



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Szerves Kémia és Technológia Tanszék

TDK Dolgozat

***Pseudozyma aphidis* lipáz aktivitásának vizsgálata
racém aminok enzimkatalizált kinetikus
rezolválásában**

Készítette:

Oláh Márk

Témavezető:

Dr. Poppe László

Egyetemi tanár

BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Konzulens:

Boros Zoltán

PhD hallgató

BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Budapest

2012.

A dolgozat bemutatását a TÁMOP - 4.2.2.B-10/1--2010-0009
"Új tehetséggondozó programok és kutatások a Műegyetem tudományos műhelyeiben"
című program támogatta.

Tartalom

1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. Enzimek, mint biokatalizátorok	5
2.2. Lipázok és a CaLB	6
2.3. <i>Pseudozyma aphidis</i>	8
2.4. A kinetikus rezolválás alapjai	9
2.5. Enzimrögzítési módok	9
2.5.1. Adszorpciós rögzítés.....	10
2.6. Aminok előfordulása a természetben és a gyógyszeriparban	11
2.7. Alkil- és alkoxi-észterek felhasználása	12
3. Eredmények és kiértékelésük.....	13
3.1. Acilezőszerek fejlesztése	13
3.1.1. A 2-etoxiecetsav (12) előállítása	14
3.1.2. Etil-2-etoxiacetát (13) és izopropil-2-etoxiacetát előállítása (14)	15
3.2. Racém amidok előállítása	15
3.3. Racém aminok kinetikus rezolválása	17
3.4. <i>Pseudozyma aphidis</i> lipáz aktivitásának vizsgálata	22
3.4.1. Az alkalmazott táptalajok összetétele	22
3.4.2. Új enzimek előállítása és lipáz aktivitásának vizsgálata	23
3.4.3. A felületmódosítás hatása az enzimaktivitásra	24
3.4.4. Táptalaj összetevőinek hatása az enzimek aktivitására	27
4. Kísérleti rész	29
4.1. Felhasznált anyagok	29
4.2. Analitikai módszerek	29
4.2.1. GC programok	30
4.3. A 2-etoxiecetsav és származékainak előállítása.....	31
4.3.1. 2-etoxiecetsav (12) előállítása	31
4.3.2. Etil-2-etoxiacetát (13) előállítása.....	31
4.3.3. Izopropil-2-etoxiacetát (14) előállítása.....	32
4.4. Racém amidok előállítása	33
4.4.1. Racém 2-etoxi-N-(1-feniletán)acetamid [<i>rac</i> -3] előállítása.....	33
4.4.2. Racém 2-etoxi-N-(4-fenilbut-2-il)acetamid [<i>rac</i> -6] előállítása	34
4.4.3. Racém 2-etoxi-N-(1,2,3,4-tetrahidronaft-1-il)acetamid [<i>rac</i> -9] előállítása... 35	
4.5. Acilezőszerek tesztelése rázatott lombikban.....	36
4.5.1. Racém aminok kinetikus rezolválása.....	36

4.5.2. Új enzimkészítmények aktivitásának vizsgálata	36
4.6. Új lipáz enzimek rögzítése	37
5. Összefoglalás	38
6. Irodalomjegyzék	40

1. Bevezetés

A királis vegyületek a kémia, a biológia és így az élet minden területén megjelennek, és szinte minden esetben kulcsfontosságú a felhasznált vegyület sztereokémiája, mert ez határozza meg élettani hatását. Egy vegyület két enantiomerének minden skaláris fizikai, kémiai tulajdonsága megegyezik¹, azonban biológiai hatásuk teljesen különböző lehet. Az enantiomertiszta vegyületek előállításának fontosságát számos példa szemlélteti, úgy gyógyszeripari^{2,3}, mint élelmiszeripari⁴ vonatkozásban. A nagytisztaságú enantiomerek előállítása azonban sokszor nehézségekbe ütközik. Az enantiomertiszta vegyületek előállítását összefoglalóan enantioszelektív módszereknek nevezzük. Ezek közé tartozik a kémiai aszimmetrikus szintézis, racém vegyületek rezolválása diasztereomer párok képzésével vagy kristályosítással és a kinetikus rezolválás^{5,6}. Az enzimatiszta kinetikus rezolválás lényege, hogy valamilyen racém szubsztrátot reagáltatunk egy akirális ágenssel enzim jelenlétében, amikor is kinetikus okokból az egyik enantiomer sokkal gyorsabban keletkezik, mint a másik. Ha kellően szelektív az enzim, enantiomertiszta terméket kapunk. Kinetikus rezolválással azonban a racém kiindulási anyag 50%-a alakul csak át a kívánt termék megfelelő enantiomerévé, így legjobb esetben olyan elegyet kapunk, melyben 50% enantiomertiszta kiindulási anyag mellett 50% szintén enantiomertiszta, a másik enantiomerből képződő termék van. Nagy előnye azonban, hogy megfelelő enzimmal szinte tökéletesen enantiomertiszta⁷ ($ee > 99\%$) terméket kaphatunk. Ezeket a rendszereket gyakran kombinálják racemizálási folyamatokkal⁸, mely során a visszamaradó (számunkra „szennyező”) kiindulási anyag folyamatosan racemizálódik, így elméletileg előállítható a kívánt termék tiszta enantiomerje 100%-os konverzióval. Ezt nevezzük dinamikus kinetikus rezolválásnak⁹.

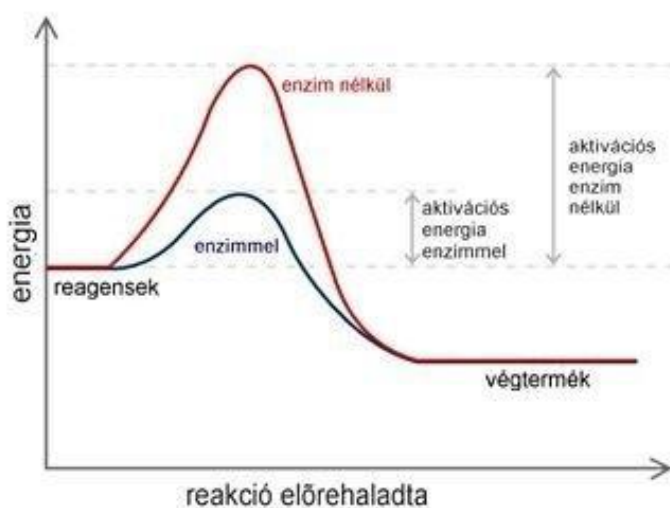
Munkám során a *Pseudozyma aphidis* lipáztermelő képességét vizsgáltam a tápoldat összetételének függvényében¹⁰. A tesztreakció egy racém amin enzimkatalizált kinetikus rezolválása volt. Mivel az aktivitást szerettük volna minél érzékenyebben kimutatni, ezért célom volt egy erre a reakcióra alkalmazható hatékony acilezőszer kifejlesztése. A vizsgálatok során leghatékonyabb acilezőszernek az izopropil-2-etoxiacetát (**14**) adódott. A fermentációs elegyből a lipáz(oka)t adszorpciós technikával rögzítettem a kutatócsoportunk által fejlesztett szilikagél alapú hordozókra, majd az így nyert rögzített készítményeket közvetlenül használtam fel a kinetikus rezolválásokban.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Enzimek, mint biokatalizátorok

Enzimeknek nevezzük azokat a fehérjéket (néhány kivételtől eltekintve, pl. RNS alapú enzimek), amelyek kémiai reakciókat katalizálnak. Ezek a folyamatok alapvetően élő szervezetekben játszódnak le, ezért ezeket a komplex fehérjéket biokatalizátoroknak is nevezik. Ugyanúgy, mint „hétköznapi” katalizátortársaik, az enzimek is a reakciók számára az aktivációs energia csökkentésével alacsonyabb energiájú utat nyitnak meg, ezáltal gyorsítva azokat (1. ábra). Az enzimek a katalitikus- és kötőhelyből álló aktív helyen lejátszódó folyamat során konformáció változással segítik a szubsztrát termékké alakítását. Ezen bio-

makromolekulák egyik legnagyobb előnye a szelektivitás. A lezajló folyamatokban megvalósulhat szubsztrát-, kemo-, regio-, és enantio-szelektivitás is. Egyes enzimek önmagukban is katalizátorként működhetnek (egyszerű



1. ábra: Reakciók lefolyása biokatalízissal és anélkül

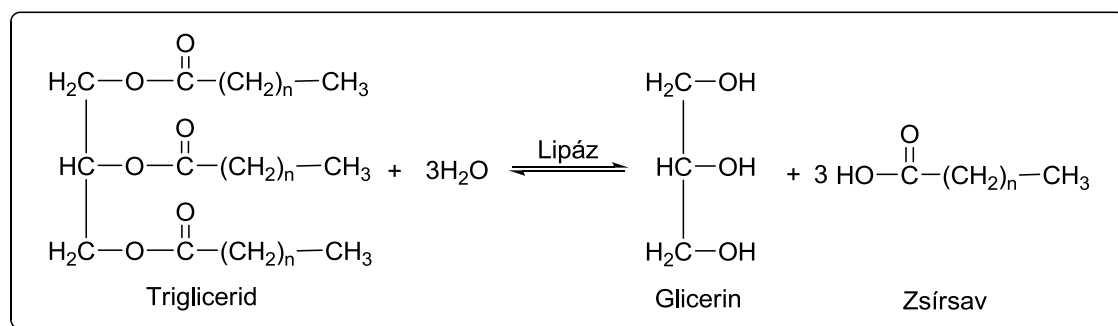
enzimek), míg másoknak szükségük van egyéb molekulákra (összetett enzimek), mint fémionok, koenzimek (NAD^+ , NADP^+). Az enzimeket az általuk katalizált folyamat szerint csoportosítják, így hat különböző osztályba, ezen belül alosztályokba sorolják őket. A harmadik csoportba tartoznak a hidrolázok, ezen belül iparilag is nagyon jelentős képviselőik a lipázok¹¹.

Az enzimek fehérje természetük lévén általában igen érzékenyek a reakciókörülményekre (oldószer, hőmérséklet, pH, ionkoncentráció), így többnyire csak szűk tartományokban alkalmazhatók. Természetes formában történő alkalmazásuk során további hátrányok, illetve problémák vetődnek fel. Ha valamilyen rögzített formában alkalmazzuk az enzimet, akkor jelentősen megnő az alkalmazási terület szélessége és számos további előnyre is szert tehetünk. A rögzítésnek számos

technológiai megvalósítását alkalmazzák széles körben, az egyik leggyakoribb formája az adszorpciós módszer. Ennek egyik legjobb példája a *Candida antarctica* B lipáz¹², amelyet többek közt szilikagél alapú hordozóra vagy akril polimerekre rögzítenek és laborokban, illetve iparban is széles körben alkalmazzák.

2.2. Lipázok és a CaLB

A harmadik enzimosztályt alkotják a már említett hidrolázok, melyek szén-oxigén, szén-nitrogén, szén-szén kötések hidrolitikus szakításának és létrejöttének egyensúlyi folyamatát, alkoholízist, aminolízist, illetve észterek^{13,14}, cukrok, peptidek¹⁵ és amidok kötéseinek kialakulását befolyásolják¹⁶. Szerves oldószerben átészteresítést segítik elő. A lipázok előfordulnak mikroorganizmusokban, növényekben és állatokban egyaránt. Az élő szervezetben ezek az enzimek felelősek a zsírsav-észterek hidrolíziséért (triacyl-glicerol hidroláz, EC.3.1.1.3) (2. ábra).



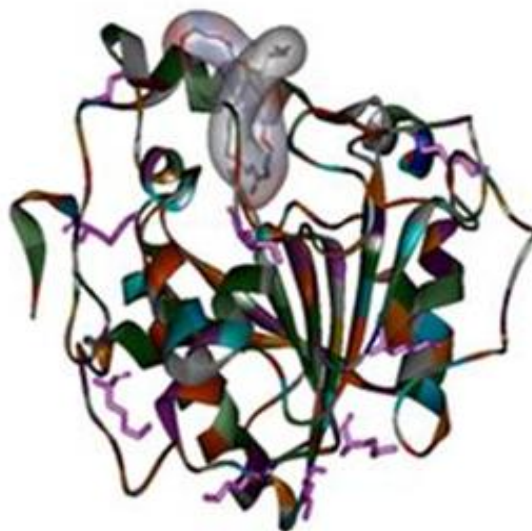
2. ábra: Trigliceridek hidrolízise lipáz enzimmel

Fontos lipáztermelők az egyes *Bacillus*, a *Pseudomonas* és *Burkholderia* baktériumtörzsek¹⁷. Az enzimek jelentős része nem képes teljesen vízmentes közegben katalitikus funkció betöltésére. Ezzel szemben a lipázok látszólag vízmentes közegben is stabilak és aktívak maradnak bármilyen stabilizáló anyag nélkül. Ehhez az az előny is párosul, hogy szubsztrátjaik általában vízben rosszul, vagy egyáltalán nem oldódnak (pl. zsírok, hosszú apoláris oldalláncú molekulák). Alkalmazható szerves-vizes kétfázisú közeg is, ugyanis a szubsztrát általában szerves, míg az enzim vizes közegben oldódik, így feldolgozásnál könnyen szétválaszthatók¹⁸. Nagy előnye még a lipázoknak, hogy magas regio- és enantioszelektivitást mutatnak, ezáltal ipari alkalmazásuk szerves szintézisekben kézenfekvő választás lehet, olyan esetekben ahol e szelektivitások kihasználhatóak. Ezért is alkalmazzák enantiomertiszta gyógyszerhatóanyagok¹⁹ és

intermedierek előállításához²⁰. Számos, jelenleg is forgalomban lévő hatóanyagot állítanak így elő, mint a gyulladáscsökkentő naproxént²¹ és ibuprofént²². Ígéretes alkalmazási területek még a felületaktív anyagok gyártása, olajipar, tejipar, mezőgazdasági segédanyagok, papíripar, táplálék adalékanyagok, kozmetikumok előállítása. A lipáz alapú ipari technológiák egyre szélesebb körben terjednek el²³.

A CaLB (3. ábra) a forgalomban lévő legelterjedtebb lipáz enzim, laboratóriumokban és ipari²⁴ léptékben egyaránt. Ezt egyedülálló szelektivitásának és az enyhe körülmények (légköri nyomás, szobahőmérséklet) között megvalósítható reakcióknak köszönheti. Ezt az enzimet a *Candida antarctica* vagy más néven *Pseudozyma antarctica* nevű bazídiumos gomba termeli. Ez az élőlény két lipázt is termel a már említett CaLB-t, illetve

a *Candida antarctica* A lipázt (CaLA), mindkettőt tisztították és azonosították²⁵. A két enzim különböző, az A-jelzésű Ca-függő és hőstabil, míg a B-jelzésű nem Ca-függő, azonban kevésbé hőstabil, emellett szelektivitásukban is eltérnek. A CaLB molekulatömege 33 kD, 317 aminosav építi fel, mérete kb. 30*40*50Å. Ugyanúgy, mint a többi lipáz, működését tekintve azonos a szerin proteázéval,



3. ábra: A CaLB szerkezete

vagyis a szerin-hisztidin-aszparaginsav aminosav triád felelős a katalitikus hatásért. Számos néven ismert: CaLB (*Candida antarctica* B lipáz), Novozym® 435 (kereskedelmi neve a rögzített enzimmészítménynek), SP435 (ugyanaz, mint a Novozym® 435) és az SP382 (majdnem A lipáz mentes).

A CaLB nagyon robusztus enzim, az optimális katalitikus pH-ja 7, de vizes közegben stabil marad 3,5 és 9,5 között is. Denaturálási hőmérséklete 50-60 °C között van, függ a pH-tól (alacsonyabb pH-nál nagyobb termo stabilitást mutat). Hőstabilitása jelentősen növelhető (60-80 °C között több ezer óra kontaktidő után is²⁶) ha valamilyen módon rögzítjük az enzimet.

2.3. *Pseudozyma aphidis*

A *Pseudozyma* fajok szokatlanul élesztőszerű gombák, többnyire növényi részekből izolálják őket, úgy mint levelekből, virágokból és termésekből^{27,28}. Számos fajt jegyeztek fel ebben a nemzetségben, Boekhout és Fell²⁷: *P. antarctica*, *P. aphidis*, *P. flocculosa*, *P. fusiformata*, *P. prolifica*, *P. rugulosa*, és *P. tsukubaensis*. Sugita és társai vérből is izoláltak fajtákat²⁹: *P. parantarctica* és *P. thailandica*.

A *P. aphidis*-t először egy „jeruzsálemi cseresznye” vagy „madeirai téli cseresznye” (*Solanum pseudocapsicum*) nevű, mérgező termésű nadragulya fajtából izolálták Németországban³⁰. Azóta számos további növényből izolálták már.

A *P. aphidis*-t széles körű vizsgálatnak vetették alá³¹, hogy alapvető tápanyagszükségletét milyen forrásokból képes fedezni. Avis³² és társai rájöttek arra, hogy a *P. aphidis* hatására a növények felszínén nem jelentek meg penészgomba telepek. Levy és Gafni³³ eper levelekből izolált *P. aphidis*-t, majd ezzel kezelt különböző növényeken penésztelepeket, amelyek ennek hatására megszűntek, ez a *P.*



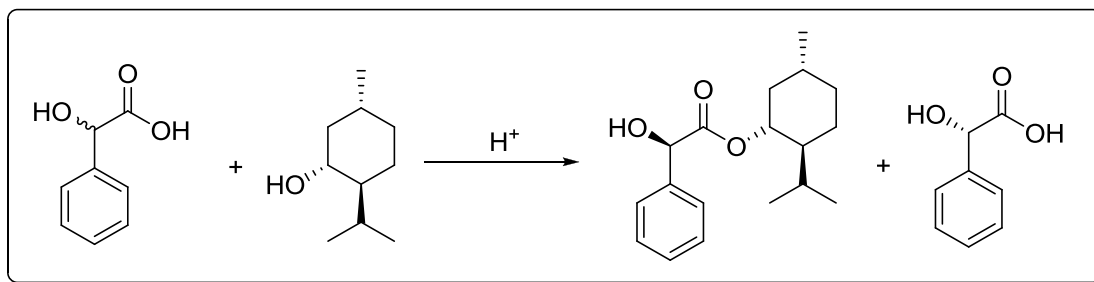
4. Ábra: *Solanum pseudocapsicum*

aphidis extracelluláris metabolitjainak inhibáló hatásának tudható be, vagyis patogén gombák és baktériumok ellen hatékony. Elvégezték *in vivo* körülmények között is a vizsgálatot, ekkor a *P. aphidis* spórákat ültettek paradicsomokba, ez is hatásosnak bizonyult különböző patogének ellen. Ezzel a módszerrel csökkenteni lehet a patogén ágensek visszaszorítására alkalmazott kémiai anyagok mennyiségét.

A *P. aphidis* igen közeli rokonságban áll a *P. antarctica*-val, más néven *Candida antractica*-val, hiszen ugyanazon nemzetséghez tartoznak.

2.4. A kinetikus rezolválás alapjai

A kinetikus rezolválás lényege, hogy egy kiralitáscentrummal rendelkező molekula enantiomer párja eltérő sebességgel reagál, így a reakcióelegyben túlsúlyba kerül a kevésbé aktív, míg reaktívabb tovább reagál. Ezt először Marckwald és McKenzie³⁴ jegyezte fel, mikor racém mandulasavat (-)-mentollal reagáltatott savas pH-n (5. ábra).



5. ábra: A racém mandulasav kinetikus rezolválása (-)-mentollal

Enzimkatalizált kinetikus rezolválás során optikailag aktív molekula párt reagáltatunk valamilyen akirális ágenssel enzim jelenlétében. Ha az enzim enantiomerszelektivitása elegendően nagy, akkor az egyik enantiomer képződése preferált. Így optimális esetben a reakció végén egy olyan elegyet kapunk, ahol 50%-ban van jelen a kiindulási anyag kevésbé aktív enantiomerje és 50%-ban a reaktív enantiomer termék formájában.

2.5. Enzimrögzítési módok

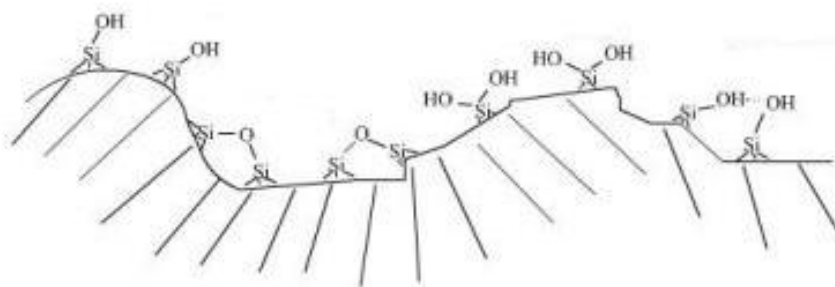
Az enzimek rögzítése, más néven immobilizálása elengedhetetlen ahhoz, hogy ipari léptékben alkalmazni lehessen őket, hiszen e nélkül eltávolításuk a reakcióelegyből körülményessé teszi az eljárást. Rögzített formában alkalmazható szakaszos üzemű készülékekben, tartályreaktorokban, ekkor egy egyszerű szűréssel elválasztható a reakcióelegytől, ezáltal a járulékos költségeket jelentősen csökkenthetjük. Emellett folyamatos üzemű, átfolyásos rendszerekben töltetként is alkalmas katalitikus hatás kifejtésére³⁵⁻³⁹. Az, hogy milyen üzemű technológiát választunk, függ az előállítani kívánt termék mennyiségétől, reakciókörülményektől és az enzim aktivitásától is. A rögzítéssel a könnyen megvalósítható elválasztáson kívül több előnyös tulajdonságot is kapunk, mint például a stabilitás jelentős növekedése^{40,41}, ezáltal szélesebb spektrumban választhatunk reakciókörülményt^{42,43}, úgy hogy nem csökken az enzim aktivitása. A rögzítés megvalósítható fizikai és kémiai módszerekkel egyaránt (1. táblázat).

Fizikai módszerek	Kémiai módszerek
„bezárás” szemipermeabilis rétegek közé	ionos kötés aminosav oldalláncokkal
gélekbe, üregekbe „zárás”	kovalens kötés (hordozó-enzim)
mikrokapszulázás	kovalens kötés multifunkciós segédmolekulákkal
liposzómaképzés	polimerláncba építés
adszorpció	kelátképzés fémekkel

1. táblázat: Enzimmegkötési módok

2.5.1. Adszorpció rögzítés

Ennél a rögzítési módnál⁴⁴ ugyanúgy, mint általában bármilyen adszorpció eljárásnál nagyon fontos az adszorbeálandó felület fizikai-kémiai tulajdonságai. Érdekes porózus⁴⁵ szerkezetű hordozót választani, mert ezáltal jelentősen nő a fajlagos felülete. A fajlagos felület mellett fontos a hordozó pórusmérete is. Mindkét paraméter nagyon fontos az enzim és a katalizálni kívánt reakció szempontjából is. Hiszen elegendően nagy pórusméretűnek kell lennie a hordozónak ahhoz, hogy az enzim meg tudjon tapadni rajta, benne, illetve mind az átalakítani kívánt szubsztrát, mind termék számára átjárhatónak kell lennie. De a túlságosan nagy pórusméret sem előnyös, mert ez a termelékenység rovására mehet, hiszen a szubsztrát molekula és kötött enzim találkozásának valószínűsége csökken. Nagyobb fajlagos felülettel elérhetjük, hogy több enzim képes adszorbeálódni, így majd az alkalmazás során produktivitásbeli növekedést tapasztalhatunk. Számos anyagot alkalmaznak hordozóként úgy, mint alumínium-oxid, kalcium-foszfát, kalcium-karbonát, aktív szén, szilikagél⁴⁶. A 6. ábrán látható az egyik legszélesebb körben alkalmazott adszorpció hordozó, a szilikagél felszíne, illetve az OH-csoportok lehetséges állapotai.

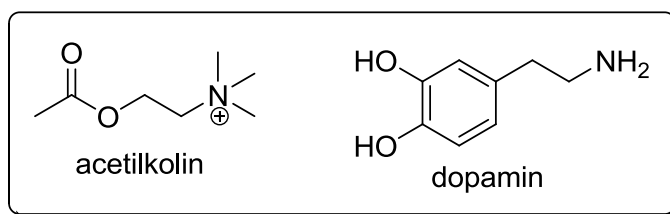


6. ábra: Módosítatlan szilikagél hordozó felülete

A szilikagél hordozók felszínét gyakran módosítják különböző szénláncokkal, hiszen az adszorpció többnyire hidrofób kölcsönhatások révén jön létre a felület és az enzim között. Annak ellenére, hogy nem kovalens módon rögzül az enzim, vízmentes közegben többnyire nem csökken az enzim alkalmazhatósága, mivel ilyen körülmények között az enzim nem hajlamos deszorpcióra. Sőt, a legtöbb lipáz aktivitása nő a natív állapothoz képest, mert a hidrofób felület olyan konformáció-változást idéz elő, hogy az enzim aktív centruma szabadon elérhető lesz a szubsztrát számára⁴⁷. Így az aktivitás növekedése mellett ezek a felületek képesek az enzimek részleges orientációjára és ezt az aktivált állapotot állandósítani.

2.6. Aminok előfordulása a természetben és a gyógyszeriparban

A funkciós csoportok közül talán a legnagyobb számban fordul elő szerves molekulákban az amin csoport, szabad, vagy valamilyen alkilezett vagy acilezett származékként, például aminosavakban, peptidekben, enzimekben, vagy akár az emberi szervezet számos neurotranszmitterében (pl.: acetilkolin, dopamin, noradrenalin, szerotonin).



7. ábra: Az acetilkolin és a dopamin szerkezete

A gyógyszeriparban is számos példát találunk. Az 1-feniletánamint (**1**) például számos hatóanyag előállításakor használják rezolválószerként. Ekkor valamelyik enantiomerének segítségével diasztereomer só képzéssel választják el a hatóanyag enantiomereit. Savas karakterű anyagok molekulák esetén alkalmazható úgy, mint az Ibuprofen⁴⁸. A 4-fenilbután-2-amin (**4**) intermediere a Terodiline nevű, vizelettartási problémák ellen kifejlesztett gyógyszernek. Mivel azonban a termék (*R*)-izomere szívritmus zavart, súlyos esetben szívmegállást is okozhat, ezért ezt a hatóanyagot kivonták a forgalomból⁴⁹. Az 1,2,3,4-tetrahidronaftalin-1-amin (**7**) önmagában is hatással van a szimpatikus idegrendszerre, hatása az amfetaminéhoz hasonló, csak enyhébb⁵⁰. Ez a molekula intermediere lehet a Pfizer által kifejlesztett Sertralinnak⁵¹, amely egy szelektív szerotonin visszaszívást gátló antidepresszáns.

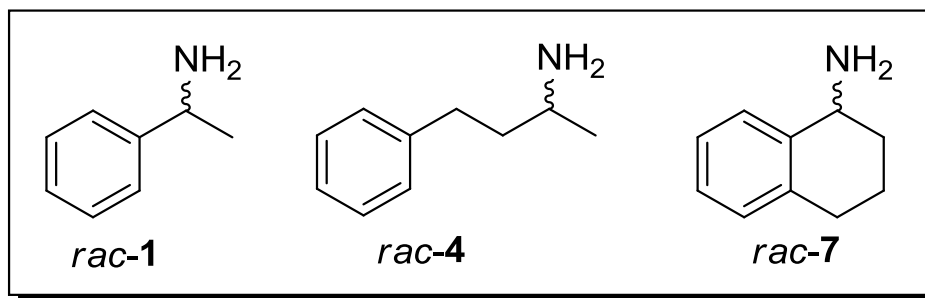
2.7. Alkil- és alkoxi-észterek felhasználása

Az etil-acetátot (**10**) évente több millió tonnás léptékben állítják elő⁵², ennek oka, hogy széles körben alkalmazott szerves oldószer. Emellett lipáz enzimek reakcióiban is elterjedt acilezőszer, mert jó reakciópartner és könnyen beszerezhető. Acilezőszerként használják még az ecetsav további egyszerű alkoholokkal képzett észtereit is, mint például a propil-, izopropil- és butil-acetátot is.

Hatásos acilezőszernek bizonyultak az ecetsav metoxi-csoporttal módosított származékából képzett különböző észterek. Thalén és Bäckvall⁵³ az 1-feniletánamin (**1**) dinamikus kinetikus rezolválását végezték el CaLB enzim és Ru-Shvo komplex jelenlétében. E folyamat során kiinduló acilezőszerként izopropil-acetátot (**12**) alkalmaztak, emellett tesztelték a 2-metoxiecetsav metil-, etil- és izopropil-észterét. Eredményeikből az látszik, hogy a 2-metoxi-észterekkel magasabb enantiomertisztaság (*ee*) és konverzió (*c*) értékeket értek el, mint izopropil-acetáttal (**11**). Több más aminnal is ehhez hasonló dinamikus kinetikus rezolválásokat valósítottak meg izopropil-2-metoxiacetát acilezőszerrel.⁵⁴

3. Eredmények és kiértékelésük

Munkám során célom volt az általánosan alkalmazott etil-acetátnál hatékonyabb új acilezőszer kifejlesztése, majd ennek alkalmazása *Pseudozyma aphidis* által termelt lipáz enzim(ek) összehasonlításában. Modellvegyületként aromás oldalláncú, királis aminokat (8. ábra), 1-feniletánamint (1), 4-fenilbután-2-amint (4), 1,2,3,4-tetrahidronaftalin-1-amint (7) használtam.

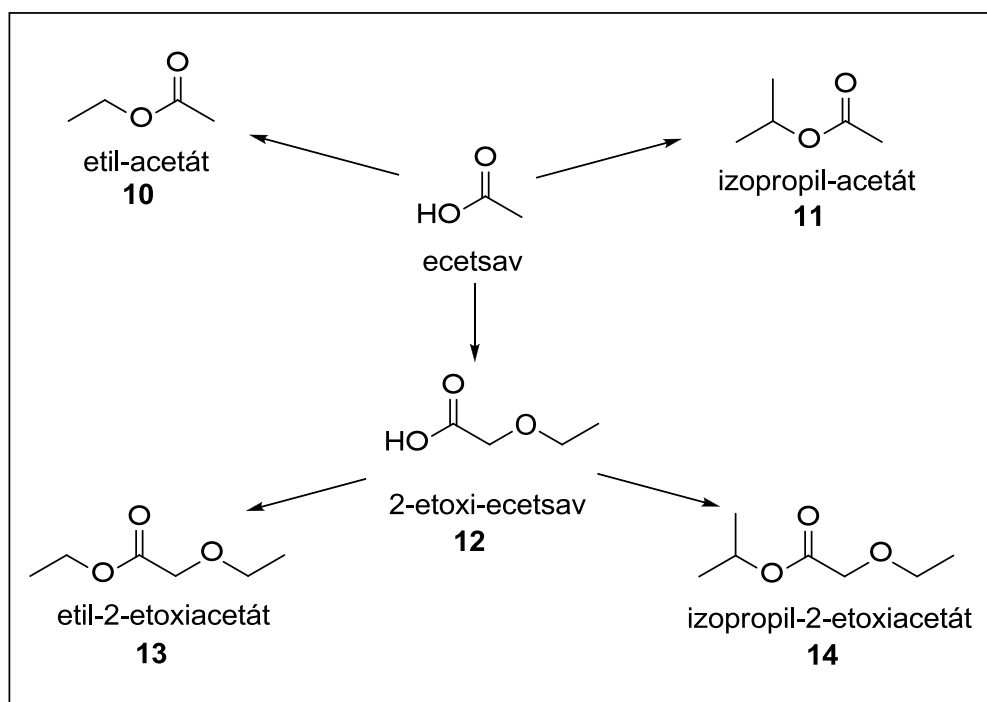


8. ábra: Modellvegyületek: 1-feniletánamin (1), 4-fenilbután-2-amin (4), 1,2,3,4-tetrahiro-naftil-1-amin (7)

3.1. Acilezőszerek fejlesztése

A racém aminok enzimkatalizált kinetikus rezolválásait katalizálni képes enzimek vizsgálatai során általánosan elterjedt acilezőszer az etil-acetát (10). E munka során egyik célom az volt, hogy ennél hatékonyabb acilezőszert keressek, vagy fejlesszek ki. E munka során először az etil-észter helyett izopropil-észtert, vagyis izopropil-acetátot (11) alkalmaztam. Ennek elméleti megfontolása az volt, hogy az izopropil-csoport jobb távozó csoport, mint az etil-csoport, emellett a reverz folyamatok ban való részvételre is kevésbé hajlamos. Ezeket a vegyületeket kereskedelmi forgalomból szereztük be.

A változtatás másik irányvonala a kiindulási sav szerkezetének módosítása volt. Ez akkor lesz előnyös a rezolválás szempontjából, ha az alkalmazott változás hatására a sav karboxil-csoportja elektropozitívabb lesz, vagyis valamilyen elektronszívó csoport bevezetésével csökkentjük a sav metil-csoportjának +I effektusát. Ez kivitelezhető egy alkoxi-csoport⁵⁵ bevezetésével, mert így kihasználhatjuk az oxigén molekula nagyobb elektronegativitását a szénnel szemben ($\text{EN}_\text{O}=3,44$; $\text{EN}_\text{C}=2,55$).

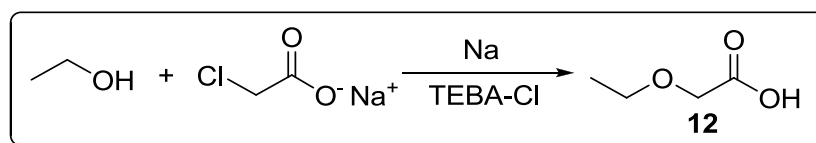


9. ábra: Az acilezőszer-fejlesztés tervezett sémája

Ehhez az ecetsavban a metil csoport egyik hidrogénjét etoxi-csoportra cserélve jutottam a 2-etoxiecetsavhoz (12). Ennek a savnak (12) az etil- és izopropil-észterét képezve kaptam az etil-2-etoxiacetátot (13) és az izopropil-2-etoxiacetátot (14) (9. ábra).

3.1.1. A 2-etoxiecetsav (12) előállítása

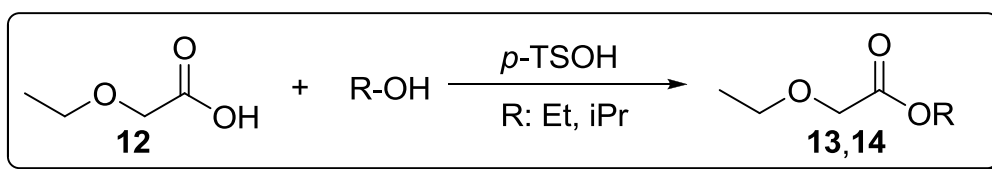
Az etoxi-ecetsav (12) előállítását úgy valósítottam meg, hogy etil-alkoholban fém nátriumot oldottam fel, majd trietil-benzilammónium-klorid (TEBA-Cl) hozzáadása után több részletben klórecetsav nátrium-sóját adtam hozzá és az elegyet refluxáltattam (10. ábra). A reakció végén a feleslegben hozzáadott (oldószerként is használt) etil-alkoholt rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam, majd a nyersterméket feldolgoztam. A reakció jó termeléssel adta a várt terméket (76%), melynek tisztaságát irodalmi törésmutató adatok alapján és NMR vizsgálattal is igazoltam.



10. ábra: A 2-etoxiecetsav előállítása

3.1.2. Etil-2-etoxiacetát (13) és izopropil-2-etoxiacetát előállítása (14)

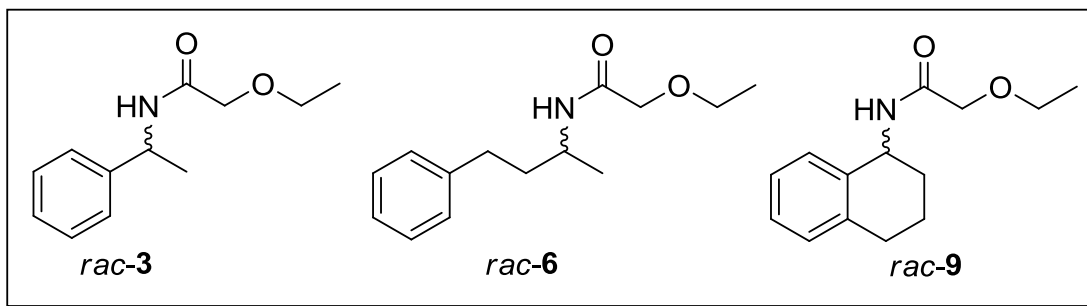
Az új sav (12) etil- és izopropil-észtereinek előállítása hasonló volt (11. ábra). Mindkét esetben a feleslegben lévő alkoholban vízmentes körülmények között feloldottam katalitikus mennyiségű *p*-toluol-szulfonsavat, majd hozzáadtam a 2-etoxiecetsavat (12). Az így kapott elegyet 8 órán át refluxáltattam, majd Vigreux-feltét segítségével atmoszférikus nyomáson desztilláltam. A termékek (13,14) tisztaságát irodalmi törésmutató adatok alapján, NMR és IR vizsgálattal igazoltam, a termelés itt is jónak mondható (73 %, 75 %).



11. ábra: 2-etoxiecetsav (12) észtereinek (13, 14) előállítása

3.2. Racém amidok előállítása

Munkám során a következő feladat a későbbi enzimatisz rezolválási folyamatokban tesztelni kívánt aminok [1-feniletánamin (1), 4-fenilbután-2-amin (4), 1,2,3,4-tetrahidronaftalin-1-amin (7)] racém 2-etoxiacetamidjainak elkészítése volt (12. ábra). Erre azért volt szükség, mert a reakciókat királis állófázisú gázkromatográfiás (Hydrodex β-6TBDM vagy Hydrodex β-TBDAC) módszerrel követtem, amihez referenciaként a racém összetételű termékekre is szükségem volt.

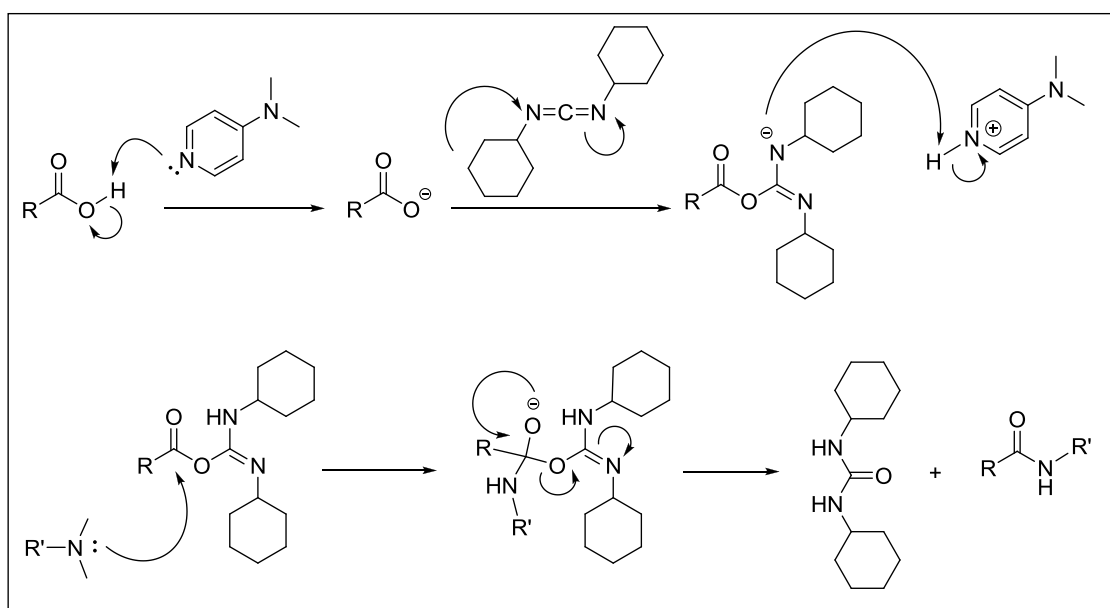


12. ábra: Az előállított etoxi-acetamidok

Mindhárom vegyület esetén hasonló, analitikai léptékben (néhány 100 mg) megvalósított előállítási módot alkalmaztam, amelynek alapja a Steglich reakció⁵⁶

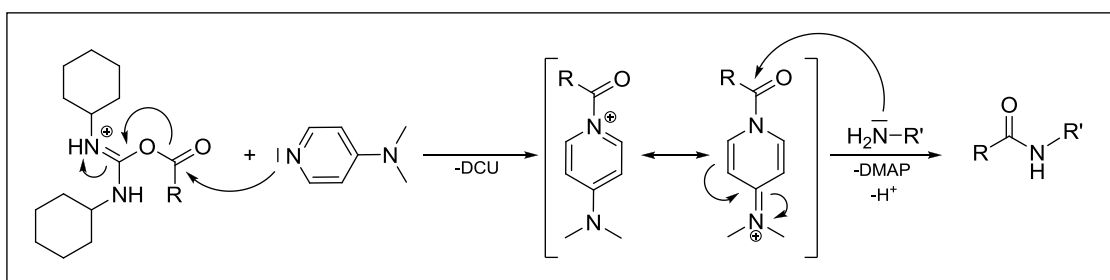
(13. ábra). A Steglich észterezés során a szabad savat a megfelelő alkohollal reagáltatják, 4-dimetilamino-piridin (DMAP) katalizátor és diciklohexil-karbodiimid (DCC) jelenlétében.

Ebben a reakcióban a DCC aktívabbá teszi a szabad savat (O-acil-karbamid), míg a DMAP proton akceptorként és acil-transzferként is funkcionál. Ha az észterezés lassú, mellékreakciók léphetnek el, amelyek csökkentik a termelést és bonyolítják a feldolgozást. Ez legtöbbször 1,3-átrendeződése az O-acil intermediereknek N-acillá, amely képtelen továbbreagálni az alkohollal. Ez a reakció felhasználható alkoholok mellett aminok acilezésére is. Az elreagált DCC diciklohexil-karbamid (DCU) formájában válik ki.



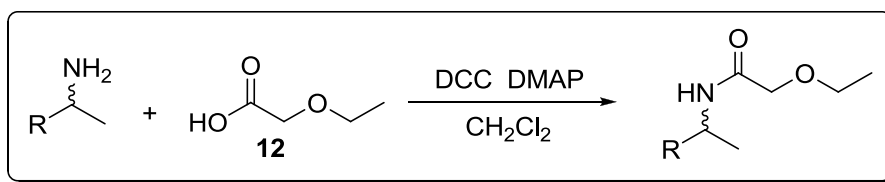
13. ábra: Steglich-reakció mechanizmusa primer aminok esetén

A mellékreakciók visszaszorítását segíti a DMAP, mint acil-transzfer katalizátor. Alkalmazásával kellően gyors lesz a reakció ahhoz, hogy elkerülhessük a nem kívánatos anyagok képződését.



14. ábra: A DMAP működésének mechanizmusa, mint acil-transzfer katalizátor

Összemértem a szabad savat (**12**), a megfelelő racém amint, a DMAP-ot és az oldószerként funkcionáló diklórmetánt. Az elegyet 0°C-ra hűtöttem, majd ezen a hőmérsékleten adtam hozzá a DCC-t, ezután szobahőmérsékleten zajlott le a reakció, amit vékonyréteg kromatográfiával követtem. A reakcióelegy feldolgozása nagyon körülményes, mert pelyhes, lassan ülepedő formában válik ki a DCU. A feleslegben alkalmazott DCC-t további savkatalizált hidrolízissel kellett DCU-vá alakítanom. Mivel egyik etoxi-acetamid előállításánál sem kaptam tiszta terméket a DMAP alkalmazása ellenére sem és a termék extrakcióval nem volt elválasztható a szennyező komponensektől, így oszlopkromatográfiát kellett alkalmaznom.



15. ábra: Racém 2-etoxi-acetamidok előállítása

3.3. Racém aminok kinetikus rezolválása

Az előállított acilezőszerek hatékonyságát enzimkatalizált kinetikus rezolválással vizsgáltam. Ahhoz, hogy a reakciók konverzióját és szelektivitását követni tudjam, kidolgoztuk a szükséges analitikai módszereket. Kutatócsoportunk már évek óta hatékonyan alkalmazza a királis állófázisú gázkromatográfiát olyan reakciók követésére, amelyekben változás történik a komponensek enantiomer-összetételében és a vizsgált anyagok megfelelően illékonyak.

A tesztreakciókat több értékkel jellemeztem, mint például a konverzió és a termékek enantiomerösszetétele. A konverziót (vagyis hogy a kiindulási anyag mekkora része alakul át adott körülmények között) százalékos formában adtam meg. Mivel a vizsgált folyamatokban kiralitás centrummal rendelkező molekulákkal dolgoztam, és fő cél a termelékenység növelése mellett a tiszta enantiomerek előállítása volt, ezért szükségem volt olyan paraméterek alkalmazására, amelyekkel jól jellemezhető az enantioszelektivitás. Ehhez szükséges az enantiomerfelesleg meghatározása is.

Az enantiomer elegyek összetételének jellemzésére általánosan elterjedt érték az enantiomerfelesleg (enantiomeric excess, e.e.), amelyet többnyire százalékos formában adnak meg⁵⁷. Ennek számítását a 16. ábra szemlélteti (ahol X* a főenantiomer móltörtje, X a másik enantiomer móltörtje).

$$e.e. \% = \frac{X^* - X}{X^* + X} * 100$$

16. ábra. Az enantiomerfelesleg számítása

E két értékből meghatározható jellemző adat az E mérőszám (enantiomerszelektivitás), amely egy természetes logaritmus alapú függvényre épül, ahol c a konverzió, ee_p pedig a termék enantiomertisztasága. (17. Ábra). Mivel a függvény⁵⁸ felhasználja számoláshoz mind a konverziót, mind az enantiomer-felesleget, ezért jól reprezentálja a kiralitás centrumot érintő reakciók hatékonyságát. Az enantiomerszelektivitás számértéke lényegében megmutatja, hogy hányszor gyorsabban képződik az egyik enantiomer a másikonál.

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + ee_p)]}{\ln[1 - c(1 - ee_p)]}$$

17. Ábra: E számításának képlete

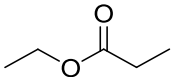
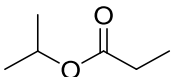
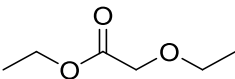
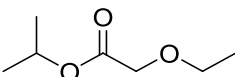
A tesztek során a négy acilezőszert (etil-acetát (**10**), izopropil-acetát (**11**), etil-2-etoxiacetát (**13**), izopropil-2-etoxiacetát (**14**), három különböző racém aminnal (1-feniletán-amin [*rac*-**1**], a 4-fenilbután-2-amin [*rac*-**4**], 1,2,3,4-tetrahidronaftalin-1-amin [*rac*-**7**]), hat különböző CaLB enzimkészítménnyel (Novozym® 435, T2-150, SGA10IBD, G250P, G250O, PAP31A) vizsgáltam, így összesen 72 különböző reakciót végeztem el. Kísérleteimet termosztálható rázógépen 4,0 ml-es teflon zárólemezes, menetes kupak segítségével légmentesen lezárt reakció edényben, 30 °C-ra temperált, 1100 min⁻¹ fordulatszámon működő rázógép segítségével végeztem.

Először az enzimeket mértem be a reakcióedényekbe, tized mg-os pontossággal, hiszen ennek nagyon fontos szerepe van a reprodukálhatóság és az enzim aktivitásának számolásakor. Ez után következett a megfelelő racém amin 50 µl-es, majd számított 2 ekvivalens mennyiségben az adott acilezőszer hozzáadása. Az oldószer minden esetben 1 ml vízmentes toluol volt. A tesztegyegekben 1, 2, 4 óra elteltével 50 µl mintát vettem, majd ezt diklórmétánnal hígítottam 1-2 mg/ml töménységre és királis állófázisú gázkromatográfiával, illetve vékonyréteg kromatográfiával követtem.

Az 2. táblázatba az 1-feniletánaminnal [*rac*-**1**] végzett kísérletek eredményeit foglaltam össze, feltüntetve a jellemzésre használt három fő biokatalitikus paramétert

(konverzió, ee, *E*). A konverzió elméleti maximális értéke 50% lehet, mivel ha kellően enantioszelektív a folyamat, akkor kiindulási racém elegy egyik enantiomere reagál csak, míg a másikra nézve dúsul az elegy. Az enantiomertisztaság 99 % felett nagyon jónak mondható, ekkor 200 átalakult molekulából 199 a kívánt térállású, és csupán egy a számunkra „szennyező” enantiomer. A mérési hibákra való érzékenység miatt egy adott érték felett az *E* értéket általában nem konkrét számként adják meg. Ennek megfelelően én is tartományokat adok meg, a 100-200 tartományba eső értékeket >100, a 200-500 tartományba eső értékeket >200 és az >500 értékeket »200 értékeként tüntettem fel.

2. táblázat: Az 1-feniletánammal (**1**) végzett 1 órás tesztek eredményei

No.	Acilezőszer	Enzim	<i>c</i> (%)	<i>ee</i> _{(R)-NHAc} (%)	<i>E</i>
1	 etil-acetát (10)	Novozym® 435	9,8	99,92	»200
2		T2-150	2,0	99,59	>200
3		SGA10IBD	0,8	99,08	>200
4		G250P	4,4	99,83	»200
5		G250O	1,5	99,49	>200
6		PAP31A	5,0	99,84	»200
7	 izopropil-acetát (11)	Novozym® 435	16,5	99,95	»200
8		T2-150	4,1	99,83	»200
9		SGA10IBD	1,1	99,37	>200
10		G250P	8,9	99,93	»200
11		G250O	2,9	99,78	»200
12		PAP31A	9,7	99,94	»200
13	 etil-2-etoxiacetát (13)	Novozym® 435	40,7	99,45	»200
14		T2-150	14,4	99,01	>200
15		SGA10IBD	1,6	90,74	21
16		G250P	28,6	99,33	>200
17		G250O	6,1	97,48	83
18		PAP31A	39,4	99,50	»200
19	 izopropil-2-etoxiacetát (14)	Novozym® 435	47,0	99,60	»200
20		T2-150	36,1	99,93	»200
21		SGA10IBD	7,0	99,94	»200
22		G250P	46,2	99,86	»200
23		G250O	28,6	99,95	»200
24		PAP31A	47,8	99,66	»200

A táblázat második oszlopában tüntettem fel az alkalmazott acilezőszert. Az 1-6. számú sorban az etil-acetáttal (**10**) kapott eredményeket gyűjtöttem össze. Ezekről elmondható, hogy a konverzió legjobb esetben is (Novozym® 435) csak 9,8 %-ot ért el, azonban volt, ahol ez az érték csak 0,8 % volt (SGA10IBD). Az *ee* és *E* értékek minden esetben jónak mondhatók, kiemelkedő (*ee*>99,9 %) értéket a kereskedelmi forgalmú Novozym® 435 esetén értünk el ezzel az acilezőszerrel.

Az ecetsav izopropil-észterét (**11**) vizsgálva a konverzió értékeken jól látható, hogy mindegyik az előzőekben tapasztaltak duplája. Az 5. oszlop *ee*_{(R)-NHAc} értékein is jelentős javulás látható, hiszen az eddigi egy reakció esetén előforduló 99,9 %-nál nagyobb *ee*_{(R)-NHAc} itt már három készítménynél is előfordult (Novozym® 435, G250P, PAP31A). Az *E* értékeknél esetén is hasonló javulás tapasztalható, »200 a hatból öt esetben, az eddigi három helyett.

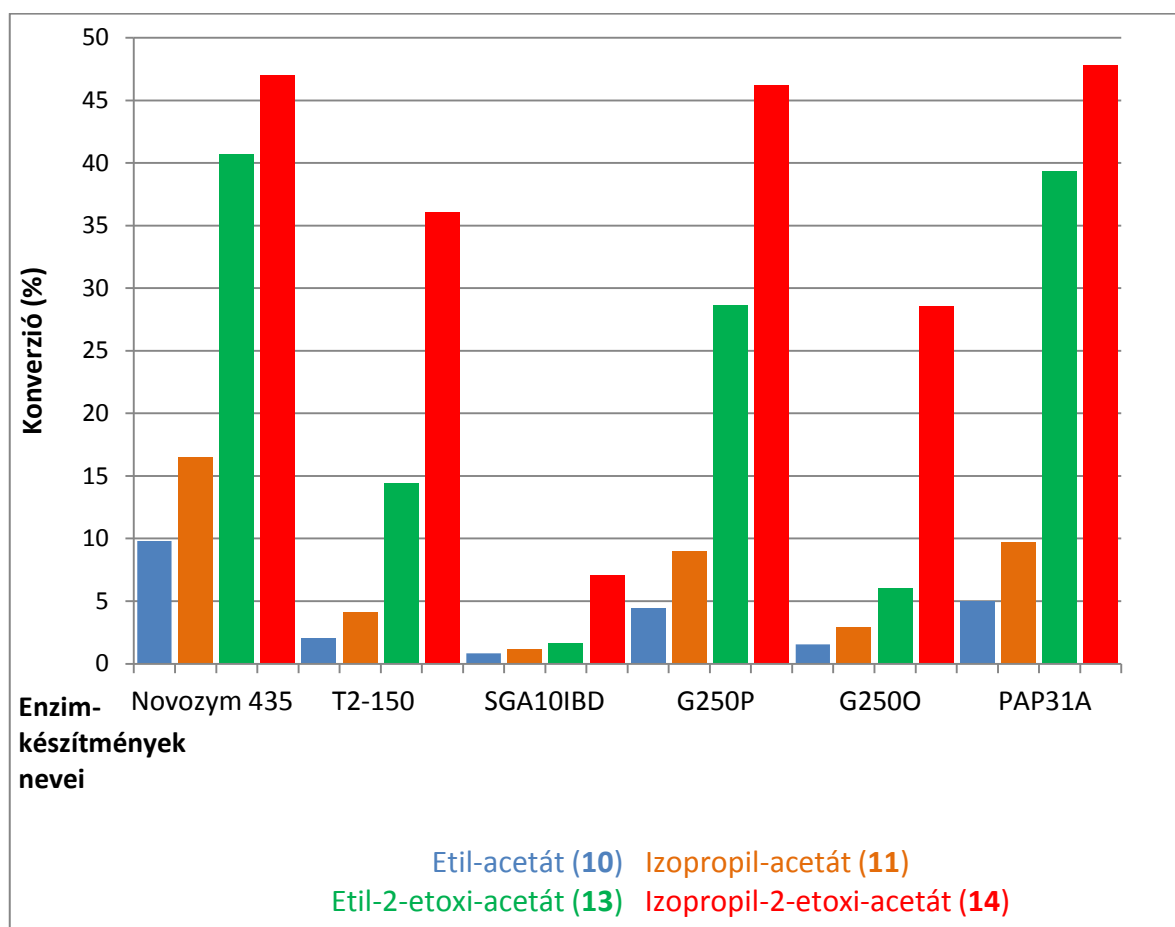
A 13-18. sorszámmal már a 2-etoxiecetsav (**12**) etil-észterének eredményeit láthatjuk. Itt még az eddig tapasztaltaknál is nagyobbak az eltérések, hiszen a konverzió értékeknél átlagban mintegy 6-7-szeres növekedést tapasztalunk az etil-acetáthoz (**10**) képest (ez a PAP31A-nél közel nyolcszoros). Emellett azonban az *ee*_{(R)-NHAc} és *E* értékeket vizsgálva ezekben jelentős mértékű csökkenést tapasztalunk. Csupán négy készítmény esetén tapasztalható, hogy *ee*_{(R)-NHAc}>99 %, sőt a leggyengébb eredményeket produkáló SGA10IBD jelzésűnél ez az érték csupán 90,74 %. Az *E* számok is hasonló tendenciát mutatnak, két esetben el sem éri a százat (*E*_{SGA10IBD}=21, *E*_{G250O}=83). A szelektivitás csökkenésének oka az, hogy ezekben az esetekben kismértékű kémiai acilezés is zajlott az enzimreakciókkal párhuzamosan.

Az utolsó hat reakciónál (19-24.) ugyanennek a savnak az izopropil-észterét, az izopropil-2-etoxiacetátot (**14**) vizsgáltam. Ez az észter minden tekintetben felülmúlta az eddigi három tesztelt acilezőszert, hiszen a konverziók átlagban 15-ször magasabbak voltak (a G250O enzimkészítménynél >19-szeres javulás). Emellett az enantiomer szelektivitást jellemző értékek is kiválóak voltak, hiszen szintén három készítmény esetén tapasztaltam >99,9 % *ee*_{(R)-NHAc} értéket (T2-150, SGA10IBD, G250O) és az összes reakcióban az *E* értéke »200 volt. A jó eredmények oka az is hogy ezzel az észterrel nem tapasztalható a zavaró kémiai acilazás.

Jól látható tehát, hogy aminok kinetikus rezolválása során az izopropil-csoport mennyivel hatékonyabbá teszi az acilezőszert, legyen szó akár az ecetsavval vagy a 2-etoxiecetsavval (**12**) képzett észteréről. Az etil-acetátnál az izopropil-acetát mintegy 2-3-szoros konverzióbeli javulást okoz, emellett a másik két paraméter is minden esetben

jobb lett. Ha összehasonlítjuk az etil-2-etoxiacetátot (**13**) és az izopropil-2-etoxiacetátot (**14**), akkor is kitűnnek az izopropil-csoport előnyös hatásai, hiszen itt is minden esetben jóval nagyobb konverzió és jobb enantio-szelektivitási értékeket kaptam. Tehát amellett, hogy az izopropanol az enzimreakcióban jobb távozó csoport, mint az egy szénnel kevesebbet tartalmazó társa, az etanol, az észterek eltérő kémiai reaktivitása és az izopropil-észter kisebb kémiai reaktivitása is fontos.

Az alkil és alkoxi oldalláncú savak (ecetsav és 2-etoxiecetsav (**12**)) konverzió értékeit összevetve jól látszik, hogy az elektronszívó etoxi-csoport bevezetése előnyös hatású a produktivitásra. Az etil-észternél 6-8-szoros, izopropil-észternél akár 6-10-szeres növekedést tapasztalunk a 2-etoxiecetsav (**12**) javára. Az etoxi-észterek közül az izopropil-észter (**14**) sokkal jobb enantioszelektivitású folyamatokat eredményezett, ami főleg a kisebb aktivitású, lassabb enzimkészítményeknél mutatkozott meg (pl. SGA10IBD). Ennek fő oka az lehet, hogy a lassabb reakciónál jobban előtérbe kerülhet az etilészterrel (**13**) tapasztalható kémiai acilezés. Ezt az is alátámasztja, hogy míg az etil-2-etoxiacetát (**13**) bomlékony, addig az izopropil-2-etoxiacetát (**14**) jóval stabilabb.



1. diagram: Az 1-feniletánaminnal [*rac*-1] elért 1 órás konverziók

Az 1. diagramon ábrázoltam a legegyszerűbb modell amin [*rac*-1] 1 órás tesztjeinek konverzió értékeit. A szemléletesség érdekében egy adott enzimkészítmény eredményeit négyes csoportokban, egymás mellett tüntettem fel. A csoportokban az acilezőszerek ilyen sorrendben követik egymást: etil-acetát (**10**), izopropil-acetát (**11**), etil-2-etoxiacetát (**13**), izopropil-2-etoxiacetát (**14**). Az ábrázolt értékekből is jól látszik, hogy a csoportokon belül balról-jobbra nőnek a konverzió értékek és kivétel nélkül minden kvartettből az izopropil-2-etoxi-acetáttal (**14**) (jobb szélső, piros oszlopok) érhető el a legjobb eredmény, vagyis ez a legaktívabb acilezőszer.

3.4. *Pseudozyma aphidis* lipáz aktivitásának vizsgálata

Célom volt, hogy a Fermentia Kft. (felelős személy: Dr. Sátorhelyi Péter) által különböző tápoldatokon *Pseudozyma aphidis* által termelt lipáz enzim(ek) aktivitását és szelektivitását összehasonlítsam. Ennek vizsgálatára szintén az eddig alkalmazott kinetikus rezolválást használtam. Ezen enzim(ek) jellemzése során csak az 1-feniletánamin [*rac*-1] szubsztráttal végeztem a kísérleteket. Mivel az előzetes vizsgálatok során egyértelművé vált, hogy az izopropil-2-etoxiacetát (**14**) a leghatékonyabb acilezőszer, ezért kizárólag ezzel dolgoztam tovább. Ennek azért van jelentősége, mert kellően hatékony reagenssel a kisebb aktivitású enzimek is már rövid idő alatt vizsgálhatók, nem kell több napot várni, míg mérhető és reprodukálható aktivitást tapasztalunk.

3.4.1. Az alkalmazott táptalajok összetétele

A fermentációk során alkalmazott tápoldatok mindegyike tartalmazta a mikroorganizmusok szaporításához elengedhetetlen tápanyagokat (szén-, nitrogén- és foszforforrások), azonban azokat különböző formában és arányban, illetve különböző mennyiségben és minőségben szervesetlen ionokat (3-4. táblázat). Az üres cellák azt jelentik, hogy nem tartalmazott komponenst az adott táptalaj, a számértékek gramm/liter koncentrációban értendők. A pH ezek közül kivétel, mert ahol nincs feltüntetve pontos szám, ott a fermentációs elegyet nem pufferálták, vagyis a komponensek hatására alakul ki a pH, ami jellemzően 6,2-6,4 között változik.

3. táblázat: A *Pseudozyma aphidis* tápoldatok összetétele (az adatok gramm/liter mértékegységben értendők)

Komponens	M-12	M-3	M-4	M-5	M-6	M-6 pH	Lip-1	Lip-2	Lip-4
glükóz	10		120		40	40			
glicerín		6							
kristálycukor							10		10
olívaolaj	5	5		40			10	10	5
élesztő kivonat	10	10	1	1	1	1			1
kukoricaliszt								15	
kukoricalekvár (50%)								2	3
szójaliszt							2,5		5
pepton	10	10							
NH ₄ Cl	5	5							
MgSO ₄ ·7H ₂ O			0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5
NaNO ₃					3	3	0,5		1
KNO ₃								0,5	
KH ₂ PO ₄			0,3	0,3	0,3	0,3	2	2	1
CaCO ₃							2	2	
(NH ₄) ₂ HPO ₄							1,5	1,5	1
NaCl							0,5	0,5	0,5
Tween-80							1	2	1
nyomelem oldat-1							0,5	0,5	0,5
nyomelem oldat-2							0,5	0,5	0,5
pH						6,0			5,5

4. Táblázat: A nyomelem oldatok összetétele

	Szervetlen só	Koncentráció [g/l]
Nyomelem oldat-1	MnSO ₄	1,6
	ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	3,4
	CoCl ₂ × 6 H ₂ O	2,0
Nyomelem oldat-2	FeSO ₄ × 7 H ₂ O	5,0

3.4.2. Új enzimmészítmények előállítása és lipáz aktivitásának vizsgálata

A különböző táptalajokon szaporított *Pseudozyma aphidis* mintákat lecentrifugálták, majd a sejtmentes felülúszót két részre szedték. Az egyik részt oktil- (Oct), a másikat fenil-csoporttal (Phe) felületmódosított szilikagélre rögzítettem

adszorpciós módszerrel, a hordozót vákuumszűréssel távolítottam el, majd felületét izopropanollal és n-hexánnal mostam.

Az így kapott új enzimkészítményeket a táptalaj kódja és a felületmódosításra alkalmazott csoport három betűs kódja alapján neveztem el (oktil-: Oct M12, Oct M3, Oct M4, Oct M5, Oct M6, Oct M6pH, Oct Lip1, Oct Lip2, Oct Lip4; fenil-felületmódosított szilikagél alapú enzimkészítmények: Phe M12, Phe M3, Phe M4, Phe M5, Phe M6, Phe M6pH, Phe Lip1, Phe Lip2, Phe Lip4).

A lipáz termelőképességi elemzéseket ugyanolyan körülmények között végeztem, mint az acilezőszer tesztek (termosztálható rázógépen, 4,0 ml-es teflon zárólemezes, menetes kupak segítségével légmentesen lezárt reakció edényben, 30 °C-ra temperált, 1100 min⁻¹ fordulatszám). Az enzim bemérése (tized mg-os pontossággal) után az izopropil-2-etoxiacetátot (**14**), az 1-feniletánamint [*rac*-**1**] és végül az 1 ml vízmentes toluolt mértem be a 4 ml-es reakcióedényekbe. A mintavételezés és az alkalmazott analitika teljes egészében megegyezett az eddig alkalmazottal (vékonyréteg- és királis állófázisú gázkromatográfia (Hydrodex β-6TBDM)).

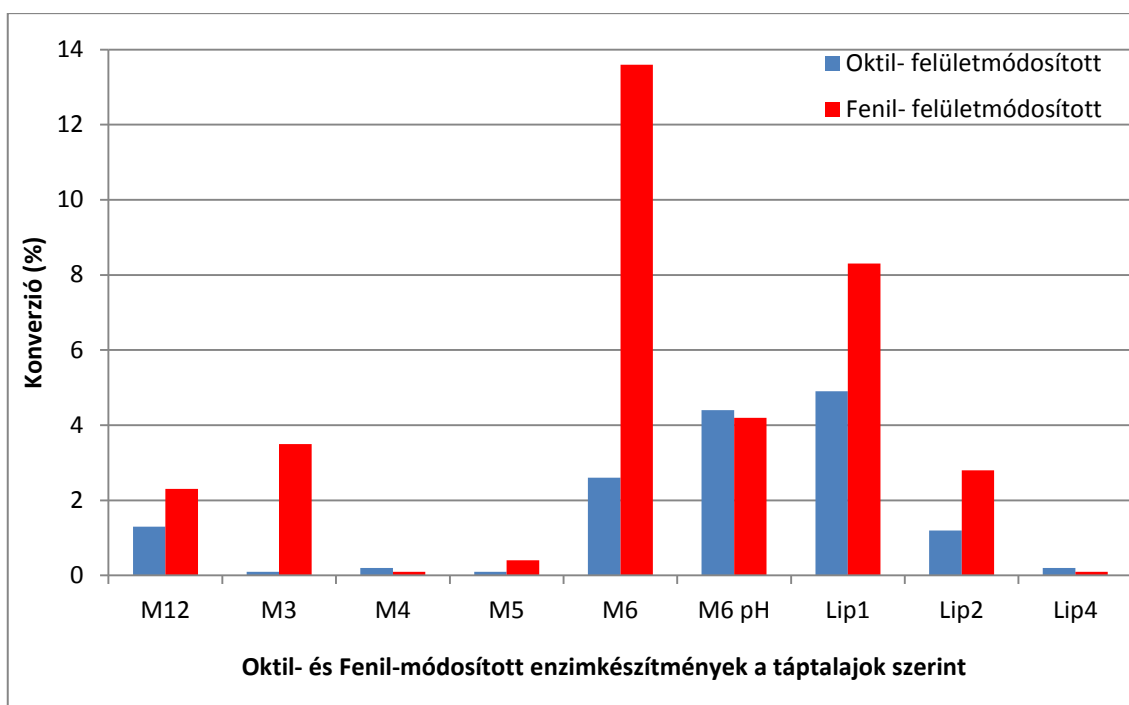
3.4.3. A felületmódosítás hatása az enzimaktivításra

A 5. táblázatban összefoglaltam a 2 órás reakcióidő után kapott eredményeket. Ha megfigyeljük az oktil-csoporttal módosított enzimkészítmények konverzió értékeit, akkor az Oct M6, Oct 6pH és az Oct Lip1 nevei mellett szerepelnek a legnagyobb számok. Ha ehhez hozzávesszük a táblázat utolsó két oszlopának eredményeit akkor egyértelművé válik, hogy ezen három készítmény közül az Oct Lip1 jelzésű a legjobb, hiszen itt az $ee_{(R)\text{-NHAc}}$ 99,62 %, illetve az $E \gg 200$, amelyek kitűnő értékek. Ezzel szemben az Oct M6pH, amely konverzióban csak 0,5 százalékponttal maradt el az Oct Lip1-től, enantioszelektivitási paraméterekben már sokkal rosszabb eredményeket produkált ($ee_{(R)\text{-NHAc}} = 89,98 \%$; $E=20$). A többi készítmény közül egyedül az Oct Lip2 jelzésű produkált jónak mondható értékeket enantioszelektivitás terén ($ee_{(R)\text{-NHAc}} = 98,46 \%$; $E > 100$), azonban konverziója épphogy negyede ($c_{\text{Oct Lip2}}=1,2 \%$) volt a legproduktívabb Oct Lip1-nek. Összefoglalva az oktil-csoportot tartalmazó szilika hordozós enzimek konverzió terén átlagban 1,7 %-ot, míg $ee_{(R)\text{-NHAc}}$ terén 88,16 %-ot értek el.

5. táblázat: Az új enzimkészítményekkel kapott eredmények 2 órás reakcióidő után

No.	Enzim	<i>c</i> (%)	<i>ee</i> _{(R)-NHAc} (%)	<i>E</i>
1	Oct M12	1,3	70,67	6
2	Oct M3	0,1	74,19	7
3	Oct M4	0,2	92,85	27
4	Oct M5	0,1	89,91	19
5	Oct M6	2,6	92,57	27
6	Oct M6pH	4,4	89,98	20
7	Oct Lip1	4,9	99,62	»200
8	Oct Lip2	1,2	98,46	>100
9	Oct Lip4	0,2	85,22	13
10	Phe M12	2,3	86,78	14
11	Phe M3	3,5	91,29	23
12	Phe M4	0,1	92,98	28
13	Phe M5	0,4	95,06	40
14	Phe M6	13,6	97,65	98
15	Phe M6pH	4,2	98,50	>100
16	Phe Lip1	8,3	99,70	»200
17	Phe Lip2	2,8	99,12	>200
18	Phe Lip4	0,1	73,92	7

A fenil-csoporttal módosított hordozókon rögzített készítmények már első ránézésre is jobb értékeket értek el, mint az oktil-szilikán rögzített megfelelőik. Itt a konverzió tekintetében a Phe M6 jelzésű messze kiemelkedik a többi közül, hiszen csak ezzel a készítménnyel értünk el tíz százalék feletti konverziót, szám szerint 13,6 %-ot. Itt is nagyon jó eredményt ($c_{\text{Phe Lip1}} = 8,3 \%$) ért el a Lip1-es táptalajon termelt lipázból készített termék, a Phe Lip1. Megfigyelhető, hogy a fenil-csoporttal vagy hasonló konverzió értékeket kaptam, mint oktil-csoport esetén (M4, M6pH, Lip4), vagy annál jóval magasabbakat produkáltak ezek a készítmények (M12, M3, M5, M6, Lip1, Lip2). Ezt szemlélteti a 2. diagram.



2. diagram: Konverzió értékek alakulása az enzimkészítmények függvényében

Az enantiomerfelesleg értékek tekintetében is felülmúlták az aromás oldalláncú felületmódosítással elérhető eredmények a nyílt láncúval elérhetőket. Két készítmény (Phe Lip1, Phe Lip2) esetén is kiváló $>99\%$ $ee_{(R)\text{-NHAc}}$ értékeket kaptam, emellett a szelektivitás (E érték) is egy táptalajt (Lip4) leszámítva minden esetben magasabb volt. A fenil-szilika adszorpciós eredmények szintén azt igazolták, hogy a Lip1 jelzésű táptalajon sikerült a legszelektívebb lipázkészítményt termeltetni ($ee_{(R)\text{-NHAc}} = 99,70\%$, $E \gg 200$). Minden szempontot összevetve a leghatékonyabb készítménynek a Phe Lip1 jelzésűt tekinthetjük, mivel annak ellenére, hogy konverzió terén 5,4 százalékponttal elmarad Phe M6 jelzésűtől, szelektivitás terén magasan felülmúlja azt.

Összefoglalva elmondható, hogy a fenil-csoporttal módosított szilikagél alapú hordozókra adszorpciós technológiával rögzített enzimkészítmények minden szempontból (konverzió, ee , E) felülmúlták az oktil-csoport által produkált eredményeket. Az előállítottak közül leghatékonyabb készítménynek a Phe Lip1 jelzésű adódott, minden paraméter esetén kiváló értékeket ért el ($c = 8,3\%$; $ee_{(R)\text{-NHAc}} = 99,70\%$; $E \gg 200$).

Az itt elért eredmények teljesen egybevágnak az ezzel a TDK munkával párhuzamosan végzett kutatásból származó eredményekkel⁵⁹, mely szerint a *Candida antarctica* A és B lipázok (CaLA és CaLB) közül a szelektív CaLB is jobban adszorbeálódik fenil-módosított szilikagél hordozón, mint oktil-funkcionalizálton. A

CaLA és CaLB enzimek keverékéből végzett adszorpció során a fenil-hordozóval elért szelektivitás rendre magasabb volt az oktilénál, jelezve, hogy a fenil-hordozón a szelektív CaLB enzim jobb arányban rögzül. Mivel a *Pseudozyma aphidis* közeli rokona a *Candida antarctica*-nak, feltételezhető, hogy ez a gomba is legalább kétféle, eltérő biokatalitikus tulajdonságokkal rendelkező lipázt termel, melyek közül a szelektívebb CaLB szerű inkább a fenil-hordozókon rögzül. Ez magyarázza az azonos táptalajon termelt lipázokkal különböző hordozókon elért szelektivitás különbségeket.

3.4.4. Táptalaj összetevőinek hatása az enzimkészítmények aktivitására

A táptalajok összetétele nagymértékben befolyásolta a *Pseudozyma aphidis* által termelt lipáz enzim(ek) hatékonyságát. Az eredményekből egyértelműen kitűnik, hogy három táptalaj (M6, M6pH, Lip1) kedvez a lipáz termelésnek, hiszen ezekben mind a három biokatalitikus szempontból fontos paraméter (c ; $ee_{(R)\text{-NHAc}}$; E) jó értékeket ért el. A magas konverzió értékek a táptalaj NO_3^- -tartalmával hozható összefüggésbe, hiszen az M1-M5 jelzésűek nem tartalmaztak ebből az ásványi ionból, így a legmagasabb konverzió érték 3,5 % (Phe M3) volt ezek közül. Ezzel szemben a nitrát-tartalmúak közül a Phe M6 13,6 %-ot ért el. A konverzióra még a pH-nak is nagy hatása van, az M6 és M6pH jelzésűek csupán a pH-ban különböznek, 6,2-6,4 helyett 6,0 a pH az utóbbi esetén. Ez a Phe-csoporttal történt módosításnál szemléletes, mert a konverzió 13,6 %-ról 4,2 %-ra csökkent. Vagyis a pH csökkentése magával vonja a konverzió csökkenését is. Ezt alátámasztja a Lip4 jelzésű táptalaj is, hiszen a nem pufferált 6,2-6,4-es pH helyett itt csak 5,5 a pH (még savasabb, mint az M6pH), de összetételében alig különbözik a Lip1-től, eredményeit tekintve mégis jelentősen elmarad ez utóbbitól. Az eddig tapasztaltaknak megfelelően a savasabb pH hatására még kisebb konverzió értékeket kaptam ($c_{\text{Oct Lip4}} = 0,2 \%$; $c_{\text{Phe Lip4}} = 0,1 \%$).

Mint már fentebb említettem, a *Pseudozyma aphidis*-ből feltételezhetően legalább két lipáz izolálható, a CaLA-hoz és a CaLB-hez hasonló enzimek. A kutatócsoport előzetes tesztjei igazolták, hogy míg a CaLB rendkívül magas enantiomerszelektivitással alakítja át a racém 1-feniletánamint (R)-konfigurációjú amiddá, addig a CaLA kevésbé szelektíven az ellentétes enantiomer, az (S)-konfigurációjú amid képződését katalizálja. Ez a különbség csak akkor mutatkozik meg, ha az általam is használt izopropil-2-etoxiacetátot alkalmazzuk acilezőszerként,

mivel etil-acetát alkalmazása esetén a csökkent aktivitás miatt a CaLA egyáltalán nem acilezi az 1-feniletánamint [*rac*-1].

Az enantioszelektivitás tekintetében mindkét felületmódosítás esetén kitűnnek a Lip1 és Lip2 jelzésű táptalajok eredményei ($ee_{(R)\text{-NHAc}}$: Oct Lip1= 99,62 %, Oct Lip2=98,46 %; Phe Lip1= 99,70 %; Phe Lip2= 99,12 %). Ezek a táptalajok az „M”-el kezdődőektől alapvetően abban különböznek, hogy tartalmazznak olívaolajat. Így a Lip4 jelzésű is tartalmaz olívaolajat, de valószínűsíthető, hogy az ezen a táptalajon termeltetett lipázokból előállított enzimkészítmények eredményei ($ee_{(R)\text{-NHAc}}$: Oct Lip4= 85,22 %; Phe Lip4= 73,92 %) azért maradtak el jelentősen a Lip1 és Lip2-től, mert a savas pH a konverzió mellett az enantioszelektivitást is nagymértékben rontja, amellett, hogy kedvezhet az alacsonyabb szelektivitású enzim termelődésének is. Az *E* értékek is a Lip1 és Lip2 jelzésű táptalajok esetén lettek a legjobbak, ez nem meglepő, hiszen ez a jellemző szorosan összefügg az eddig vizsgált két értékkel.

Összefoglalva megállapítható, hogy a nitrát-ionok előnyös hatással vannak lipáz termelés mértékére, illetve ahhoz hogy kellően szelektív és aktív enzimkészítményt kapjunk, elengedhetetlen a táptalaj olívaolaj tartalma is. Az optimális pH a semleges értékhez közel található. A *Pseudozyma aphidis* lipáz termelése szempontjából leghatékonyabb a Lip1 jelzésű tápközeg volt.

4. Kísérleti rész

4.1. Felhasznált anyagok

A munkám során a felhasznált anyagok, 1-feniletánamin, 4-fenilbután-2-amin, 1,2,3,4-tetrahidro-naftilin-1-amin, *n*-hexán, etil-acetát, izopropil-acetát, toluol, diklórmétán, etil-alkohol, izopropil-alkohol, *p*-toluol-szulfonsav, fém nátrium, klórecetsav nátrium-só, trietil-benzilammónium-klorid (TEBA-Cl), 4-dimetilaminopiridin, *N,N'*-diciklohexil-karbodiimid, a Sigma-Aldrich, a Fluka, a Merck, az Alfa Aesar, a Reanal és a Molar Chemicals termékei, az oldószereket frissen desztillálva használtam fel. Az enzimek közül a Novozym® 435 a Novozymes Denmark terméke, CaLB T2-150 a Chiral Vision BV száraz akril gyöngyökre kovalensen kötött CaLB enzime, az SGA10IBD, a G250P, a G250O és a PAP31A a kutatócsoport saját készítésű, különbözőképpen rögzített CaLB enzimkészítményei^{37,39,59}.

4.2. Analitikai módszerek

Vékonyréteg kromatográfiához Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) típusú lapokat használtam. A megjelenő foltok azonosítására UV fényt (Vilber Lourmat VL-6.LC, 254 nm és 365 nm) és foszformolibdénsav (Fluka) 5%-os vízmentes etanolos (Molar Chemicals) oldatát, majd melegítést alkalmaztam. Az ¹H és ¹³C NMR felvételek Bruker DRX-500 típusú spektrométeren készültek (500 és 300 MHz). Oldószerként CDCl₃-t és DMSO-t használtunk, a kémiai eltolódásokat TMS-hoz (tetrametil-szilán), mint belső standardhoz viszonyítottuk. A gázkromatográfiás méréseket Agilent 4890 és 5890 készülékeken végeztem, Hydrodex β-6TBDM (25m × 0,25 mm × 0,25 mm film, *t*-butil-dimetilszililezett β-ciklodextrin; Macherey&Nagel) és Hydrodex β-TBDAC (25 m × 0,25 mm × 0,25 mm film, acetilezett és *t*-butil-dimetilszililezett β-ciklodextrin; Macherey&Nagel) enantiomer szelektív királis állófázist tartalmazó kolonnákkal. Vivőgázként hidrogént használtam (fejnyomás 12 psi, split 50 : 1). Injektor és FID detektor hőmérséklete: 250 °C. A reakciók követéséhez a GC-hez szükséges mintákat közvetlenül a reakcióelegyből vettem, majd diklórmétánnal hígítottam megfelelő koncentrációra (1-2 mg/ml).

4.2.1. GC programok

GC programok és retenciós idők az 1-feniletánamin (**1**) és származékainak mérésekor Hydrodex β -6TBDM kolonnával.

(*R*)-1-feniletánamin [(*R*)-**1**]:

GC (Hydrodex β -6TBDM; 100 °C – 180 °C, 4 °C / perc, 180 °C-on 5 perc):

4,35 perc

(*S*)-1-feniletánamin [(*S*)-**1**]:

GC (Hydrodex β -6TBDM; 100 °C – 180 °C, 4 °C / perc, 180 °C-on 5 perc):

4,44 perc

(*R*)-2-etoxi-N-(1-feniletil)acetamid [(*R*)-**3**]:

GC (Hydrodex β -6TBDM; 100 °C – 180 °C, 4 °C / perc, 180 °C-on 5 perc):

18,40 perc

(*S*)-2-etoxi-N-(1-feniletil)acetamid [(*S*)-**3**]:

GC (Hydrodex β -6TBDM; 100 °C – 180 °C, 4 °C / perc, 180 °C-on 5 perc):

18,74 perc

GC programok és retenciós idők az 1-feniletánamin (**1**) és származékainak mérésekor Hydrodex β -TBDAc kolonnával.

(*R*)-1-feniletánamin [(*R*)-**1**]:

GC (Hydrodex β -TBDAc; 100 °C – 180 °C, 8 °C / perc, 180 °C-on 5 perc):

4,80 perc

(*S*)-1-feniletánamin [(*S*)-**1**]:

GC (Hydrodex β -TBDAc; 100 °C – 180 °C, 8 °C / perc, 180 °C-on 5 perc):

4,96 perc

(*S*)- N-(1-feniletil)acetamid [(*S*)-**3**]:

GC (Hydrodex β -TBDAc; 100 °C – 180 °C, 8 °C / perc, 180 °C-on 5 perc):

11,28 perc

(*R*)- N-(1-feniletil)acetamid [(*R*)-**3**]:

GC (Hydrodex β -TBDAc; 100 °C – 180 °C, 8 °C / perc, 180 °C-on 5 perc):

11,51 perc

4.3. A 2-etoxiecetsav és származékainak előállítása

4.3.1. 2-etoxiecetsav (12) előállítása

A 2-etoxiecetsav (12) előállítását 500 ml-es gömblombikban végeztem. 250 ml vízmentes etil-alkoholban feloldottam fém nátriumot (5,00 g; 0,217 mol), majd trietil-benzilammónium-kloridot (0,50 g; 0,018 mol), végül klórecetsav nátrium sóját (20,00 g; 0,172 mol) kis részletekben, majd a reakcióelegyet 8 órán át refluxáltattam. Ezután rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam az alkoholt, a maradékot 200 ml desztillált vízben oldottam fel folyamatos kevertetés mellett. A vizes oldatot pH $\approx$ 2-ig savanyítottam 5 N-os sósavval, ezután háromszor 100 ml etil-acetáttal extraháltam. Az egyesített etil-acetátos fázisokat 50 ml telített NaCl oldattal mostam, majd MgSO₄-on szárítottam. Az oldószert rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A termék (12) enyhén sárgás folyadék, tisztaságát törésmutató és NMR vizsgálattal igazoltam.

2-etoxiecetsav (12): 13,68 g; 76 %; sárgás folyadék

$$n_D^{20}=1,4190$$

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1,227 (3H, t, $J=6,970$ Hz, CH₃); 3,593 (2H, q, $J_1=6,782$, $J_2=7,158$, CH₂); 4,094 (2H, s, CH₂); 8,272 (1H, s, OH)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ ppm): 14,999 (CH₃); 67,495 (CH₂); 67,602 (CH₂); 175,222 (CO)

IR (cm⁻¹; film): 2979,29; 2898,10; 1725,16; 1429,58; 1349,56; 1205,07; 1113,45; 1030,94; 1008,10; 877,14; 847,77; 669,26

4.3.2. Etil-2-etoxiacetát (13) előállítása

Egy kihevített 500 ml-es gömblombikba bemértem 250 ml vízmentes etil-alkoholt, majd hozzáadtam 2-etoxiecetsavat (12) (14,0 g; 0,136 mol; 12,73 ml) és 0,02 ekvivalens *p*-toluol-szulfonsavat (0,464 g; 2,688 mmol). Az elegyet 8 órán át refluxáltattam. A maradék oldószert atmoszférikus nyomáson Vigreux-feltét alkalmazásával desztilláltam, majd ismét felvettem 50 ml etil-alkoholban és újra desztilláltam.

etil-2-etoxiacetát (**13**): 14,35 g, 73 %, forráspont: 156 °C, enyhén sárgás folyadék

$$n_D^{20} = 1,4022$$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1,206 (3H, t, $J=6,970$ Hz, CH_3); 1,240 (3H, d, $J=7,158$ Hz, CH_3); 3,550 (2H, q, $J_1=6,970$ Hz, $J_2=7,158$ Hz, CH_2); 4,018 (2H, s, CH_2); 4,174 (2H, m, $J_1=7,158$ Hz, $J_2=7,158$ Hz, CH_2)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 14,186 (CH_3); 14,967 (CH_3); 60,780 (CH_2); 67,148 (CH_2); 68,113 (CH_2); 170,544 (CO)

IR (cm^{-1} ; film): 2979,02; 2874,73; 1752,20; 1445,75; 1396,50; 1200,12; 1128,41; 1033,19; 846,58; 669,22; 576,21

4.3.3. Izopropil-2-etoxiacetát (**14**) előállítása

Egy kihevített 500 ml-es gömblombikba bemértem 350 ml vízmentes izopropil-alkoholt, majd 2-etoxiecetsavat (**12**) (33,172 g; 0,318 mol; 30,156 ml) és 0,02 ekvivalens *p*-toluol-szulfonsavat (1,100 g; 6,370 mmol). A reakcióelegyet 8 órán át refluxáltattam. A maradék oldószert Vigreux-feltéttel atmoszférikus nyomáson desztilláltam, majd ismét felvettem 100 ml izopropil-alkoholban és újra desztilláltam.

izopropil-2-etoxiacetát (**14**): 34,900 g; 75 %, forráspont: 161 °C; színtelen folyadék

$$n_D^{20} = 1,4030$$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1,199 (3H, t, $J=6,217$ Hz, CH_3); 1,248 (6H, d, $J=6,405$ Hz, $2*\text{CH}_3$); 3,578 (2H, q, $J_1=7,158$ Hz, $J_2=6,970$ Hz, CH_2); 4,012 (2H, s, CH_2); 5,083 (1H, m, $J_1=6,405$ Hz, $J_2=12,621$ Hz, CH)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 15,001 (CH_3); 21,806 ($2*\text{CH}_3$); 67,117 (CH_2); 68,293 (CH); 68,374 (CH_2); 170,120 (CO)

IR (cm^{-1} ; film): 2979,45; 2876,45; 1747,07; 1374,88; 1275,01; 1205,71; 1136,47; 1104,22; 1030,89; 938,02; 855,24; 819,06; 726,9; 583,52

4.4. Racém amidok előállítása

A racém amidok előállítását szabad savakból végeztem a megfelelő racém összetételű aminosavakból kiindulva, *N,N'*-diciklohexil-karbodiimidet (DCC) használtam aktiválószerként és 4-dimetilaminopiridint (DMAP) katalizátorként.

4.4.1. Racém 2-etoxi-*N*-(1-feniletán)acetamid [*rac*-3] előállítása

Bemértem egy kihevített 125 ml-es lombikba 2-etoxiecetsavat (**12**) (522 μ l; 574 mg; 5,51 mmol), majd vízmentes diklórmétánt (32 ml). Ezután adtam hozzá a háromszoros feleslegben lévő racém 1-feniletánamint [*rac*-1] (2137 μ l; 2000 mg; 16,52 mmol) és 0,09 ekvivalens DMAP-t (60 mg; 0,497 mmol). Az elegyet jeges, sós fürdővel 0°C-ra hűtöttem. Ezen a hőmérsékleten hozzáadtam a DCC-t (1313 mg; 6,34 mmol) és 5 percig kevertettem. Szobahőmérsékleten kevertettem 72 órán át, a reakció előrehaladtát vékonyréteg kromatográfiásan követtem (diklórmétán : metil-alkohol 20:1).

A kivált fehér csapadékot, diciklohexil-karbamidot (DCU) kiszűrtem, majd a felesleges diklórmétánt rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A maradékot 20 ml 0,5 N-os sósavból és 30 ml desztillált vízből készült oldatban felvettem és fél órán át szobahőmérsékleten kevertettem, hogy az oldatban maradt DCC-det DCU-dá alakítsam, amit ismét kiszűrtem. A vizes oldatot háromszor 20 ml diklórmétánnal extraháltam. Az egyesített diklórmétános fázisokat 20 ml 10 %-os NaHCO₃-al, majd 20 ml desztillált vízzel mostam, MgSO₄-on szárítottam és vákuum alatt rotációs vákuumbepárlón szedtem le az oldószert. A termék szennyeződést tartalmazott, ezért oszlopkromatográfiásan tisztítottam az eluens: toluol: etil-acetát elegye volt (gradiens elúció 10:0,1-10:2). A megfelelő frakciókból nyert terméket, racém 2-etoxi-*N*-(1-feniletán)acetamidot [*rac*-3] NMR vizsgálattal igazoltuk.

racém 2-etoxi-*N*-(1-feniletán)acetamid [*rac*-3]: 320 mg; 9,3 %, fehér kristály

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1,099 (3H, t, J =7,158 Hz, CH₃); 1,395 (3H, d, J =6,970 Hz, CH₃); 3,434 (2H, q, J_1 =7,158 Hz, J_2 =6,970 Hz, CH₂); 5,060 (1H, m, J_1 =7,158 Hz, J_2 =6,970 Hz, CH); 8,167 (1H, s, CH); 6,672 (1H, s, NH); 7,110-7,282 (5H, m, ArH);

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 15,049 (CH_3); 21,953 (CH_3); 48,041 (CH); 67,143 (CH_2); 69,962 (CH_2); 126,164 (2^*CH); 127,405 (3^*CH); 128,720 (CH); 168,967 (CO)

4.4.2. Racém 2-etoxi-*N*-(4-fenilbut-2-il)acetamid [*rac*-6] előállítása

Egy kihevített 125 ml-es lombikba 2-etoxiecetsavat (**12**) (424 μl ; 466,3 mg; 4,48 mmol), majd vízmentes diklórmetánt (26 ml) pipettáztam. Ez után adtam hozzá a háromszoros feleslegben lévő racém 4-fenilbután-2-amint [*rac*-4] (2150 μl ; 2000 mg; 13,40 mmol) és 0,09 ekvivalens DMAP-ot (48,8 mg; 0,404 mmol). Az eddigi elegyet jeges, sós fürdővel 0°C-ra hűtöttem. Ezen a hőmérsékleten hozzáadtam a DCC-t (1067 mg; 5,15 mmol) és 5 percig kevertettem. Szobahőmérsékleten kevertettem további 72 órán át, a reakciót vékonyréteg kromatográfián követtem (futtatóelegy diklórmetán:metil-alkohol 20:1).

A kivált fehér csapadékot (DCU) kiszűrtem, majd a felesleges diklórmetánt rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A maradékot 20 ml 0,5 N-os sósavból és 30 ml desztillált vízből készült oldatban felvettem és fél órán át szobahőmérsékleten kevertettem, hogy az oldatban maradt DCC-t DCU-dá alakítsam, amit ismét kiszűrtem. A vizes oldatot háromszor 20 ml diklórmetánnal extraháltam. Az egyesített diklórmetános fázisokat 20 ml 10 %-os NaHCO_3 -al, majd 20 ml desztillált vízzel mostam és MgSO_4 -on szárítottam, majd rotációs vákuumbepárlóval szedtem le az oldószert. Az anyag nem volt tiszta, ezért oszlopkromatográfián tovább kellett tisztítanom. Az eluens toluol: etil-acetát elegye volt (gradiens elúció 10:0,05-10:2). A megfelelő frakciókból nyert terméket, racém 2-etoxi-*N*-(4-fenilbut-2-il)acetamidot [*rac*-6] NMR vizsgálattal igazoltuk.

racém 2-etoxi-*N*-(4-fenilbut-2-il)acetamid [*rac*-6]: 281 mg; 9,0 %, fehér kristály

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1,243 (3H, t, $J=6,970$ Hz, CH_3); 1,346 (3H, d, $J=12,621$ Hz, CH_3); 1,959 (2H, q, $J_1=9,796$ Hz, $J_2=12,245$ Hz, CH_2); 2,659 (2H, t, $J=7,724$ Hz, CH_2); 3,593 (2H, q, $J_1=7,158$ Hz, $J_2=14,317$ Hz, CH_2); 3,912 (2H, s, CH_2); 4,096 (1H, m, CH); 6,374 (1H, s, NH); 7,177-7,310 (5H, m, ArH)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 15,241 (CH_3); 21,225 (CH_3); 30,891 (CH_2); 38,673 (CH_2); 49,916 (CH); 67,424 (CH_2); 71,022 (CH_2); 126,092 (CH); 128,484 ($2 \times \text{CH}$); 128,067 ($2 \times \text{CH}$); 153,699 (C); 169,355 (CO)

4.4.3. Racém 2-etoxi-N-(1,2,3,4-tetrahidronaft-1-il)acetamid [*rac*-9] előállítása

Bemértem egy 125 ml-es lombikba 2-etoxiecetsavat (**12**) (429 μl ; 471,7 mg; 4,53 mmol), majd vízmentes diklórmetánt (27 ml). Ez után adtam hozzá a háromszoros feleslegben lévő racém 1,2,3,4-tetrahidronaftalin-1-amint [*rac*-7] (2173 μl ; 2000 mg; 13,58 mmol) és 0,09 ekvivalens DMAP-ot (49 mg; 0,409 mmol). Az eddigi elegyet jeges, sós fürdővel 0°C -ra hűtöttem. Ezen a hőmérsékleten hozzáadtam a DCC-t (1080 mg; 5,21 mmol) és 5 percig kevertettem. Szobahőmérsékleten kevertettem további 72 órán át, a reakciót vékonyréteg kromatográfián követtem (futtatóelegy diklórmetán : metil-alkohol 20:1).

A kivált fehér csapadékot (DCU) kiszűrtem, majd a felesleges diklórmetánt rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A maradékot 20 ml 0,5 N-os sósavból és 30 ml desztillált vízből készült oldatban felvettem és fél órán át szobahőmérsékleten kevertettem, hogy az oldatban maradt DCC-t DCU-vá alakítsam, amit ismét kiszűrtem. A vizes oldatot háromszor 20 ml diklórmetánnal extraháltam. Az egyesített diklórmetános fázisokat 20 ml 10 %-os NaHCO_3 -al, majd 20 ml desztillált vízzel mostam és MgSO_4 -on szárítottam, majd rotációs vákuumbepárlóval szedtem le az oldószert. Az anyag nem volt tiszta, ezért oszlopkromatográfián tovább kellett tisztítanom. Az eluens toluol: etil-acetát elegye volt (gradiens elúció: 10:0,05-10:2). A megfelelő frakciókból nyert terméket, 2-etoxi-N-(1,2,3,4-tetrahidronaft-1-il)acetamidot [*rac*-9] NMR vizsgálattal igazoltuk.

racém 2-etoxi-N-(1,2,3,4-tetrahidronaft-1-il)acetamid [*rac*-9]: 252 mg, 7,9 %, fehér kristály

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1,205 (3H, t, $J=6,970$ Hz, CH_3); 1,859 (2H, m, $J_1=6,970$ Hz, CH_2); 2,087 (2H, m, $J=6,970$ Hz, CH_2); 2,815 (2H, m, $J_1=6,970$ Hz, $J_2=12,810$ Hz, CH_2); 3,567 (2H, q, $J_1=6,970$ Hz, $J_2=13,940$ Hz, CH_2);

4,005 (2H, s, CH₂); 5,271 (1H, t, $J=6,970$ Hz, CH); 6,829 (1H, s, NH); 7,113-7,304 (4H, m, ArH)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ ppm): 15,034 (CH₃); 20,243 (CH₂); 29,293 (CH₂); 30,378 (CH₂); 46,882 (CH); 67,142 (CH₂); 70,027 (CH₂); 126,312 (CH); 127,296 (CH); 128,537 (CH); 129,213 (CH); 136,633 (C); 137,612 (C); 169,288 (CO)

4.5. Acilezőszerek tesztelése rázatott lombikban

4.5.1. Racém aminok kinetikus rezolválása

Kísérleteimet termosztálható rázógépen 4,0 ml-es teflon zárólemezes, menetes kupak segítségével légmentesen lezárt reakció edényben végeztem. A kísérletsorozat alatt négy különböző acilezőszert és hat enzimekészítményt vizsgáltam, így összesen 72 tesztreakciót végeztem. A megfelelő racém amint {1-feniletánamin [*rac*-1] (47 mg; 0,385 mmol; 50 μ l); 4-fenilbután-2-amin [*rac*-4] (46,5 mg; 0,312 mmol; 50 μ l), 1,2,3,4-teterahiro-naftil-1-amin [*rac*-7] (46 mg; 0,312 mmol; 50 μ l)} feloldottam vízmentes toluolban (1 ml), majd hozzáadtam a megfelelő acilezőszert [2 ekv. etil-acetát (68 mg; 0,770 mmol; 76 μ l), vagy izopropil-acetát (79 mg; 0,770 mmol; 91 μ l), vagy etil-2-etoxiacetát (102 mg; 0,770 mmol; 105 μ l), vagy izopropil-2-etoxiacetát (113 mg; 0,770 mmol; 115 μ l)] és a megfelelő enzimekészítményt (25 mg, Novozym 435, vagy T2-150, vagy SGA10IBD, vagy G250P, vagy G250O, vagy PAP31A). A reakciókat 30 °C-on termosztált rázógépen végeztem (1100 min⁻¹). 1, 2, 4 óra elteltével 50 μ l mintát vettem. Ezeket a mintákat vékonyréteg kromatográfián és gázkromatográfián (Hydrodex β -6TBDM vagy Hydrodex β -TBDAc) is vizsgáltam.

4.5.2. Új enzimekészítmények aktivitásának vizsgálata

A különböző felületmódosított enzimekészítmények aktivitás vizsgálatát a 4.6.1. fejezetben leírtakhoz hasonlóan végeztem. Kísérleteimet 4,0 ml-es teflon zárólemezes, menetes kupakkal zárható reakcióedényekben, 30 °C-on, állandó ráztatás (1100 min⁻¹) mellett végeztem. Először az új enzimekészítményeket mértem be (20 mg) a reakcióedényekbe, majd a racém 1-feniletánamint [*rac*-1] (19 mg; 0,154 mmol; 20 μ l), a 2 ekvivalens izopropil-2-etoxi-acetátot (**14**) (45,2 mg; 0,308 mmol; 46 μ l) és végül

az oldószert, a vízmentes toluolt (1 ml). 1, 2, 4 óra elteltével 50 µl mintát vettem. Ezeket a mintákat vékonyréteg kromatográfiásan és gázkromatográfiásan (Hydrodex β-6TBDM) is vizsgáltam.

4.6. Új lipáz enzimek rögzítése

Két párhuzamos táptalaj minta felülúszóját tartalmazó lombik egyik tagjához 130 mg oktil-csoporttal (G250O), a másik lombikba 130 mg fenil-csoporttal felületmódosított (G250P) hordozót adtam. Az egyes mintákat 24 órán keresztül 4°C-on rázattam, úgy hogy a szilikagél egyenletesen keveredett a szuszpenzióban. 24 óra múlva a mintákat üvegszűrőn (G4) szűrtem, majd a tízszeres térfogatban izopropanollal kétszer, majd ugyanennyi n-hexánnal egyszer mostam. A mintákat egy éjszakán át szobahőmérsékleten szétterítve szárítottam, majd légmentesen lezárva tartottam a kísérletekig.

5. Összefoglalás

Munkám során első célom az volt, hogy az aminok enzimkatalizált kinetikus rezolválásban általánosan alkalmazott etil-acetátnál **(10)** hatékonyabb acilezőszert fejlesszek, majd ezzel az acilezőszerrel vizsgáljam a *Pseudozyma aphidis* lipáztermelő képességét tesztreakcióként aminok enzimkatalizált kinetikus rezolválását felhasználva.

Az acilezőszer fejlesztésénél a kiindulási etil-észter **(10)** kétirányú módosítását tűztük ki célul. Egyik az etil-csoport izopropil-csoportra történő cseréje, míg a másik egy módosított sav előállítás, melyben az acetát metil-csoport egyik hidrogénje helyén etoxi-csoport található. Ezt a savat úgy nyertem, hogy klórecetsav nátrium-sóját refluxáltattam etanolban, így jó termeléssel kaptam a 2-etoxiecetsavat **(12)**. Ebből a savból etil- **(13)** és izopropil-észtert **(14)** is előállítottam úgy, hogy a megfelelő alkohollal refluxáltattam *p*-toluol-szulfonsav jelenlétében. A termékeket légköri nyomáson Vigreux-feltéttel desztillálva mindkét észtert igen tiszta formában, 75 % körüli termeléssel kaptam. Az enzimatis acilezési teszteket így összesen négy különböző észterrel [etil-acetát **(10)**; izopropil-acetát **(11)**; etil-2-etoxiacetát **(13)**; izopropil-2-etoxiacetát **(14)**] végeztem el.

Az acilezőszerek összevetéséhez először el kellett készítenem az aminok megfelelő racém 2-etoxi-acetamidjait (2-etoxi-*N*-(1-feniletil)acetamid [*rac*-**3**]; 2-etoxi-*N*-(4-fenilbut-2-il)acetamid [*rac*-**9**]; 2-etoxi-*N*-(1,2,3,4-tetrahidronaft-1-il)acetamid [*rac*-**9**]), hogy a királis állófázisú gázkromatográfiás vizsgálatokhoz módszert tudjunk fejleszteni. Ezek után a fenti négy észtert három különböző racém aminnal {(1-feniletil)-amin [*rac*-**1**]; 4-fenilbután-2-amin [*rac*-**4**]; 1,2,3,4-tetrahidronaftalin-1-amin [*rac*-**7**] } és a *Candida antarctica* B lipáz (CaLB) hat különbözőképpen rögzített változatával (Novozym® 435, T2-150, SGA10IBD, G250P, G250O, PAP31A) vizsgáltam. Ehhez a reakciókat termosztálható rázógépen végeztem (30 °C-on, állandó rázatás (1100 min⁻¹) és az elegyekből különböző időközönként (1,2,4 óra) mintát véve vékonyréteg- és királis állófázisú gázkromatográfiával követtem a reakciókat. Az eredmények egyértelműen jelezték, hogy az izopropil-észterek mindkét sav esetén hatékonyabbak voltak, mint az etil-észterek. Emellett az elektronszívó etoxi-csoport hatására mindkét etoxiecetsav észter jobb aktivitási és szelektivitási értékeket eredményezett, mint az ecetsav a megfelelő alkohollal képzett észterei. Leghatékonyabb acilezőszernek minden enzimkészítmény és mind a három amin esetén az izopropil-2-etoxi-acetát **(14)** bizonyult.

Ez után következhetett a különböző táptalajokon a *Pseudozyma aphidis* által termelt lipázok rögzítése oktil- és fenil-csoporttal felületmódosított szilikagél alapú hordozókra, és az így nyert lipázkészítmények összehasonlítása. Összesen kilenc eltérő összetételű tápközeg fermentációs hatékonyságát vetettem össze, aminek során a kétféle rögzítésnek köszönhetően 18 új enzimekészítmény katalitikus aktivitását jellemeztem szubsztrátként 1-feniletánamint (*rac*-**1**), acilezőszerként izopropil-2-etoxiacetátot (**14**) alkalmazva.

E tesztek során kiderült, hogy a nitrátot tartalmazó táptalajokon a *Pseudozyma aphidis* által termelt lipázok magas konverzió és az enantiomerszelektivitási értékeket értek el. Emellett megfigyelhető volt az a tendencia is, hogy az olívaolaj jelentősen növelte az enantiomerszelektivitást, kedvezett az (*R*)-2-etoxi-acetamidok képződésének, vagyis CaLB jellegű szelektivitást növelte. A *P. aphidis* lipáz termelő képességének pH függése azt mutatta, hogy a savas pH hatására erőteljesen csökken az enantiomerszelektivitás és a konverzió is. Leghatékonyabbnak a nitrátot és olívaolajat is tartalmazó Lip1 jelzésű táptalajon termelt lipázkészítmény bizonyult fenil-csoporttal felületmódosított szilikagél hordozóra rögzítve (Phe Lip1).

Távlati célok között szerepel, hogy a táptalajok összetételét tovább optimalizáljuk, hogy minél aktívabb és szelektívebb lipázokat termeltethessünk. Emellett az is helyet kap céljaink között, hogy az így kapott új lipáz enzimekből további enzimekészítmények állítsunk elő több hordozó felhasználásával.

A TDK munkámban ismertetett eredményeink két nemzetközi publikáció^{59,60} részét képezik.

6. Irodalomjegyzék

1. L. Novák, J. Nyitrai: *Szerves Kémia*, Műegyetemi Kiadó, Budapest, **2005**
2. T. Stephens, R. Brynner, *Dark Remedy. The Impact of Thalidomide and Its Revival as a Vital Medicine*, Cambridge, MA: Perseus Publishing; **2001**
3. Silverman, MD, William, *Pediatrics*, **2002**, 110, 404–406.
4. D. A. Moneret-Vautrin, G. Kanny, *Human Toxicology*, 1996, 259-280.
5. V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2006**, 40, 111-120.
6. X. Li, H. Jiang, E. W. Uffman, L. Guo, Y. Zhang, X. Yang, V. B. Birman, *J. Org. Chem.*, **2012**, 77, 1722–1737.
7. U. T. Bornschauer, R. J. Kazlauskas: *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim-New York, **2006**
8. A.-C. Cabordery, M. Toussaint, N. Azaroual, J.-P. Bonte, P. Melnyk, C. Vaccher, C. Foulon, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2011**, 22, 125-133.
9. H. Pellisier, *Tetrahedron*, **2003**, 59, 8291-8327.
10. A. Dimitijevic, D. Velickovic, D. Bezbradica, F. Bihelovic, R. Jankov, N. Milosavic, *Journal of the Serbian Chemical Society*, **2011**, 76, 1081–1092.
11. S. Naik, A. Basu, R. Saikai, . Madan, P. Paul, R. Chatterjee, J. Brask, A. Svendsen, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2010**, 65, 18-23.
12. E. M. Anderson, K. M. Larsson, O. Kirk, *Biocatalysis and Biotransformation*, **1997**, 16, 181-204.
13. G. V. Chowdary, M.N. Ramesh, S. G. Prapulla, *Process Biochem*, **2001**, 36, 331-339.
14. D. R. Hamsaveni, S.G. Prapulla, S. Divakar, *Process Biochem*, **2001**, 36, 1103-1109.
15. A. Ducret, M. Trani, R. Lortie, *Enzyme Microbial Technology*, **1998**, 22, 212-216.
16. B. Joseph, P. W. Ramteke, G. Thomas, *Biotechnology Advances*, **2008.**, 26, 457-470.
17. A. Svendsen, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2000**, 1543, 223-238.
18. R.A.R.N.Z. Rahman, S. N. Baharum, M. Basri, A. B. Salleh, *Analytical Biochemistry*, **2005**, 341, 267-274.
19. G. Beck, *Synlett*, **2002**, 837–850.

20. S. Singh, U. C. Banerjee, *Process Biochemistry*, **2007**, 42, 1063-1068.
21. J-Y. Xin, S-B. Li, Y. Xu, J-R. Chui, C. G. Xia, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **2001**, 76, 579-585.
22. W. M. Lee, K. J. Kim, M. G. Kim, S. B. Lee, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **1995**, 6, 613-615.
23. A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey: *Industrial biotransformations Weinheim*, Wiley-VCH, **2000**
24. K. E. Jaeger, T. Eggert, *Current Opinion in Biotechnology*, **2002**, 13, 390–397.
25. S. A. Patkar, F. Bjirkling, M. Zyndel, M. Sschulein, A. Svendsen, H. P. Heldt-Hansen, E. Gormsen, *Indian journal of Chemistry*, **1993**, 32, 76-80.
26. H. P. Heldt-Hansen, M. Ishii, S. Patkar, T. T. Hansen, P. Eigrved, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **1989**, 158-172.
27. T. Boekhout, R. J. Bandoni, J. W. Fell, K. J. Kwon-Chung, *Elsevier Science Publish*, Amsterdam, **1998**, 609-625
28. R. C. Trindade, M. A. Resende, C.M. Silva, C. A. Rosa, *Systematic and Applied Microbiology*, **2002**, 25, 294-300
29. T. Sugita, M. Takashima, N. Poonwan, N. Mekha, K. Malaithao, B. Thungmuthasawat, S. Prasarn, P. Luangsook, T. Kudo, *Microbiology and Immunology*, **2003**, 47, 183-190.
30. Spoerke, S. C. Smolinske: *Toxicity of Houseplants*, Taylor & Francis, **1990**
31. Y.-H. Wei, F.-L. Lee, W.-H. Hsu, S.-R. Chen, C.-Ch. Chen, Ch.-Y. Wen, S.-J. Lin, W.-Sh. Chu, G.-F. Yuan, G.-Y. Liou, *Botanical bulletin of Academia Sinica*, **2005**, 46, 223-229.
32. T. J. Avis, S. J. Caron, T. Boekhout, R. C. Hamelin, R. R. Bélanger, *Phytopathology*, **2001**, 90, 249-254.
33. M. Levy, A. Gafni, *Yissum Research Development Company of the Herbrew University of Jerusalem Ltd.*, **2011** (WO 2011/151819 A2)
34. W. Marckwald, A. McKenzie, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **1899**, 32, 2130
35. Cs. Csajági, G. Szatzker, E.R. Tőke, L. Üрге, F. Darvas, L. Poppe, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 28, 237-246.
36. Z. Boros, M. Szigeti, A. Tomin, P. Kovács, L. Üрге, F. Darvas, L. Poppe, *Studia Univesitatis Babes-Bolyai, Chemia*, **2009**, 54, 69-75.

37. G. Hellner, Z. Boros, A. Tomin, L. Poppe, *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2011**, 353, 2481-2491.
38. D. Weiser, Z. Boros, G. Hornyánszky, A. Tóth, L. Poppe, *Process Biochemistry*, **2012**, 47, 428-434.
39. Z. Boros, P. Falus, M. Márkus, D. Weiser, M. Oláh, G. Hornyánszky, J. Nagy, L. Poppe, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2013**, 85-86, 119-125.
40. V. I. Padma, A. Laxmi, *Process Biochemistry*, **2008**, 43, 1019–1032.
41. C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, , R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme and Microbial Technology*, **2007**, 40, 1451–1463.
42. I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, *Journal of Molecular Catalysis*, **1986**, 37, 1–24.
43. W. Hartmeier, *Trends in Biotechnology*, **1985**, 3, 149–153.
44. Z. Cabrera, G. Fernandez-Lorente, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Palomo, J. M. Guisan, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, **2009**, 57, 171-176.
45. Y. Li, F. Gao, W. Wei, J.-B. Qu, G.-H. Ma, W.-Q. Zhou, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2010**, 66, 182-189.
46. H. Takahashi, B. Li, T. Sasaki, C. Miyazaki, T. Kajino, S. Inagaki, *Microporous and Mesoporous Materials*, **2001**, 755–762.
47. T. Gitlesen, M. Bauer, P. Adlercreutz, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1997**, 188-196.
48. P. Molnár, P. Bombicz, C. Varga, L. Bereczki, E. Székely, G. Pokol, E. Fogassy, B. Simándy, *Chirality*, **2009**, 21, 628.
49. Committee on Safety of Medicines, „*Current Problems*” **1991**, 32.
50. R. Oberlender, D. E. Nichols, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **1991**, 38, 581.
51. B. K. Koe, A. Weissman, W. M. Welch, R. G. Browne, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **1983**, 3, 686.
52. Dutia, Pankaj, *Ethyl Acetate: A Techno-Commercial Profile*, **2004**
53. L. K. Thalén, J.-E. Bäckvall, *Beilstein Journal Organic Chemistry*, **2010**, 6, 823-829.
54. A. Martijn, J. Veld, K. Hult, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *European Journal of Organic Chemistry*, **2007**, 5416–5421.
55. M. A. J. Veld, K. Hult, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *European Journal of Organic Chemistry*, **2007**, 32, 5416–5421.

56. B. Neises, W. Steglich, *Angewandte Chemie International Edition*, **1978**, 17 (7), 522-524.
57. L. Poppe, L. Novák: *Selective Biocatalysis: A Synthetic Approach*, Wiley, New York, **1992**
58. C.S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C.J. Sih, *Journal of the American Chemical Society*, **1982**, 104, 7294-7299.
59. Z. Boros, E. Abaháziová, M. Oláh, P. Sátorhelyi, B. Erdélyi, L. Poppe, *Chimica Oggi/Chemistry Today*, **2012**, 30, 28-31.
60. Z. Boros, M. Oláh, D. Weiser, L. Poppe, *Studia Universitatis Babes-Bolyai, Chemia*, **2012**, közlésre elfogadva.