz és kőolaj fogyasztó, és szén-dioxid kibocsátás tekintetében a harmadik legnagyobb alszektor,[1] amihez nagyban hozzájárulnak a globális ellátási láncok, hiszen az alapanyagok sokszor fejlődő országokból származnak, így biztosítva az alacsony termékárakat, emellett az olcsó, eldobható termékek által okozott környezeti és gazdasági károk is nagyban hozzájárulnak a vegyipar szén-dioxid kibocsátásának növeléséhez.[1]

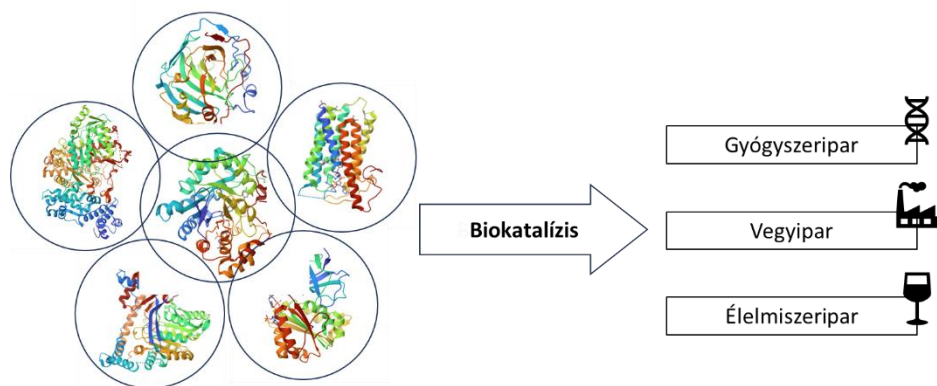
A mai globalizált világban emiatt a Zöldkémia, és a 25 évvel ezelőtt megfogalmazott 12 alapelv még mindig megállja a helyét, hiszen a kibocsátási szabályozások szigorításával a gyártási folyamatok zöldebbé tétele, a minél kevesebb hulladék és károsanyagkibocsátás fontossága egyre relevánsabb. A vegyipar mindig is fontos részét képezte a társadalmi fejlődésnek a kutatás-fejlesztésen, és olyan termékek előállításán keresztül, amelyek elengedhetetlenek a mindennapjainkban. Most, a Negyedik Ipari Forradalom hajnalán a legfontosabb cél, hogy egy fenntartható, zöld jövőt biztosítsunk az emberiségnek.[1]

1.2. A biokatalízis jelentősége

Általánosságban a biokatalízis alatt azokat a kémiai folyamatokat értjük, amelyek során enzimeket alkalmaznak szerves reakciók véghezviteléhez. Zöld technológiának minősül, mivel komplex molekulák állíthatóak elő enyhébb és fenntarthatóbb módon, mint a megfelelő kémiai előállítási módszerek esetében. Az enzimek sztereoszelektív karaktere miatt enantiomerszelektív reakciók végezhetőek el alacsony hőmérsékleten, olyan természetbarát oldószerekben mint pl. A víz.[2]

Ezen előnyök fényében, napjainkban egyre nagyobb teret hódítanak a zöld, biotechnológiai eljárások. Egyre több hagyományos, a klasszikus kémiai szintézis eszközeit alkalmazó, folyamatot helyettesítenek biokatalitikus folyamatokkal, mivel a környezetvédelmi szempontok egyre nagyobb jelentőséget kapnak az ipari technológiák fejlesztésében. Elsődleges cél a minél zöldebb, hatékonyabb technológiák fejlesztése olyan iparágakban, amelyek az előállított anyagmennyiséghez képest rengeteg hulladékot termelnek (pl: VOC-k). [3]

Erre tökéletes példa a gyógyszeripar, ahol az előállított anyag tisztaságával szemben támasztott elvárások magasak, ezáltal mind az előállítási, mind pedig a tisztítási folyamat jelentős oldószerves felhasználással és melléktermék keletkezésével jár együtt. Ezzel szemben a biokatalizátorok által katalizált folyamatok sokkal specifikusabbak, illetve nem utolsó sorban, kevesebb tisztítási lépést igénylő technológiákat feltételeznek.[3] Például a Sitagliptin antidiabetikus gyógyszer szintéziséhez használt transzamináz enzim nagyüzemű termelésben kiszorította a hagyományos ródium katalizátort, jobb konverziót, szelektivitást és alacsonyabb árakat biztosítva[4]. Így tehát a hagyományos katalízissel szemben a biokatalizátorok mellett nem csak a környezetvédelem és a fenntarthatóság szól, de a potenciális gazdasági hasznosulás is. A gyógyszeripar mellett viszont más iparágakban is fontos szerepet játszanak biokatalizátorok. A műanyagiparban például már több mint 5 éve alkalmaznak nitril-hidratázt akrilamid előállítására.[4] A kozmetikaiparban parfümösszetevők előállításában, míg az élelmiszeriparban szintetikus édesítőszer előállításában is fontos szerepet játszanak a biokatalitikus folyamatok.[4]



1. Ábra: A biokatalízis különböző felhasználási területei

1.3. A biokatalízis formái – Enzimek

Az enzimek mind-mind fehérjék, néhány katalitikus nukleinsav kivételével. Akárcsak a fehérjék, az enzimek is amidkötés által összekapcsolt aminosavak.[5] Az enzimek elsődleges szerkezetét az aminosavak kapcsolódási sorrendje határozza meg, ez az elsődleges szerkezet, míg az aminosavak tulajdonságai miatt a lánc hélixes vagy redős szerkezetet vehet fel, ez a másodlagos struktúra.[5] A harmadlagos szerkezetet a láncok térbeli elhelyezkedése határozza meg, amelyek a termodinamikailag legkedvezőbb térbeli beállást igyekeznek felvenni. Ez a háromdimenziós struktúra által alakul ki a katalitikus zseb is, ami a szubsztrát és kofaktor beködötéséért is felel. A negyedleges szerkezetet a különböző polipeptid láncok, azaz alegységek kapcsolódása határozza meg.[5]

Az enzimek katalitikus aktivitása, akárcsak a hagyományos katalizátorok esetén is, az aktiválási energia csökkentésében rejlik.[5] Az enzimekre jellemző a nagyfokú szelektivitás bizonyos vegyületcsoportok vagy optikai izomerek felé. Ha a katalitikus aktivitás bizonyos funkciós csoportot tartalmazó szpecíeszek felé irányul, akkor csoportspecifitásról, ha kötésekre vonatkozik, akkor kötéspsecifitásról, míg ha a térbeli elhelyezkedés függvénye, akkor sztereospecifitásról beszélünk.[5]

A sztereospecifitás feltétele legalább három kölcsönhatási pont megléte, amelyek szerepe lehet kötő vagy katalitikus szerep. A kötőhely az enzim és a szubsztrát megfelelő irányban való elhelyezkedését biztosítja, míg a katalitikus zsebben történő kölcsönhatások eredményeként

kötődnek be azok a funkciós csoportok, amelyek részt vesznek a reakcióban. Általában a kötőhely és a katalitikus zseb közel található egymáshoz, sokszor fedésben is helyezkednek el.[5]

Több mint 3000 enzimet azonosítottak eddig, ez a szám egyre csak nő napjainkban a fehérjemérnökség területén végzett kutatásoknak köszönhetően. Az osztályozásuk az általuk katalizált reakció szerint történik, és ez alapján 6 fő EC (Enzyme Commission) osztályba sorolhatóak[5]:

EC1. Oxidoreduktázok: oxido-redukciós reakciókat katalizálnak

EC2. Transzferázok: funkciós csoport átvitelét katalizálják

EC3. Hidrolázok: kötések hidrolízisét katalizálják

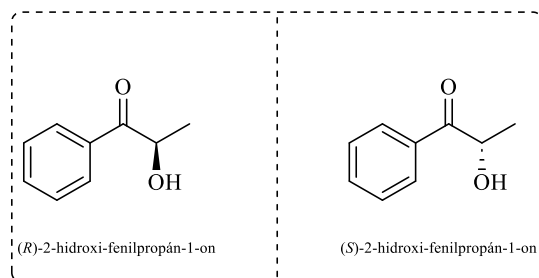
EC4. Liázok: C-C,C-O,C-N kötések hasadását katalizálják, nem redox úton

EC5. Izomerázok: molekulán belüli szerkezetváltozásokat katalizálnak

EC6. Ligázok: két molekula összekapcsolását katalizálják

1.4. A kiralitás fontossága

Kiralitás alatt a molekula azon tulajdonságát értjük, ahol a molekula térbeli elhelyezkedés alapján két aszimmetrikus, egymással fedésbe nem hozható formában van jelen, úgy hogy nem változik az atomösszetétel, az atomok közötti kötések milyensége, illetve a kötésrend sem.[6] Legtöbbször a jelenség magyarázata, hogy egy központi szénatom körül négy különböző szubsztituens található, így a szubsztituensek térbeli orientációja szerint beszélhetünk a molekula jobb vagy bal oldali verziójáról.[6]



2. Ábra: Példa (S)- és (R)-sztereoizomerekre

Diasztereomerek alatt olyan molekulákat értünk, amelyek kettő vagy kettőnél több királis központtal rendelkeznek, és olyan sztereoizomerek, amelyek nem enantiomerek, avagy egymásnak

nem tükörképei. Az enantiomerekkel ellentétben a diasztereomerek fizikai és kémiai tulajdonságai eltérőek lehetnek.[7]

Biológiai folyamatok során kiemelt jelentőséggel bírhat egy adott molekula kiralitása. Habár fizikailag és kémiailag az enantiomerpárok ugyanúgy viselkedhetnek, királis környezetben (pl. élő szervezetekben, biokémiai folyamatokban) a reaktivitásuk és a reakciótermékek teljesen eltérőek lehetnek.[6] Gyógyszerek esetében megtörténhet, hogy csak az egyik enantiomer képes a kívánt hatást elérni, míg a másik enantiomer akár káros hatású is lehet a szervezetre nézve az optikai izomerpárjához képest. Erre a legjobb példa Contergan tragédiája, amely több mint 10000 újszülöttet érintett világszerte. A thalidomid esetében az (*R*)-(+)-enantiomer nyugtató hatással rendelkezett, míg az (*S*)-(-)-enantiomer, terhesség alatt szedve, születési rendellenességeket és vetéléseket okozott, egészen a 1961-es betiltásáig.[8]

Mivel az enantiomerek fontossága a gyógyszeriparban meghatározó, a gyógyszer-szintéziseknél szignifikáns jelentőséget kap az optikai centrum(ok) bevitele a molekulába, amely egy könnyen szubsztituálható csoportot tartalmaz. Az egyik legkönnyebben cserélhető ilyen csoport, a hidroxilcsoport (-OH), ezért az enantiomertiszta alkoholok elengedhetetlen intermediereit képezik a különféle gyógyszerhatóanyagoknak.[9] Egy 2006-ban készült tanulmány szerint, amelyben a gyógyszeriparban használt reakciótípusokat és hatóanyagokat vizsgálták, a vizsgált vegyületek 54%-a tartalmaz legalább egy királis szénatomot, míg a jellemzően elvárt enantiomertöbbség 99.5%.[10]

1.5. Enantiomertiszta alkoholok

Az enantiomertiszta alkoholok kulcsfontosságú intermedierek a gyógyszer-, agro- és vegyiparban, olyan termékek előállításához, mint az ízesítőszer- vagy gyógyszerek.[9] Előállításuk történhet kémiai katalitikus úton vagy enzimatikusan, biokatalizátorok segítségével. A klasszikus előállítási útvonalak ritka, drága fémeket tartalmazó katalizátorokat feltételeznek. Napjainkban a hangsúly főleg az ipari szempontból is hatékony enzimatis technológiákra tevődik, az enyhébb reakciókörülmények és a sokkal kisebb mennyiségben keletkező, környezetre káros melléktermékek miatt. Klasszikus katalitikus útvonalon ozmium-tetroxid katalizátorral,

aszimmetrikus dihidroxilezéssel állíthatóak elő alkénekből királis diolok. Amellett viszont, hogy az ozmium-tetroxid mérgező és drága is, különböző kooxidánsokat is igényel.[9], [11]

Királis diolok előállítására a legelterjedtebb, iparilag is alkalmazott módszer a Sharpless aszimmetrikus dihidroxilezés, amely során egy alkén és ozmium-tetroxid reakciójából, egy királis kinon ligandum jelenlétében egy vicinális, optikailag aktív diol keletkezik. A reakcióhoz kevés mennyiségű OsO_4 , illetve sztoichiometrikus mennyiségű $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ oxidáns szükséges.[12] Ezen módszer hátránya, hogy habár kis mennyiségű ozmium-tetroxidot igényel, az $\text{Os}(\text{VIII})$ nagyon mérgező és drága.[12]

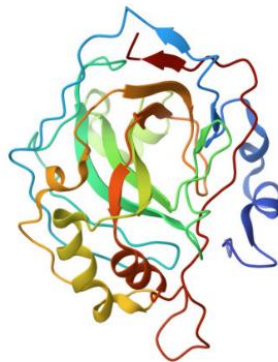
Enzimatisz uton történő enantiomertiszta alkoholok előállítására számtalan módszert dolgoztak ki az évek során, ezek közül 7 fő módszert különíthetünk el: enantioszelektív vízaddíció alkénekre, enantioszelektív aldol-addíció, ketonok sztereoszelektív kapcsolása HCN -dal, racemátok kinetikus rezolválása, epoxidok hidrolízise, C-H kötések hidroxilezése és karbonilvegyületek aszimmetrikus redukálása.[9]

A fent említett módszerek közül vicinális, királis diolok enzimatisz előállítására alkalmas módszer a dikarbonil vegyületek redukálása epoxidok hidrolízise során. Dikarbonil vegyületek redukciójára dikarbonil-reduktázok (EC 1.1.1.) a legalkalmasabbak, amelyek enzim és szubsztrátspecifititás függvényében változó sztereoszelektivitással rendelkeznek. A dikarbonil redukció konszekutív folyamat, amely során először két monohidroxi köztitermék keletkezik az első lépésben, amely majd tovább redukálódik diollá.[9]

Karbonilvegyületek redukálására főként a reduktázok alkalmasak, amelyek NADPH vagy NADH kofaktort igényelnek, viszont nemrégiben született egy zseniális tanulmány, amely rámutat arra, hogy a humán szénsavanhidráz II (hCAII) képes hatékonyan és sztereoszelektív módon katalizálni a prokirális ketonok redukcióját, fenil-szilánt használva hidridion-donorként.[9], [11]

1.6. A humán-szénsavanhidráz II (hCAII) enzim

A humán-szénsavandhidráz II (**3. Ábra**), egy, az emberi szervezetben jelen levő, cinket tartalmazó metalloenzim, amely szén-dioxidot és vizet alakít át reverzibilisen bikarbonát- és H^+ -ionná. Az emberi szervezetben megtalálható különböző szervekben és sejttípusokban, többek között a hemoglobinban. [13], [14]



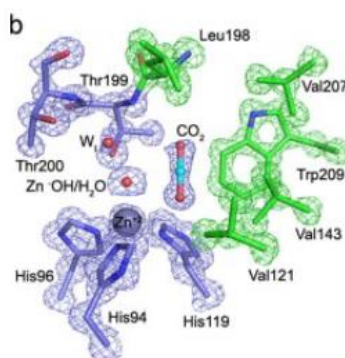
3. Ábra: A humán szénsavanhdráz II enzim szerkezete[26]

A vérben és egyéb szövetekben felelős a sav-bázis egyensúly szabályozásáért, segít a szén-dioxid szövetekből való kijuttatásáért. Több más fiziológiai folyamatban is fontos szerepet játszik, mint a légzés, kalcifikáció, tumorigenézis, pH szabályozás vagy glükoneo-, illetve lipogenézis. [13], [14]

Az enzim katalitikus zsebe egy kúp alakú kavitás alján helyezkedik el, a cink és ligandumai egy hidrofil régió szomszédságában találhatóak, amely megkönnyíti a proton és bikarbonát átvitelét. Az ebben a régióban található aminosavak, a potenciális szubsztrát behatolását irányítják a Zn^{2+} ionhoz és segítik a bikarbonát termék felszabadítását, valamint a szén-dioxid orientációját a cink által kötött oxigén felé, illetve H-kötés donorként szolgálnak egy másik fehérje felé. A másik hidrofób régió az előzővel ellentétesen helyezkedik el, ahol a CO_2 kötődik be.[14], [15]

A hidrofil régió fő elemei a His₆₄, Leu₁₉₈, Thr₁₉₈, Thr₁₉₉ aminosavmaradékok. A Thr₁₉₉ a kapu-elem, amely a cink ionhoz a szubsztrát hozzáférését biztosítja, és segíti a bikarbonát termék felszabadítását, emellett a szén-dioxid orientációjában is szerepe van a cinkhez kötött oxigénhez képest.[14]

A hidrofób rész, az előbbi régióval szemben található, itt kötődik be a CO₂ szubsztrát, a fő részei Trp₂₀₉, Val₂₀₇, Val₁₄₃ és Val₁₂₁. A cink 3 His-hez (94, 96, 119) és egy vízmolekulához kapcsolódik tetrahedrális elrendezésben. A cink-kötött aminosav maradékok H-kötés stabilizáltak a közeli aminosavak által. Fontos megjegyezni, hogy a CO₂-, illetve bikarbonát-kötött holoenzim szerkezetében kissé eltér az apoenzimétől, ugyanis például a vízmolekula a zsebben, a szén-dioxid kötőhelyén, átmozdul a szubsztrát bekerülését követően.[14]



4. Ábra: A katalitikus zseb szerkezete bekötődött szén-dioxiddal [14]

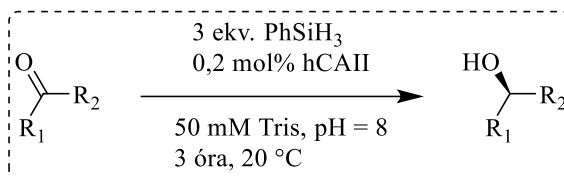
A folyamat mechanizmusát tekintve, szén-dioxid kötődik be a katalitikus zsebbe, majd a zsebben található cink-hidroxid addicionálódik a CO₂-ra, bikarbonátot képezve, majd vízzel reagálva szénsavat képez, és regenerálja a cink-hidroxidot.[13], [14], [15]

A mechanizmus első lépésében a His₆₄ segítségével megtörténik a protonleszakadás a cink-kötött vízmolekuláról, ezután a szén-dioxidra való addíció által megtörténik a bekötődés a hidrofób zsebbe. A Thr₁₉₉ segít a szubsztrát stabilizálásában és segíti a nukleofil támadást a cink-kötött OH⁻ ion által. Ezáltal kialakul egy kötött bikarbonát anion, amely ezután egy cinkkel kötött komplexet alkot, majd végső lépésben protonátvitel történik, a termék felszabadul, és a víz kerül a molekula helyére ismét. A végső protonátvitel a sebességmeghatározó lépése a reakciónak, illetve minden lépés reverzibilis.[14]

1.7. hCAII – karbonil vegyületek redukálására?

A szervezetben betöltött funkciói mellett a hCAII enzim képes enantioszelektíven ketonokat redukálni, NADPH-kofaktor nélkül, egyszerű hidridion-donorok jelenlétében (esetünkben a hidridion-transzfer a fenilszilánról a ketocsoportra történik), 99%-os hatásfokkal,

liofilizált egész sejtes enzimmal, így egy különösen hatékony enzim a ketonok redukálására. A tisztítatlan, egész-sejtes formában levő enzim előnye, hogy könnyedén, fermentációval, nagy mennyiségben állítható elő. Nem igényel összetett és drága enzimmtisztítási műveleteket, így egy gazdaságos, költséghatékony módszer, akár ipari alkalmazásokra is.[13], [16]



5. Ábra: Ketonok redukciója PhSiH_3 jelenlétében, hCAII enzim által katalizálva [13]

E metalloenzim esetében az első lépésben egy hidridion transzfere valósul meg a fenilszilánról a Zn-ionra, amely aztán megtámadja a prokirális ketonok *Re*-oldalát, és ennek eredményeként keletkezik az enantiomertiszta (*S*)-alkohol. Ezek alapján tehát kijelenthetjük, hogy a természetben egyéb funkciót betöltő metalloenzimek is képesek a karbonilcsoport sztereoszelektív redukálására egyszerű redukálószerekkel, kofaktor nélkül. Ez egy igen fontos aspektus, ugyanis így módon nincs szükség semmiféle kofaktor regenerálási rendszerre.[17]

Mivel a természetben az egyik leggyakoribb és az egyik legszélesebb körben kutatott metalloenzimek a cink-függő enzimek, mint például a hCAII, ezért nagy mennyiségben állíthatóak elő, aktivitásuk kimagasló értéket mutat (a hCAII a természetben megtalálható enzimek egyik legaktívabb képviselője), nem igényelnek drága enzimmtisztítási műveleteket, valamint képesek olyan reakciókat katalizálni, amelyek nem fordulnak elő élő szervezetekben. Fontosságuk megkérdőjelezhetetlen, hiszen olyan zöld alternatívát kínálnak, amelyek képesek helyettesíteni a drága, ritka fémeket tartalmazó katalizátorokat.[13]

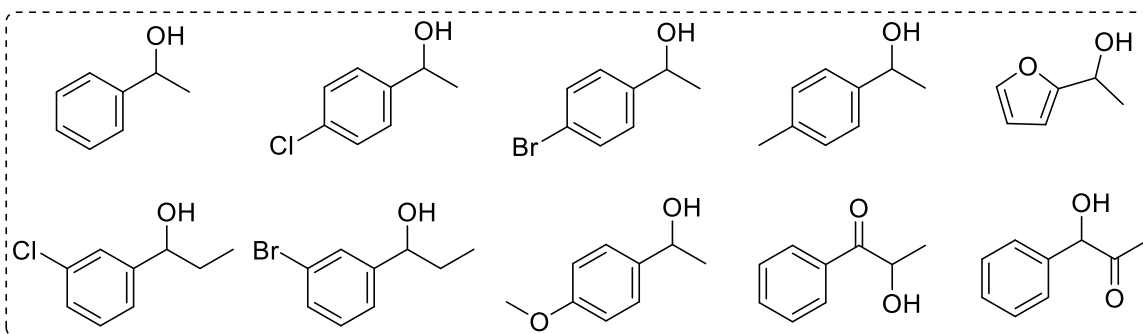
A természetben nem fordulnak elő olyan enzimatis reakciók, amelyek mononukleáris fém-hidrid intermediereken keresztül mennek végbe, habár viszonylag gyakoriak mesterséges átmenetifém katalizátoroknál. Ebből adódóan egy olyan típusú reakció, amely fém-hidrid intermediereken keresztül megy végbe, nagyban bővíti az enzimatis reakciók és felhasználásuk tárházát. Emiatt számtalan előnnyel kecsegtet, ha enzimeket olyan abiotikus reakciókban tudunk alkalmazni, amelyek nem igényelnek komplex, limitált hozzáférésű kofaktorokat, emellett olyan fémeket tartalmaznak, amelyek könnyen hozzáférhetőek. Előállításuk nagy tételben gazdaságosan is megoldható, emellett olcsóbb alternatívát kínálnak komplex, drága katalizátorok helyett. Ezért

olyan egyszerű redukálószer alkalmazása, mint például a fenilszilán, NADPH kofaktor-mentes, új lehetőségeket tár elénk a biokatalízis területén.[13]

Ketonok hCAII által katalizált redukciója esetén különböző szilánok közül a fenil-szilán bizonyult a leghatékonyabbnak (PhSiH_3), a di-, illetve monometil szubsztituált társaival szemben. A dimetil-fenilszilán esetén nem megy végbe a reakció. Ph_3SiH_3 és $\text{Ph}_3\text{SiMeH}_2$ esetén 20%-os hatásfokbeli különbség észlelhető, avagy minél hidridesebb jelleggel rendelkezik a fenilszilán, annál nagyobb a reaktivitás. Egyéb szilánvegyületek, mint alkil-szilánok vagy alkoxi-szilánok sem alkalmasak a reakcióra. Más, a humán szénsavandhidráz II-vel homológ enzimek esetében (mint a hCAVII vagy hCAXIII) is végbemegy a reakció, viszont kisebb aktivitással és alacsonyabb enantioszelektivitással. [13]

Az enzim formája nagyban nem befolyásolja a reaktivitást, mivel nem figyelhető meg lényeges hatásfokbeli különbség a tisztított szabad enzimmel és az egész-sejtes katalizátorral végzett reakció között. Következésképpen elmondhatjuk, hogy sokkal gazdaságosabb a költséges tisztítási lépéseket nem igénylő és könnyedén előállítható liofilizált sejtek alkalmazása.[13]

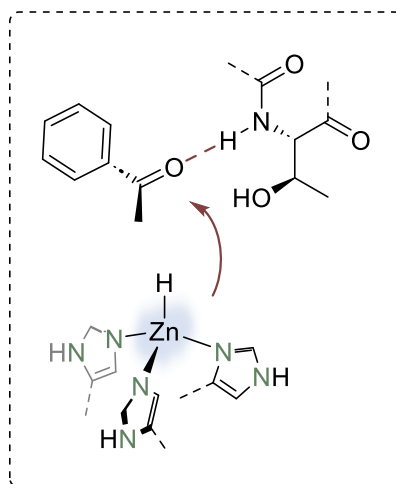
Ez az enzimátikus rendszer képes ketonok széles skálájának redukcióját katalizálni, azonban a különböző szubsztituensek befolyásolják mind a reaktivitást, mind pedig a szelektivitást. Acetofenon esetén az elektrondonor csoportok jelenléte csökkenti a konverziót, viszont a szelektivitást nem befolyásolja. Az elektronszívó csoportok jelenlétéből adódó csökkent reaktivitás a karbonilcsoport kisebb elektrofil jellegének tudható be, mivel lassítja a cink-hidrid nukleofil addícióját a hidrid vízzel való reakciójához képest. Acetofenon típusú aril-szubsztituált szubsztrátok esetén, szterikusan sok helyet igénylő csoport esetén magas konverzió és szelektivitás tapasztalható.[13]



6. **Ábra:** A hCAII enzim szubsztrátjai az abiotikus redukálási folyamatban[13]

Mechanizmusát tekintve, a hidridképződés szempontjából két lehetséges útvonal különböztethető meg a szilán hatását illetően a sztereoszelektivitásra. Az első útvonal egy negyedrendű komplex képződését feltételezi, először a cink-hidroxid asszociálódik a szilánnal, míg a másik a lépésenkénti mechanizmus, amely során először cink-hidroxid és a szilán reakciója játszódik le, majd a cink által kötött hidrid átvitele a ketocsoportra. [13]

Ha a mechanizmus egy komplex létrejöttét feltételezi, akkor a szilán karaktere befolyásolná az enantioszelektivitást a szterikus effektusok miatt. Viszont ha a redukció lépésenként történik, a szilán nincs jelen a keton redukciójánál, így az enantioszelektivitás független a szilán típusától. A metil-fenilszilán alacsonyabb reaktivitása is egybevág a lépésenkénti mechanizmussal, avagy a cink-hidrid kialakulásának alacsonyabb sebességével a sebességmeghatározó lépésben. [13]



7. **Ábra:** Lépésenkénti mechanizmus[13]

A biotikus szerepéhez képest az egyik jelentős különbség a mechanizmus során, hogy a Th₁₉₉-hez nem a szén-dioxid kötődik be szubsztrátként, hanem a karbonilcsoport, valamint hogy a cinkhez nem hidroxilcsoport kötődik be, így a nukleofil támadás nem hidroxilcsoporton keresztül megy végbe, azaz nem egy cink-bikarbonát komplexen keresztül megy végbe a protontranszfer. Ehelyett egy, a fenilszilán segítségével kialakított cink-hidrid intermediereken keresztül megy végbe a folyamat, majd a protontranszfer, és így a karbonilcsoport redukciója is.[13], [14]

Ha az acetofenon redukcióját vizsgáljuk, azonos enantioszelektivitás figyelhető meg mind fenilszilán, mind pedig a metil-fenilszilán esetében (94% ee.). Ebből következtethető, hogy a mechanizmus lépésenként történik, mivel a szilán karaktere nem befolyásolja a sztereoszelektivitást, avagy nincs jelen egyszerre, egyidőben a szubsztráttal a katalitikus zsebben.[13]

1.8. Lipázok

A lipáz enzimek besorolás szerint az E.C.3.1.1.3 osztályba sorolhatóak, avagy triacilglicerin acilhidrolázok, széles szubsztrátspecifitással rendelkeznek, viszont megkülönböztethetőek az észterázoktól, mert alapfunkció szerint az észterázok rövidlancú (<10 szénatom hosszúság) acilglicerin karboxil észtereit hidrolizálják, míg a lipázok hosszú szénlancú (>10 szénatom) zsírsav észterek hidrolízisét katalizálják. Ebből adódóan a természetben tri-, di- és monogliceridek észterkötéseit bontják, avagy zsírok lebontását zsírsavakra és glicerinre. A lipázok változó pH-függő aktivitást mutatnak, 4,0-11,0 pH között, típustól függően.[18], [19]

Termodinamikailag kedvező körülmények között a hidrolízis mellett számos előállítási reakciót katalizálnak, amelyek két kategóriába sorolhatóak: észteresítés és átészteresítés. [18]

Észteresítés során egy karbonsav és alkohol reakciójából az enzim által katalizálva egy észter és egy vízmolekula keletkezik. A tio-észterezés és amidálás hasonló az előbbihez, viszont tio- vagy amidkötés keletkezik, míg a szubsztrát amin vagy tiol. Az átészteresítés az alkoholízist, acidolízist, aminolízist és közti-észteresítést foglalja magába. Alkoholízis esetében alkohol, acidolízis esetén karbonsav, aminolízisnél amid, míg közti-észteresítés esetén a megfelelő reaktáns és észter reakciójából nyerünk egy újabb észtert és egy újabb alkoholt, karbonsavat vagy észtert. A reakció során gyakorlatilag az észterkötések újrendeződése történik.[18], [19]

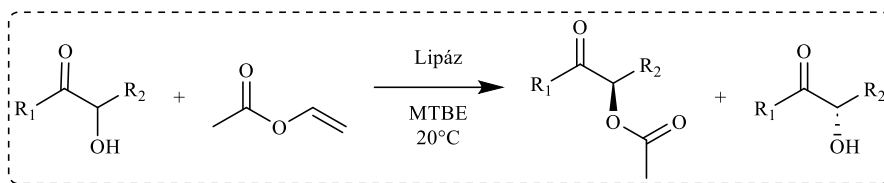
Szerkezetüket tekintve a lipázok 20-60 kDa tömegű proteinek, aktív szerin maradékot tartalmaznak, a szítusz Ser-His-Asp/Glu szerkezetében, ezek alkotják a katalitikus triádot. A lipázok emellett az α/β -hidrolázok csoportjába tartoznak, egy központi β -láncot tartalmaznak, amely tartalmazza a katalitikus zsebet. Emellett a lipázok számos diszulfid hidat is tartalmaznak, ennek köszönhető a stabilitásuk és fontos szerepet játszanak a katalitikus aktivitásukban is. A szubsztrát kötőhelye főként hidrofób elemeket tartalmaz, amelyeknek a szerepe a hidrofób szubsztráttal való kölcsönhatás megteremtése. A zseb az adott lipáz függvényében változhat alak, méret, illetve mélység szerint a benne található aminosavak függvényében. Az egyik legszélesebb körben alkalmazott *Candida antarctica* lipáz katalitikus zsebe például tölcsérszerű.[20], [21]

A fent említett katalitikus triád a lipáz enzimekre jellemző, szerin nukleofilből, aszpartát vagy glutamát savas maradékból és egy hisztidinből áll, és ezek a katalitikus aminosav-maradékok felelősek az aktív szerin karbonil atomon történő támadásáért.[18], [22]

Mechanizmus és szelektivitás

Mechanizmusát tekintve az első lépés egy acilezés, amely során a katalitikus szerinen megtörténik a hidroxilcsoport aktiválása. Ennek következtében a hidroxilcsoport megnövekedett nukleofilicitásának következtében megtámadja a szubsztrát karbonilcsoportját. Egy tetrahedrális intermedier képződik, az oxigénen negatív töltés keletkezik, majd a katalitikus zsebben az oxoanion-lyuk aminosavjai (két aminosav, amely képes H-kötéseket kialakítani, ezáltal stabilizálva a köztterméket) stabilizálják a tetrahedrális intermediert. Ezután deacilezés történik, ahol a nukleofil megtámadja az enzimet, kibocsátja a terméket és regenerálja az enzimet, ez hidrolízis esetén víz, míg alkoholízis esetében alkohol.[18], [19]

A lipázok enantioszelektivitást is mutatnak, hatékonyan képesek α -hidroxi-keetonok kinetikus rezolvására, átészterelési reakción keresztül, szubsztráttól függően *R* vagy *S*-konfigurációjú keto-észterré alakítva ezeket. Így egy kitűnő módszer enantiomertiszta hidroxi-keetonok előállítására, mégpedig az illető vegyületek racemátjának a kinetikus rezolválásán keresztül. A folyamat során az illető hidroxi-keeton hidroxilcsoportja átésztereződik, így kapva az enantiomertiszta acetátot. A reakció során enantiomertiszta formában marad a hidroxi-keeton nemreaktív enantiomerje. [23]



8. Ábra: Hidroxi-keetonok kinetikus rezolválása lipázok segítségével

Az α -hidroxi-keetonok előállítására az Amano AK és az Amano PS a legalkalmasabb lipázok, metil-*tert*-butil-éterben, szobahőmérsékleten. Fenil-hidroxi-keetonok előállítására alkalmasabb az AK, ugyanis jobb konverziót és enantioszelektivitást mutat.[23]

A *Pseudomonas* lipázok, mint az Amano AK, amely *P. fluorescens*-ből származik, az egyik leghasznosabb enzimek csoportjába tartoznak, mivel nagyon hatékonyan katalizálják a racém α -hidroxi-keetonok kinetikus rezolválását, olyan karbonil szubsztátokkal, amelyekre régebben nem volt példa. Nagyiparban inszekticid komponensek kinetikus rezolvására használják.

Enantioszelektivitás szempontjából, például az 1-hidroxi-fenilpropán-2-on esetében, *S*-(-)-keto-alkohol és *R*-(+)-keto-acetát keletkezik, míg 2-hidroxi-fenilpropán-1-on esetében a keto-alkohol *R*-(+), míg a keto-acetát *S*-(-) konfigurációjú lesz.[19], [23]

2. Gyakorlati rész

2.1. Bevezető

A gyógyszerek több, mint fele kettő, vagy kettőnél több királis központot tartalmaz, ezért különböző specifikus enantiomertiszta vegyületek előállítása fontos eleme a gyógyszeripari szintéziseknek. [10]

Ebből kiindulva kutatásunk során a hCAII enzim aktivitását és szelektivitását vizsgáltuk különböző 1-fenilpropán-1,2-dion; 1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on és 2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on típusú vegyületek esetében. Az említett hidroxi-keetonok esetében vizsgálva volt, hogy hogyan változik a szelektivitás abban az esetben, amikor az adott hidroxilcsoport prekonfigurált (enantiomertiszta hidroxi-keetonok).

Az enantiomertiszta hidroxi-keetonok előállítására egy enzimatiszta módszert alkalmaztunk, mégpedig az illető vegyületek racemátjának a kinetikus rezolválását lipázok által katalizálva. A

folyamat során az illető hidroxi-keeton hidroxilcsoportját átésztereztük, így hozzájutva az enantiomertiszta acetáthoz és hidroxi-keetonhoz. A reakció során enantiomertiszta formában marad a hidroxi-keeton nemreaktív enantiomerje. A két enantiomertiszta anyag elválasztása után (oszlopkromatográfia) a keletkező acetátot ugyanazzal az enzimmel, más körülmények között visszaalakítottuk hidroxi-keetonná. Ily módon hozzájutottunk mindkét enantiomertiszta hidroxi-keetonhoz.[23]

Ha a redukálást nem sztereoszelektíven végezzük, mind a négy diasztereomerből keletkezik. Viszont az enzimatis (hCAII enzim által katalizált) redukálás esetében leredukálódik a keletkező diasztereomerek száma az enzim szelektivitásának köszönhetően. A prekonfigurált hidroxi-keetonok esetében is vizsgáltuk a diasztereomerek eloszlását és a reakciók átalakulási fokát, hiszen a keletkező hidroxilcsoport irányultsága megfelelő információval szolgál arra vonatkozóan, hogy milyen köztitermékeken keresztül megy végbe a diketon redukálása. A redukációs reakciók során keletkezett diasztereomerek eloszlását és a reakciók konverzióit HPLC (nagy teljesítményű folyadékkromatográfia) módszer segítségével követtük nyomon, királis oszlopon való elválasztás révén.

2.2. Analitikai módszerek

2.2.1. Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia

A nagy teljesítményű folyadékkromatográfia vagy nagynyomású folyadékkromatográfia (röviden: HPLC - High-performance liquid chromatography) az oszlopkromatográfia egyik specifikus formája, amelyet elválasztás, azonosítás és mennyiségi meghatározás céljából alkalmaznak. A HPLC állófázisként egy töltetes oszlopot alkalmaz, egy pompát, amely a mozgófázist nyomja át az oszlopon és egy detektort. A retenciós idő az állófázis milyensége és a mozgófázisban található molekulák kölcsönhatásának függvénye. A módszer célja, hogy a mintában található komponensek szétváljanak a polaritás, konfiguráció, illetve a méret alapján.[24]

A HPLC módszerek típusainak a besorolása általában a rendszerben alkalmazott fázisok alapján történik.

Normál fázisú HPLC

Ez a módszer az analitok polaritásbeli különbségén alapszik, a normál fázisú HPLC módszer poláris állófázist és apoláris mozgófázist alkalmaz, a poláris analit kölcsönhatásba lép a poláris állófázissal és visszatartja azt, ez határozza meg a retenciós időt.[24]

Fordított fázisú HPLC

Ez a módszer is az analitok polaritásbeli különbségén alapszik, a fordított fázisú HPLC módszer apoláris állófázist és poláris mozgófázist alkalmaz, az analit akárcsak a normál fázis esetében kölcsönhatásba lép az apoláris állófázissal és visszatartja azt, ez határozza meg a retenciós időt.[24]

Egyéb típusok

A normál fázisú és fordított fázisú módszer a legelterjedtebb, viszont fontos megemlíteni a méretkizárásos kromatográfiát, amely méret alapján történő elválasztást feltételez; az ioncserélő kromatográfiát, amely esetén a szolutum ionjai az állófázis töltött részeihez kötődnek; illetve a bio-affinitás kromatográfia, amely során a minta komponensei a protein-ligandum reverzibilis kölcsönhatás alapján választhatóak szét.[24]

2.2.2 Alkalmazott módszerek

A kutatás során normál fázisú HPLC módszert alkalmaztunk a reakciók előrehaladása, illetve a diasztereomertöbbség nyomon követése érdekében. Mozgófázisként *n*-hexán és izopropanol keverékét alkalmaztuk 80:20, 90:10 és 95:5 (v/v) arányban az elválasztási módszer függvényében. Állófázisként különböző királis oszlopokat alkalmaztunk az *R*-(+), *S*-(-) enantiomerek és az (1*R*,2*R*)-; (1*S*,2*S*)-; (1*S*,2*R*)- és (1*R*,2*S*)-diasztereomerek elválasztása és vizsgálata céljából.

Alkalmazott módszerek

A. módszer:

Oszlop: CHIRALPAK IA, 3 μ m, 4,6 x 150 mm,

Mozgófázis összetétele: 95:5 *n*-hexán:izopropanol

Hozam: 1 ml/perc

Hőmérséklet: 10 °C

B. módszer

Oszlop: Lux Cellulose-4, 3 µm, 4,6 x 250 mm,

Mozgófázis összetétele: 95:5 *n*-hexán:izopropanol

Hozam: 0,5 ml/perc

Hőmérséklet: 45 °C

C. módszer

Oszlop: Lux Cellulose-4, 3 µm, 4,6 x 250 mm,

Mozgófázis összetétele: 85:15 *n*-hexán:izopropanol

Hozam: 0,5 ml/perc

Hőmérséklet: 20 °C

D. módszer

Oszlop: Lux Cellulose-5, 3µm, 4.6 x 150 mm,

Mozgófázis összetétele: 90:10 *n*-hexán:izopropanol

Hozam: 1 ml/perc

Hőmérséklet: 10 °C

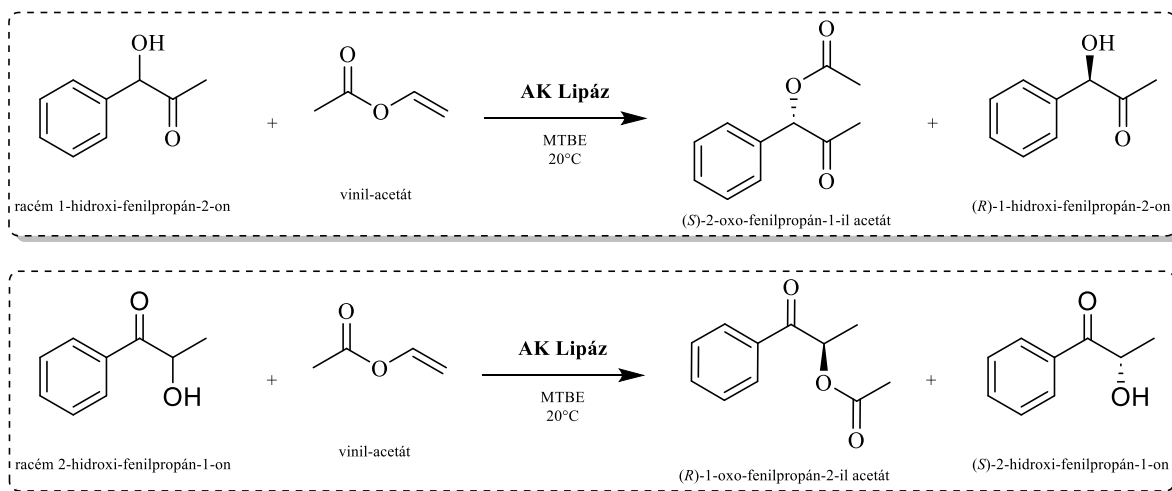
2.3. Enantiomertiszta hidroxiketonok előállítása

2.3.1. Enantiomertiszta 1-hidroxil-1-fenilpropán-2-on és 2-hidroxil-1-fenilpropán-1-on előállítása

Az illető vegyületek előállításához egy enzimátikus eljárást alkalmaztunk. Első lépésben a hidroxiketonok átészterezéssel történő kinetikus rezolválását végeztük el, amely során a racém kiinduló vegyület esetében csak az egyik enantiomer észtereződik át, míg a másik visszamarad enantiomertiszta formában. Ezt követően a hidroxiketont, illetve az acetátját szilikagélen, oszlopkromatográfiás módszerrel választottuk el. Az izolálást követően ugyanazon enzimmal, más körülmények között hidrolizáltattuk el az illető észtert, így hozzájutottunk az enantiomertiszta 1-hidroxil-1-fenilpropán-2-on; és 2-hidroxil-1-fenilpropán-1-on ellentétes konfigurációjú enantiomerjéhez is.

2.3.2. Az 1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on és 2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on racemátjának kinetikus rezolválása

A kinetikus rezolválás során az 1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on és 2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on racemátjának átészterezése történt szabad formában levő Amano AK lipáz enzim segítségével. A reakció során 10 ekvivalens vinil-acetát és AK lipáz keverékét (100-200 mg/mmol szubsztrát) adtuk hozzá a racém α -hidroxi-ketonokhoz metil-*tert*-butil-éterben. A keverék rázatása szobahőmérsékleten történt, majd a megfelelő idő eltelte után (120 óra) az enzimet szűréssel eltávolítottuk, és az oldószert vákuum alatt elpárologtattuk egy rotációs vákuumbepárló készülék segítségével.[23]



9. Ábra: Az 1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on; és 2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on AK lipáz által katalizált kinetikus rezolválása

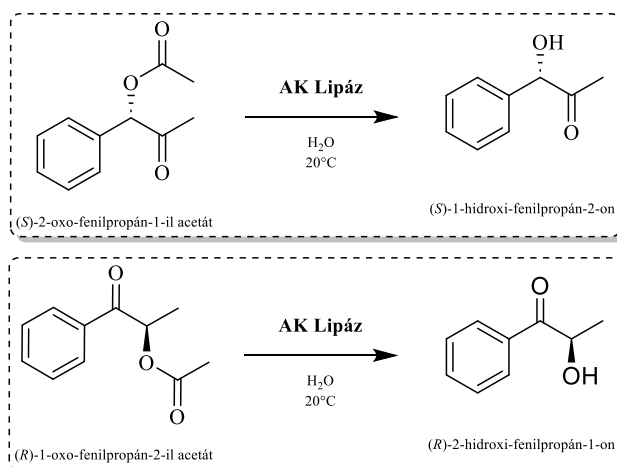
Sztereoszелеktivitás szempontjából a reakció során a két racém szubsztrátból a két ellentétes konfigurációjú hidroxi-keton fog észtereződni[23], 1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on esetében a reakció (S)-2-oxo-1-fenilpropán-1-il acetátot eredményez, míg a 2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on esetében a termék az (R)-1-oxo-fenilpropán-2-il acetát lesz.

2.3.3. Oszlopkromatográfiás elválasztás

Az (*S*)-2-oxo-fenilpropán-1-il acetát és (*R*)-1-hidroxi-fenilpropán-2-on, illetve az (*R*)-1-oxo-fenilpropán-2-il acetát és az (*S*)-2-hidroxi-fenilpropán-1-on elválasztása szilikagélen való oszlopkromatográfiás módszerrel történt, vízmentes diklórmétánt alkalmazva eluensként. Retenció szempontjából az észter eluálódik le hamarabb az oszlopról, ugyanis az acetát szubsztituens jelenléte miatt ennek kisebb a polaritása a hidroxi-ke-ton hidroxi-csoportjához képest. Az elválás nyomon követése vékonyréteg kromatográfiával történt. Az összegyűjtött frakciókat egyesítettük, majd rotációs vákuumbepárló készülékkel bepároltuk. Ily módon tehát enantiomertiszta (*S*)-2-oxo-fenilpropán-1-il acetátot és (*R*)-1-hidroxi-fenilpropán-2-ont, illetve (*R*)-1-oxo-fenilpropán-2-il acetátot és (*S*)-2-hidroxi-fenilpropán-1-ont izoláltunk.

2.3.4. Az (*S*)-2-oxo-fenilpropán-1-il acetát és az (*R*)-1-oxo-fenilpropán-2-il acetát hidrolízise

Az észterek hidrolízisét úgyszintén enzimatikusan, szabad Amano AK lipáz segítségével végeztük, viszont természetesen más körülmények között, mint az átészteresítést. A bontáshoz több különböző, immobilizált formában levő AK lipázt is kiprobáltunk (szolgél, celit, szolgél-celit), viszont az izolált, szabad formában levő enzim bizonyult a leghatékonyabbnak. A reakciók vízben, 100-400 mg/mL enzimmennyiséggel, szobahőmérsékleten voltak rázatva. A hidrolízis esetében a kihívást a megfelelő pH tartomány jelentette, ugyanis a keletkező sav hatására megváltozó kémhatás inaktíválta az enzimet, ezért a reakciók végbemenetele közben ellenőriztük a pH-t, és amikor 4-es pH alatti értéket mutatott, ammónium-karbonátot adagoltunk a rendszerhez. A reakciók végén a reakcióelegyet leszűrtük az enzim eltávolítása érdekében, az oldószert pedig vákuum alatt 40 °C-on, 60 mbar nyomáson elpárologtattuk, így hozzájutva az enantiomertiszta (*S*)-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-onhoz, illetve az (*R*)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-onhoz.

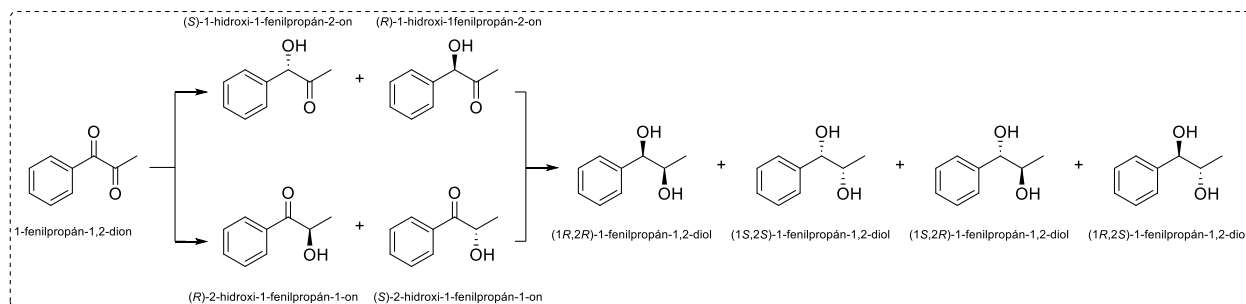


10. Ábra: (S)-2-oxo-fenilpropán-1-il acetát és (R)-1-oxo-fenilpropán-2-il acetát hidrolízise

2.3. Redukálási reakciók

2.3.2. Nátrium-borohidriddel való redukálás

Ha az 1-fenilpropán-1,2-dion redukálását nem sztereoszelektív módon, NaBH_4 -el végezzük, mind a négy diasztereomerből keletkezik, a látszólagos szelektivitást csak a sztérikus effektusok befolyásolják, így tehát az (1*R*,2*R*), (1*S*,2*S*)-diasztereomerekből kevesebb keletkezik, mint az (1*R*,2*S*) és (1*S*,2*R*) diasztereomerekből.[25]

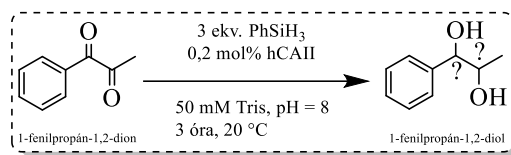


11. Ábra: 1-fenilpropán-1,2-dion redukációjából keletkező lehetséges diasztereomerek

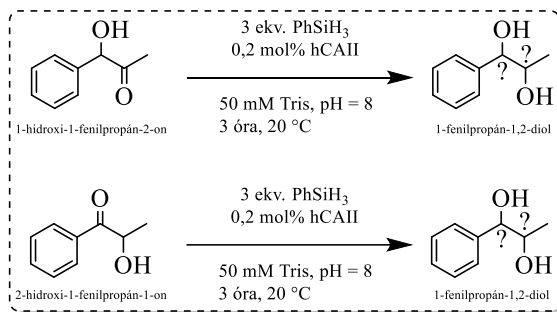
Az 1-fenilpropán-1,2-dion redukálását metanolban végeztük, kevertetés mellett, a NaBH_4 fokozatos hozzáadásával, 0 °C hőmérsékleten. A reakcióelegyről lepároltuk a metanolt, ezután vizet adtunk hozzá, majd etil-acetát:*n*-hexán elegyével extraháltuk, és bepároltuk. Más tisztítási lépések nem voltak szükségesek, mivel az átalakulás teljes volt.

2.3.3. Redukálás humán szénsavandhidráz II-vel, fenilszilán jelenlétében

Az 1-fenilpropán-1,2-dion; az (*S*)-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on; az (*R*)-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on; az (*S*)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on és az (*R*)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on enzimatisz redukciója 20 °C-on, 0,2 mol% hCAII, 10 mM szubsztrát elegyéhez történő 3 ekvivalens PhSiH₃ hozzáadásával történt 50 mM-os Tris pufferoldatban (pH 8,0), 3 óras reakcióidővel. A reakciótérfogot 1 ml volt. A reakció lejátszódása után az elegyet etil-acetát:*n*-hexán = 3:1 elegyével extraháltuk, Na₂SO₄-on szárítottuk, majd az oldószert elpárologtattuk.[13]



12. Ábra: 1-fenilpropán-1,2-dion redukálása hCAII-vel, PhSiH₃ jelenlétében



13. Ábra: 1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on; 2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on redukálása

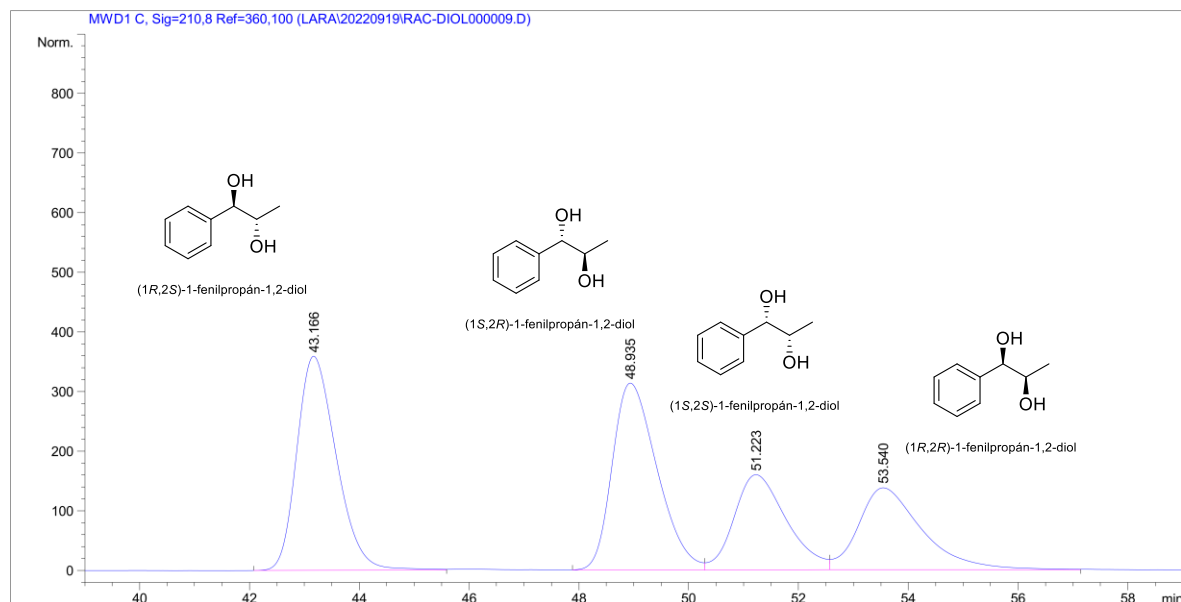
hCAII-vel, PhSiH₃ jelenlétében

A reakció során, ha 1-fenilpropán-1,2-dionból indulunk ki, a diasztereomerek aránya eltérő lesz a nátrium-borohidrides redukció során keletkezett diasztereomerek arányától az enzim szelektivitásának köszönhetően. A diketon redukciója az 1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on vagy a 2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on köztitermékeken keresztül megy végbe. A köztitermékek és a végső diasztereomerek aránya az enzim szelektivitásának a függvénye. A kutatás célja többek között ezen redukálási reakció lépéseinek és a preferált köztitermékek közötti összefüggéseknek a meghatározása volt, amelyet a prekonfigurált (*S*)-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on; (*R*)-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on; (*S*)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on és (*R*)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on vegyületek hCAII által katalizált redukciójának termékei alapján határoztunk meg.

3.Eredmények

3.1. 1-fenilpropán-1,2-dion redukciója

3.1.1. NaBH₄-el történő redukció

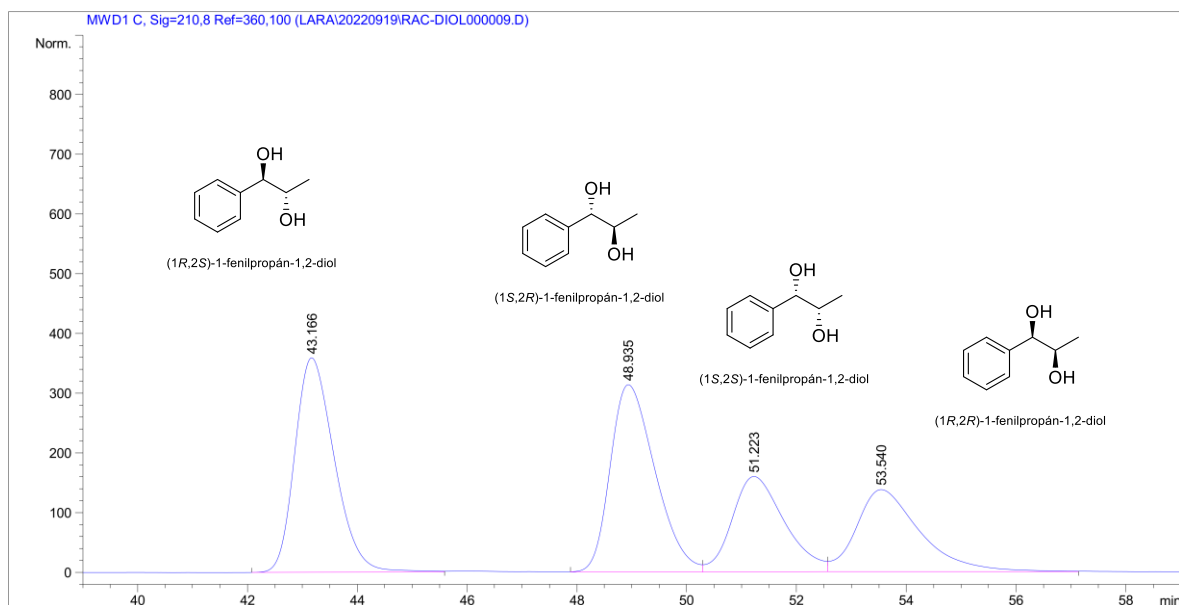


14. Ábra: Az 1-fenilpropán-1,2-dion NaBH₄-el történő redukciójának a termékeinek királis elválasztása normál fázisú HPLC **B. módszerrel**, 210 nm-en

1. Táblázat: A reakció során keletkezett diasztereomerek retenciós ideje, integrált területe, és területeik megoszlása

Anyag	Retenciós idő (perc)	Terület	Terület (%)
(1R,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol	43,166	17999,9	31,296
(1S,2R)-1-fenilpropán-1,2-diol	48,935	17821,5	30,986
(1S,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol	51,223	10588,6	18,41
(1R,2R)-1-fenilpropán-1,2-diol	53,540	11104,7	19,308

NaBH₄-el történő redukció során mind a négy diasztereomerből keletkezik, az (1R,2S) és (1S,2R)-ből nagyobb arányban a szterikus hatások miatt (**1.táblázat**).

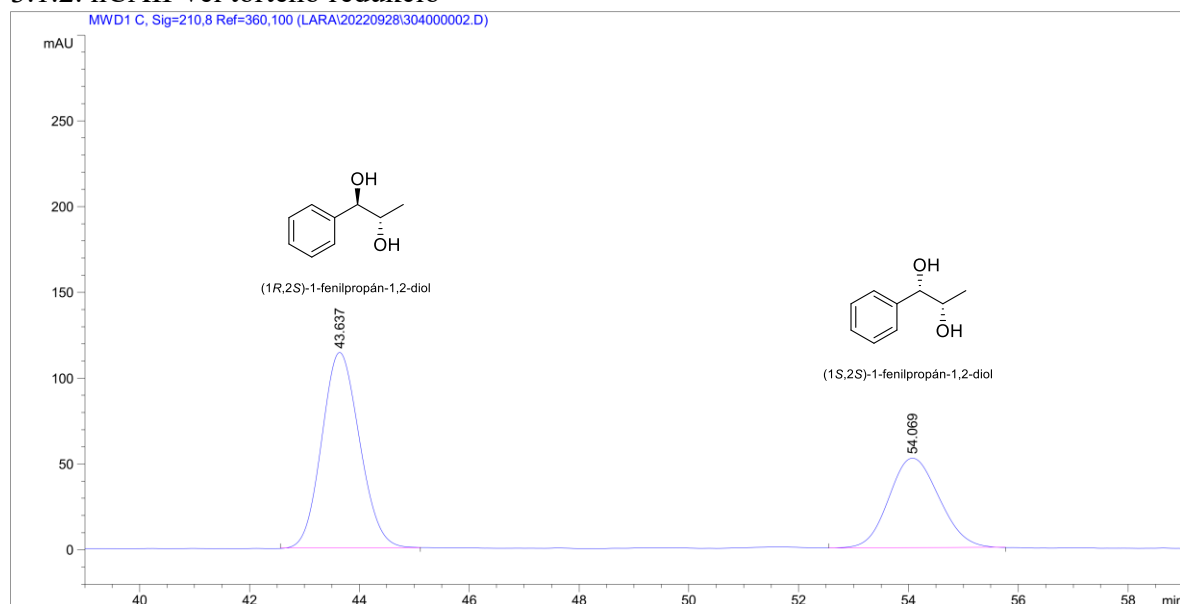


15. Ábra: Az 1-fenilpropán-1,2-dion NaBH_4 -el történő redukciójának a termékeinek királis elválasztása normál fázisú HPLC **C. módszerrel**, 210 nm-en

2. Táblázat: A reakció során keletkezett diasztereomerek retenciós ideje

Anyag	Retenciós idő (perc)
(1R,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol	14,691
(1S,2R)-1-fenilpropán-1,2-diol	16,214
(1S,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol	16,790
(1R,2R)-1-fenilpropán-1,2-diol	17,348

3.1.2. hCAII-vel történő redukció



16. Ábra: Az 1-fenilpropán-1,2-dion liofilizált egész-sejtes hCAII-vel történő redukciójának a termékeinek királis elválasztása normál fázisú HPLC **B. módszerrel**, 210 nm-en

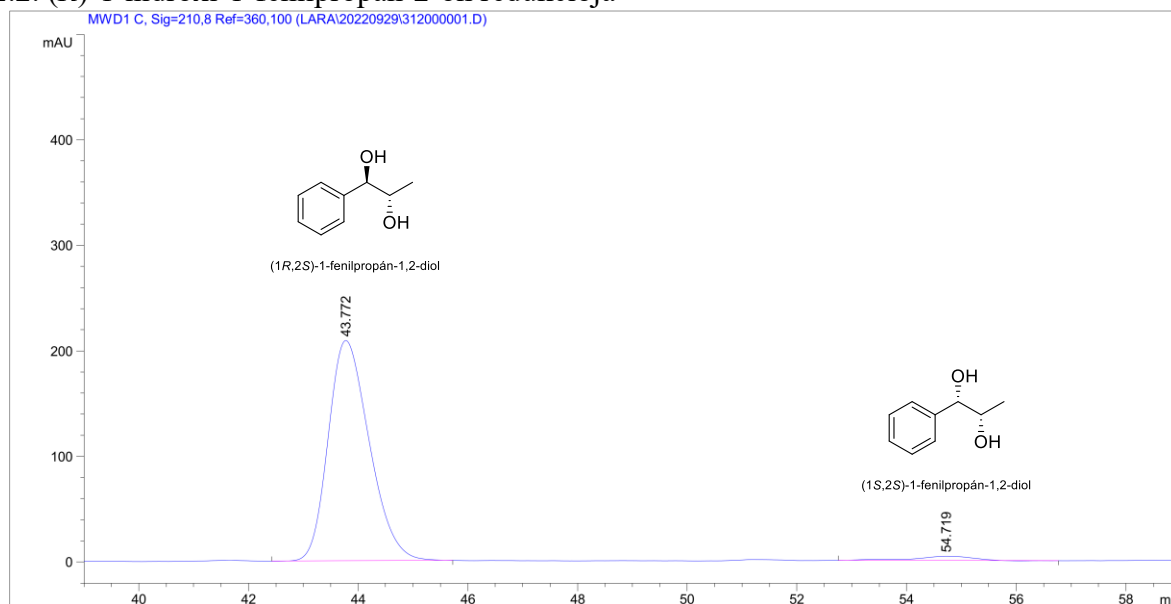
3. Táblázat: A reakció során keletkezett diasztereomerek retenciós ideje, integrált területe, és területeik megoszlása

Anyag	Retenciós idő (perc)	Terület	Terület (%)
(1R,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol	43,637	5460	62,1
(1S,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol	54,069	3332,2	37,9

Az 1-fenilpropán-1,2-dion hCAII-vel történő redukciója esetén az enzim szelektivitásának köszönhetően csak (1R,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol és (1S,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol keletkezik, a preferált diasztereomer az (1R,2S), amely 62%-ban keletkezik az (1S,2S) 38%-ához képest (**3.táblázat**).

3.2. Prekonfigurált 1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on redukciója hCAII-vel

3.2.2. (R)-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on redukciója



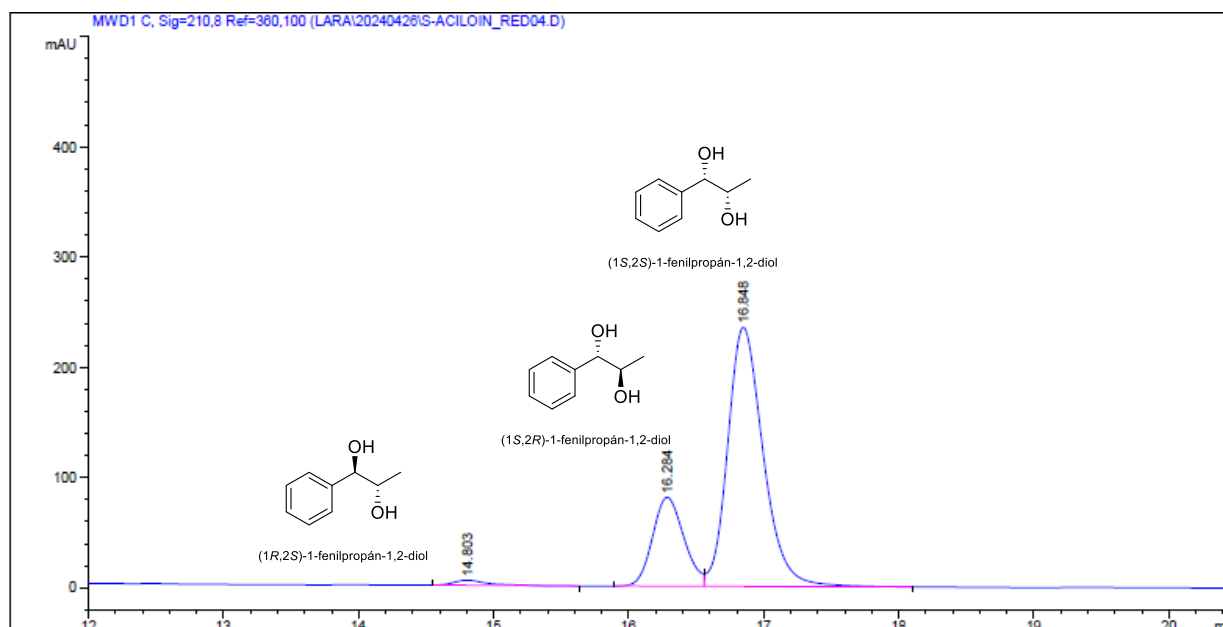
17. Ábra: Az (R)-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on liofilizált egész-sejtes hCAII-vel történő redukciójának a termékeinek királis elválasztása normál fázisú HPLC **B. módszerrel**, 210 nm-en

4. Táblázat: A reakció során keletkezett diasztereomerek retenciós ideje, integrált területe, és területeik megoszlása

Anyag	Retenciós idő (perc)	Terület	Terület (%)
(1R,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol	43,772	10883,8	97,28
(1S,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol	54,719	304,2	2,72

Az (R)-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-onból kiindulva hCAII-vel történő redukció esetén, gyakorlatilag csak (1R,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol keletkezik. A 2,7%-ban megjelenő (1S,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol annak a magyarázata, hogy a szubsztrát nem volt teljes egészében enantiomertiszta (**4. táblázat**).

3.2.3. (S)-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on redukciója



18. Ábra: Az (S)-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on liofilizált egész-sejtes hCAII-vel történő redukciójának a termékeinek királis elválasztása normál fázisú HPLC **C. módszerrel**, 210 nm-en

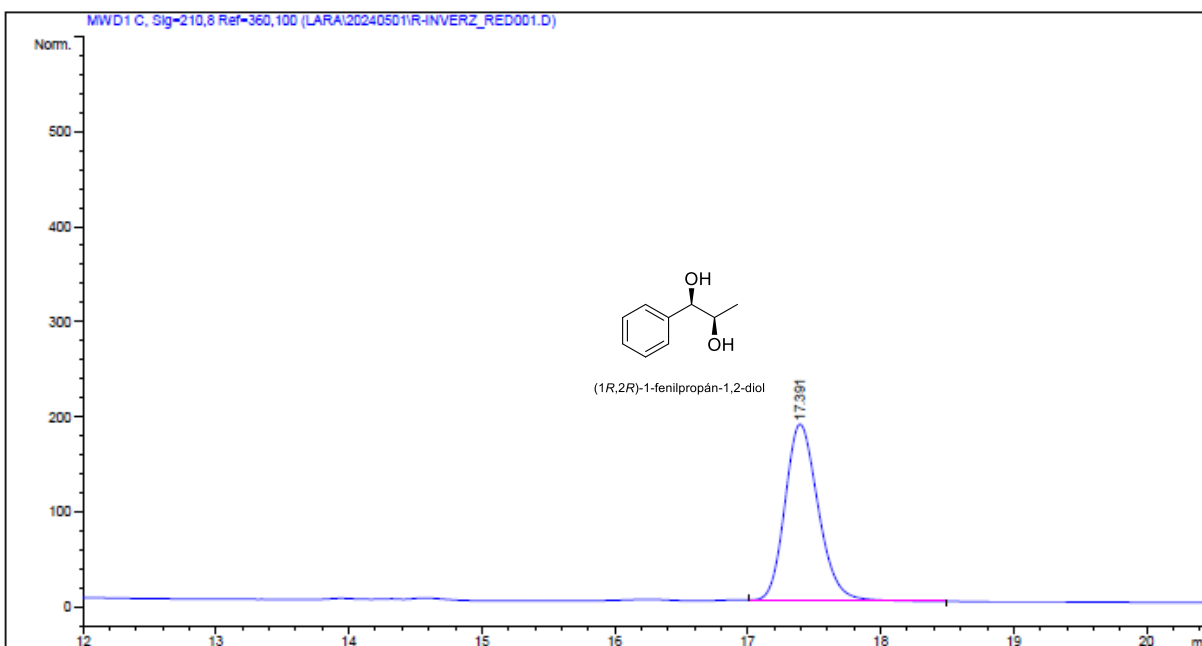
5. Táblázat: A reakció során keletkezett diasztereomerek retenciós ideje, integrált területe, és területeik megoszlása

Anyag	Retenciós idő (perc)	Terület	Terület (%)
(1R,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol	14,803	93,4	1,64
(1S,2R)-1-fenilpropán-1,2-diol	16,284	1303,9	22,86
(1S,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol	16,848	4306,7	75,50

(S)-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on-ból kiindulva hCAII-vel történő redukció esetén, gyakorlatilag elhanyagolható mennyiségű (1R,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol keletkezik, a fő termékek az (1S,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol (75,5%) és a (1S,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol (22,86%) (**5. táblázat**).

3.3. Prekonfigurált 2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on redukciója hCAII-vel

3.3.2. (R)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on redukciója



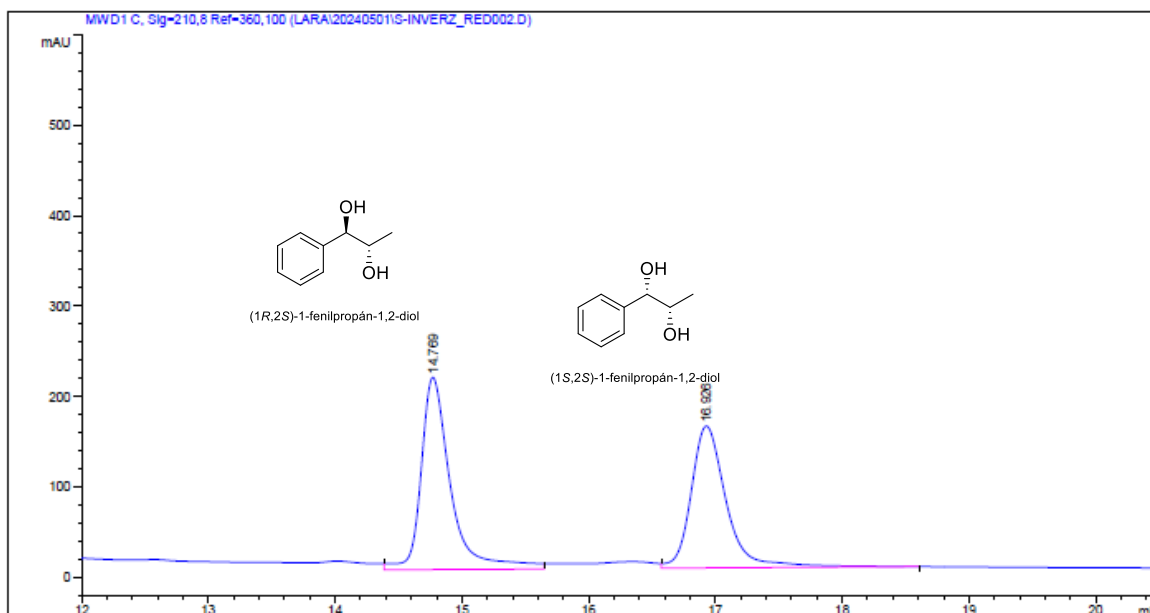
19. Ábra: Az (R)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on liofilizált egész-sejtes hCAII-vel történő redukciójának a termékeinek királis elválasztása normál fázisú HPLC **C. módszerrel**, 210 nm-en

6. Táblázat: A reakció során keletkezett diasztereomerek retenciós ideje, integrált területe, és területeik megoszlása

Anyag	Retenciós idő (perc)	Terület	Terület (%)
(1R,2R)-1-fenilpropán-1,2-diol	17,391	3280,4	100

(R)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-onból kiindulva hCAII-vel történő redukció esetén, kizárólag (1R,2R)-1-fenilpropán-1,2-diol keletkezik (**6. táblázat**).

3.3.3. (S)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on redukciója



20. Ábra: Az (S)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on liofilizált egész-sejtes hCAII-vel történő redukciójának a termékeinek királis elválasztása normál fázisú HPLC **C. módszerrel**, 210 nm-en

7. Táblázat: A reakció során keletkezett diasztereomerek retenciós ideje, integrált területe, és területeik megoszlása

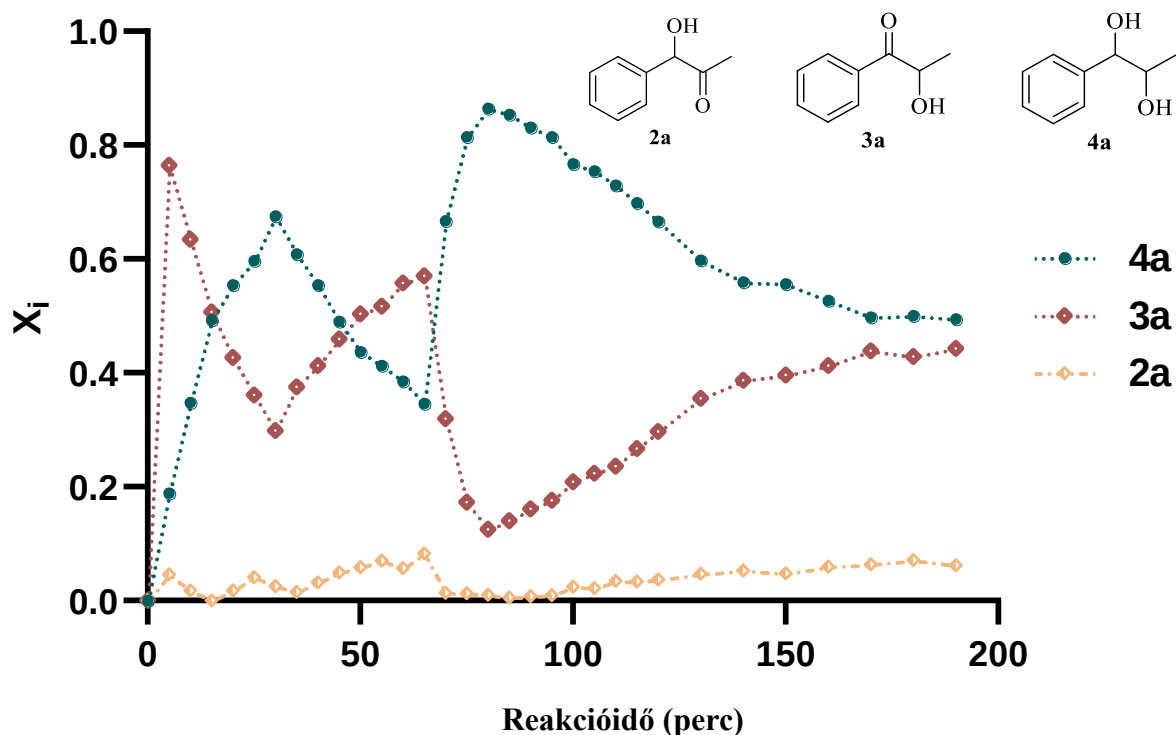
Anyag	Retenciós idő (perc)	Terület	Terület (%)
(1R,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol	14,769	3486,3	53,08
(1S,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol	16,926	3081,9	46,92

(S)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-onból kiindulva hCAII-vel történő redukció esetén (1R,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol (53,08%) és (1S,2S)-1-fenilpropán-1,2-diol (46,92%) keletkezik (**7. táblázat**).

3.4. Reakciólépések

Az 1-fenilpropán-1,2-dion redukcióját vizsgáltuk hCAII-vel 3 óra reakcióidő után. Öt, illetve tíz percenkénti mintavételezéssel határoztuk meg kvantitatívan a különböző vegyületek jelenlétét a reakcióelegyben. Ennek vizsgálatára egy fordított fázisú HPLC módszert dolgoztunk ki. Az integrált kromatogramok alapján az abszorbanciákat ismert koncentrációk alapján faktorizáltuk, majd meghatároztuk a különböző komponensek molarány-változását a reakcióelegyben. Ezáltal fontos információhoz jutottunk a redukálás lefolyásával kapcsolatban. Ezt összesítve a prekonfigurált 1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on és 2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on szelektivitási vizsgálataival meghatároztuk, hogy milyen köztitermékeken keresztül megy végbe a

reakció, és magyarázható ezáltal a fenilpropán-1,2-dion redukciójának szelektivitása és a megjelenő intermedierek.



21. Ábra: Az 1-fenilpropán-1,2-dion liofilizált egész-sejtes hCAII-vel történő redukciója során keletkezett termékek móltörtjei a reakció során

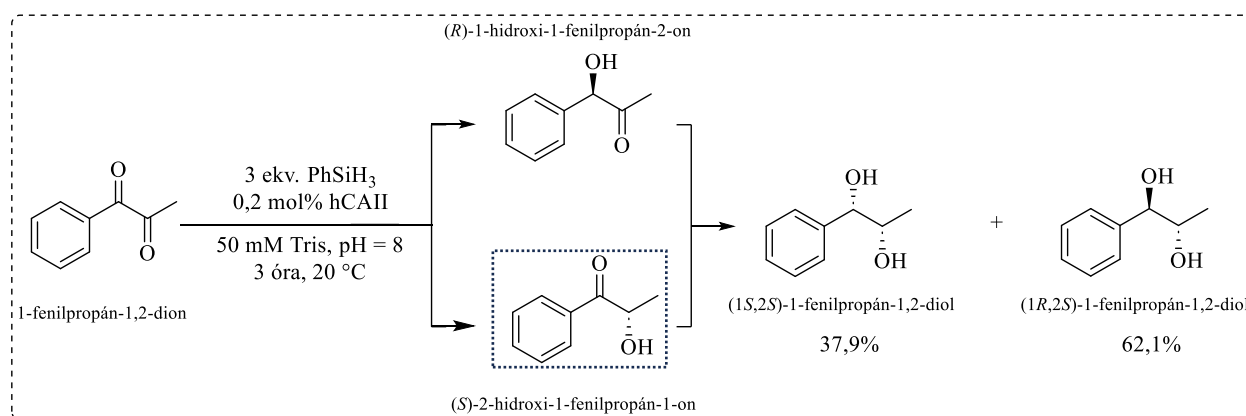
3.5. Eredmények kiértékelése

A **21. Ábrán** látható móltörtek alapján megfigyelhető, hogy a 2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on mólaránya oszcillál a reakció során, amiből az következik, hogy a 2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on intermediereken keresztül történő redukció során az 2-es pozícióban levő ketocsoport redukciója gyorsabban megy végbe, ugyanis az említett termék esetében akkumuláció figyelhető meg. A kis mennyiségben keletkező 1-hidroxi-2-fenilpropán-1-on viszont azonnal leredukálódik, és így kialakul a végtermék, a diol.

Sztereoszелеktivitási szempontból, a keletkező termékek tehát az (1*R*,2*S*) - 62,1%-ban és az (1*S*,2*S*) - 37,9%-ban. (1*R*,2*S*)-1-fenilpropán-1,2-diol (*R*)-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-onból és (*S*)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-onból keletkezhethet (**17.,20. Ábra**), illetve (1*S*,2*S*)-1-fenilpropán-1,2-

diol csak (*S*)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-onból (20. Ábra), így a reakció csak ezeken a köztitermékeken mehet végbe.

Ha a prekonfigurált (*S*)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on redukálása során keletkezett diasztereomerek arányát figyeljük, megfigyelhető, hogy megközelítőleg azonos arányban keletkezik (1*R*,2*S*)-1-fenilpropán-1,2-diol és (1*S*,2*S*)-1-fenilpropán-1,2-diol, és az utóbbi 37,9% arányban keletkezik így a preferált intermedier az (*S*)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on, amit alátámaszt a reakció során vizsgált molarány-többség is. A maradék (1*R*,2*S*)-1-fenilpropán-1,2-diol pedig az (*R*)-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-onból keletkezik.



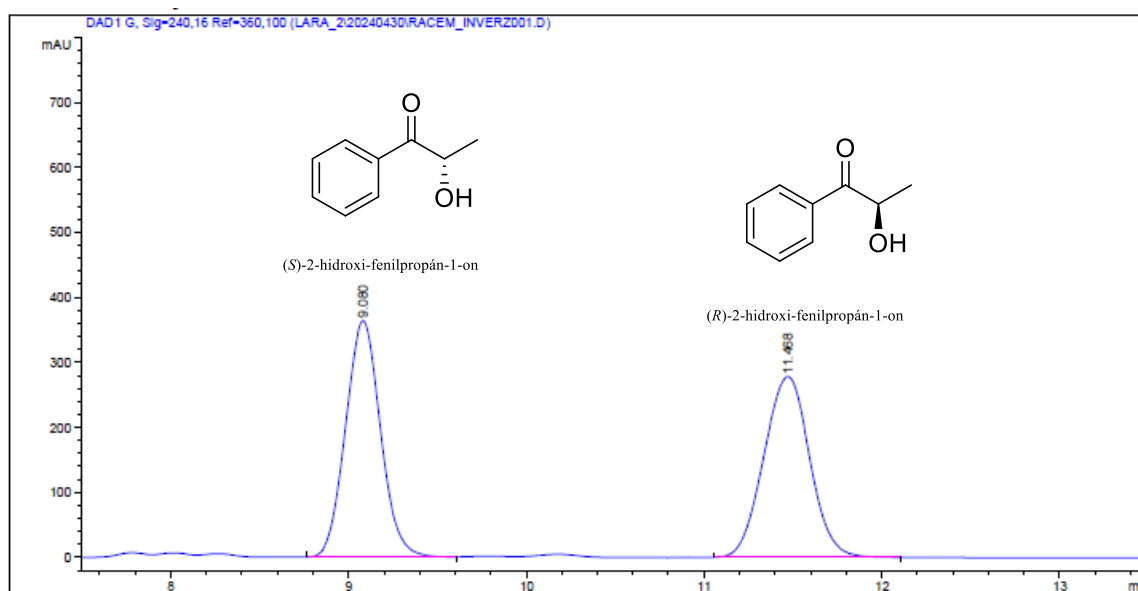
2. Ábra: Az 1-fenilpropán-1,2-dion humán szénsavanhidráz II-vel történő redukciójának köztitermékei és végtermékei

4. Konkluzió

A kutatás során sikerült meghatározni az enzim szelektivitását a prekonfigurált 1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on; és 2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on-esetében, valamint, hogy az 1-fenilpropán-1,2-dion redukciójának szelektivitása milyen köztitermékeken keresztül megy végbe, így magyarázva a szelektivitást a diketon esetében. A fent említett vegyületek esetében a megfelelő gyors reakcióidőnek és magas szelektivitásnak köszönhetően a humán szénsavanhidráz II fenilszilán jelenlétében történő abiotikus redukálási katalízise egy kitűnő módszer királis, enantiomertiszta diolok előállítására, amely egy olcsó és könnyedén előállítható katalizátort igényel.

5. Függelék

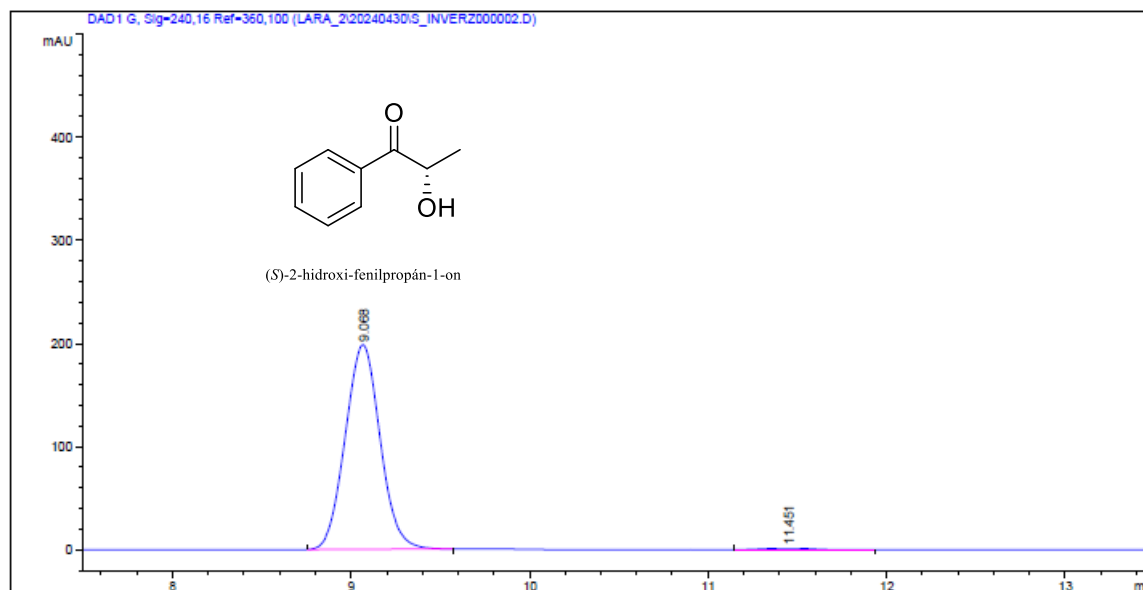
(*R*)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on és (*S*)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on



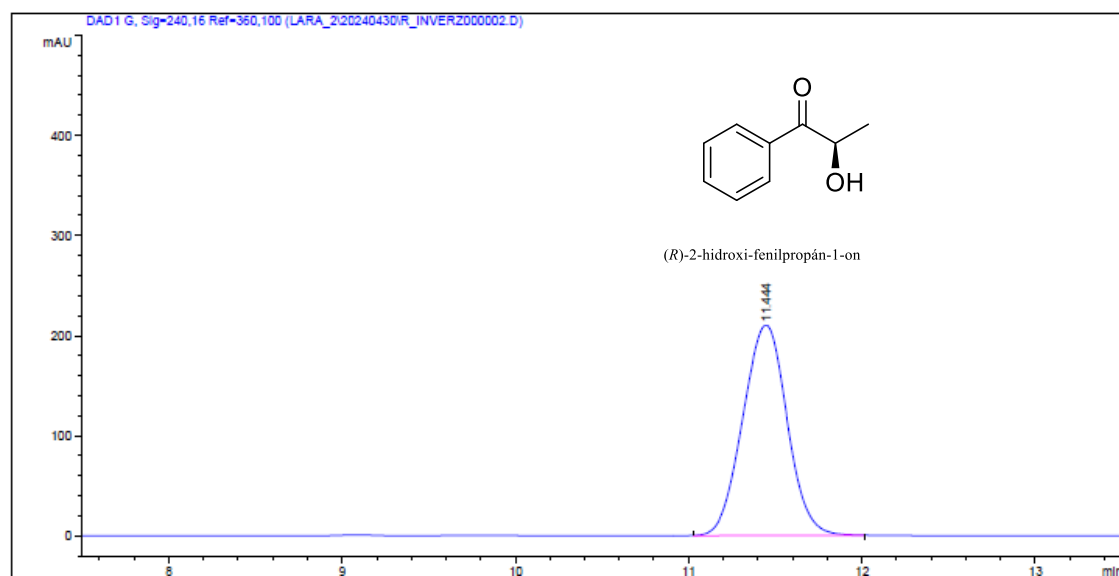
F1. Ábra: A racém 2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on királis elválasztása normál fázisú HPLC **A. módszerrel**, 210 nm-en

F1. Táblázat: A 2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on enantiomerjeinek retenciósi ideje

Anyag	Retenciósi idő (perc)
(<i>S</i>)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on	9,080
(<i>R</i>)-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on	11,468

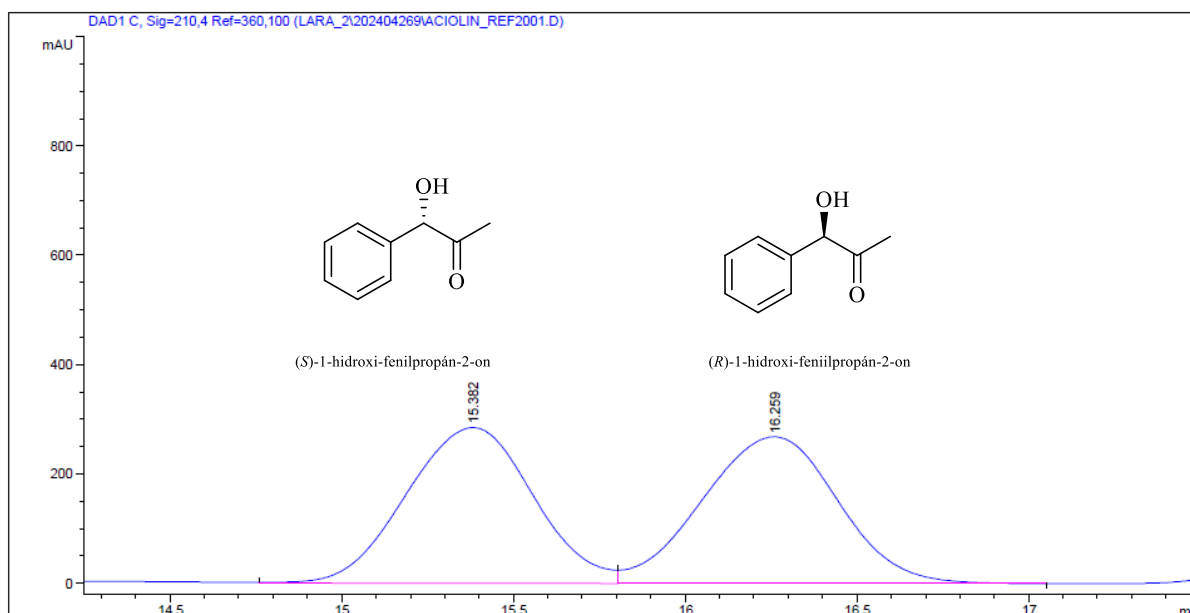


F2. Ábra: Az *(R)*-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on királis elválasztása normál fázisú HPLC **A. módszerrel**, 210 nm-en



F3. Ábra: Az *(S)*-2-hidroxi-1-fenilpropán-1-on királis elválasztása normál fázisú HPLC **A. módszerrel**, 210 nm-en

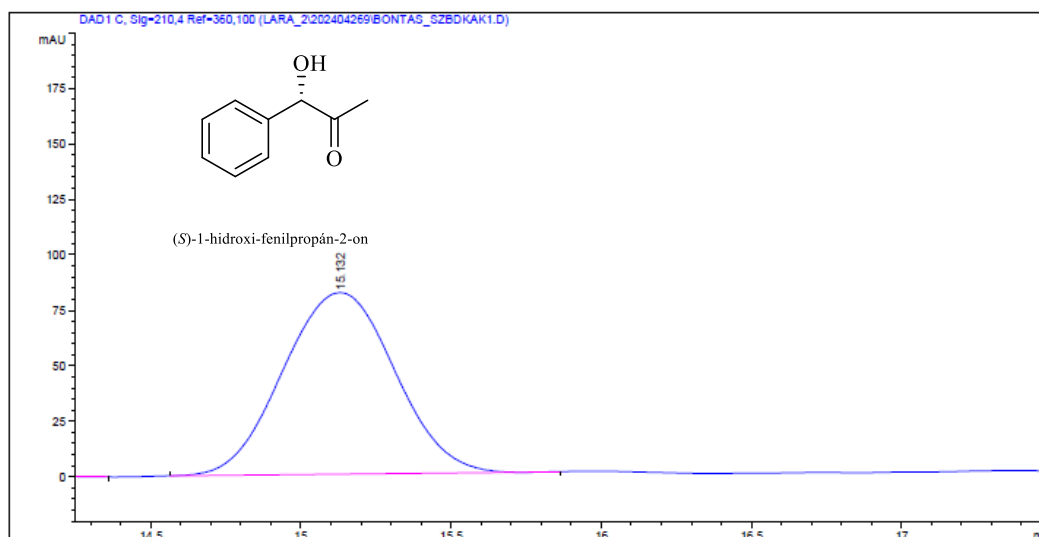
(R)-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on és *(S)*-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on



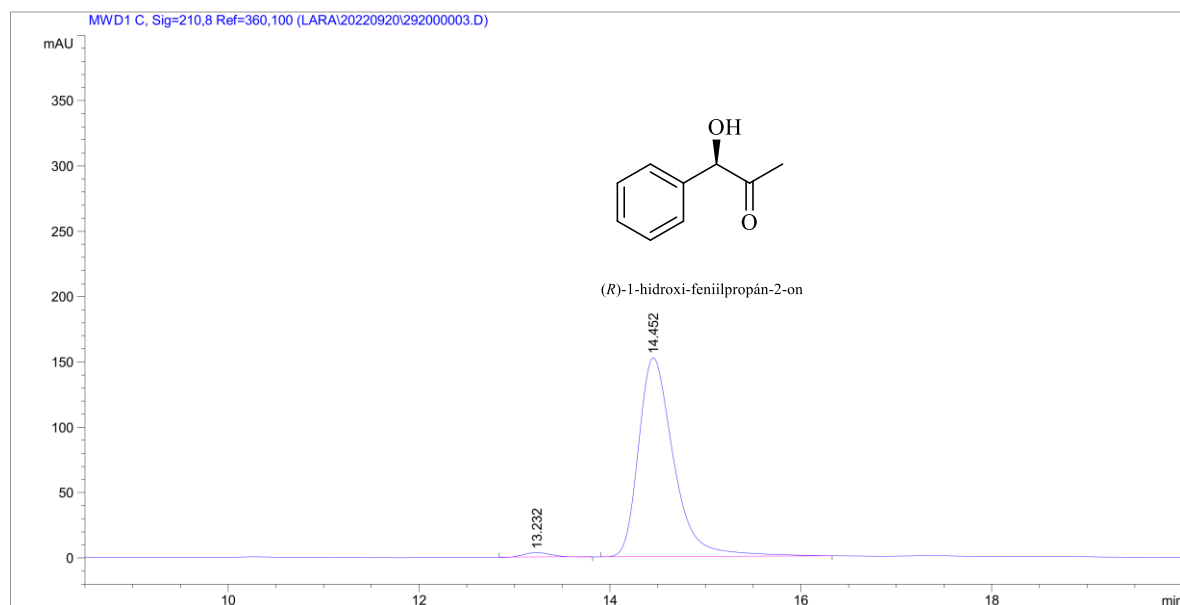
F4. Ábra: A racém 1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on királis elválasztása normál fázisú HPLC **A. módszerrel**, 210 nm-en

F2. Táblázat: Az 1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on enantiomerjeinek retenciósi ideje

Anyag	Retenciósi idő (perc)
(S)-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on	15,382
(R)-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on	16,259



F5. Ábra: Az (S)-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on királis elválasztása normál fázisú HPLC **A. módszerrel**, 210 nm-en



F6. Ábra: Az (R)-1-hidroxi-1-fenilpropán-2-on királis elválasztása normál fázisú HPLC **D. módszerrel**, 210 nm-en

6. Bibliografía

- [1] Colberg, J.; Kuok (Mimi) Hii, K.; Koenig, S. G. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2022**, 10 (26), 8239–8241.
- [2] Masci, D.; Castagnolo, D. *Sustainable Organic Synthesis* **2021**, Oct., 68–118.
- [3] Rocha, J. F.; Pina, A. F.; Sousa, S. F.; Cerqueira, N. M. F. S. A. *Catal. Sci. Technol.* **2019**, 9 (18), 4864–4876.
- [4] Bell, E. L.; et al. *Biocatalysis Nat. Rev. Methods Primers* **2021**, 1 (1).
- [5] Narváez, A.; Domínguez, E. *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition* **2005**, 508–523.
- [6] Brooks, W. H.; Guida, W. C.; Daniel, K. G. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, 11 (7), 760.
- [7] Ouellette, R. J.; Rawn, J. D. *Stereochemistry Organic Chemistry* **2018**, 213–253.
- [8] Rehman, W.; Arfons, L. M.; Lazarus, H. M. *Ther. Adv. Hematol.* **2011**, 2 (5), 291.
- [9] Chen, B. S.; Ribeiro de Souza, F. Z. *RSC Adv.* **2019**, 9 (4), 2102.
- [10] Carey, J. S.; Laffan, D.; Thomson, C.; Williams, M. T. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4 (12), 2337–2347.
- [11] Karnik, A. V.; Hasan, M. *Diastereomeric transition states and stereoselectivity Stereochemistry* **2021**, 407–463.
- [12] Heravi, M. M.; Zadsirjan, V.; Esfandyari, M.; Lashaki, T. B. *Tetrahedron Asymmetry* **2017**, 28 (8), 987–1043.
- [13] Ji, P.; Park, J.; Gu, Y.; Clark, D. S.; Hartwig, J. F. *Nat. Chem.* **2021**, 13 (4), 312–318.
- [14] Morrison, H. *Enzyme Active Sites and their Reaction Mechanisms* **2021**, 31–35.
- [15] Domsic, J. F.; et al. *J. Biol. Chem.* **2008**, Nov 7.
- [16] Barabás, L. E.; et al. *React. Chem. Eng.* **2023**, 8 (8), 2001–2010.
- [17] Matsuda, T.; Yamanaka, R.; Nakamura, K. *Green Biocatalysis* **2016**, 307–330.

- [18] Casas-Godoy, L.; et al. *Methods Mol. Biol.* **2012**, 861, 3–30.
- [19] Chandra, P.; et al. *Microb. Cell Fact.* **2020**, 19 (1), 1–42.
- [20] Mala, J. G.; Takeuchi, S. *Anal. Chem. Insights* **2008**, 3, 9–19.
- [21] Mala, J. G.; Takeuchi, S. *Anal. Chem. Insights* **2008**, 3 (3), 9.
- [22] Schrag, J. D.; Li, Y.; Wu, S.; Cygler, M. *Nature* **1991**, 351 (6329), 761–764.
- [23] Adam, W.; Díaz, M. T.; Fell, R. T.; Saha-Möller, C. R. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7 (8), 2207–2210.
- [24] Malviya, R.; Bansal, V.; Pal, O.; Sharma, P. J. *Global Pharma Technol.* **2010**, 2, 22–26.
- [25] Brádlarová, A.; Prónayová, N.; Mišíková, E.; Ďurinda, J. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1990**, 55 (7), 1854–1865.
- [26] Scolnick, L. R.; Christianson, D. W. *Biochemistry* **1996**, 35 (51), 16429–16434.