



Pannon Egyetem



**XXXI.
Országos Tudományos Diákköri Konferencia
2013**

Aminosavak deaminálási és dekarboxilezési reakciói

Készítette: Biró Barbara
Vegyésszmérnök BSc, 3. évfolyam
Témavezetők: Dr. Kaizer József egyetemi tanár,
Papné Góger Szabina PhD hallgató
Pannon Egyetem, Mérnöki Kar,
Szerves Kémia Intézeti Tanszék

2012

Tartalomjegyzék

1	BEVEZETÉS	1
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	2
2.1	Enzimek, mint biokatalizátorok.....	2
2.2	Enzimmodellek.....	4
2.3	Oxygenáz és oxidáz enzimek bemutatása	5
2.4	α -Ketoglutarát-függő oxidáz és oxygenáz enzimek (α -KGDO).....	6
2.5	1-Amino-ciklopropán-1-karbonsav oxidáz (ACCO) enzim és modellreakciói.....	8
3	EREDMÉNYEK és ÉRTÉKELÉSÜK	12
3.1	ACC oxidáz enzim modellreakcióinak vizsgálata	12
4	KÍSÉRLETI RÉSZ.....	18
5	IRODALOMJEGYZÉK	20

1 BEVEZETÉS

Az enzimek, mint a biológiai, biokémiai reakciók katalizátorai, szinte mindenütt megtalálhatók az élővilágban. Működésükről csak az elmúlt évtizedek során szereztünk közelebbi ismereteket a mérés- és műszertechnika rohamos fejlődésének köszönhetően. A különböző vizsgálati módszerek (röntgendiffrakció, NMR, EXAFS) az enzimek nagy molekulatömegének, nehézkes tisztíthatóságának és nehéz kristályosíthatóságának következtében gyakorlatilag csak a metalloenzimek tanulmányozása során alkalmazhatóak, de ott is csak korlátozottan.

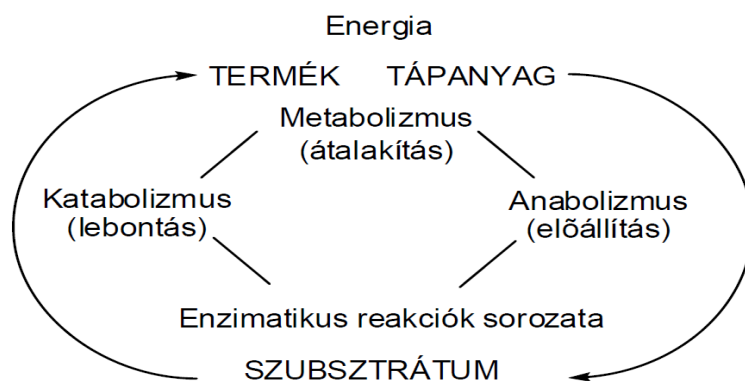
A bioszervetlen, vagy biokoordinációs kémia, amely egyszerűen előállítható szerkezeti és működési modellek vizsgálatán keresztül próbálja felderíteni az aktív centrumban, vagyis a fémion koordinációs övezetében lejátszódó folyamatokat és az aktív hely spektroszkópiai viselkedését, az utóbbi években nagymértékű fejlődésen ment át. A modellreakciók vizsgálata arra is lehetőséget ad, hogy úgynevezett bioutánzó reakciókat dolgozzunk ki, egyrészt a preparatív hasznosítás, másrészt a homogén katalízis jobb megértése céljából.

A dolgozatban bemutatott eredmények az ACC oxidáz enzim működési mechanizmusának vizsgálatára irányulnak. Ennek megfelelően kerülnek tárgyalásra vastartalmú modellvegyületek előállítása, modellreakciók kidolgozása, reakciókinetikai mérések leírása.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

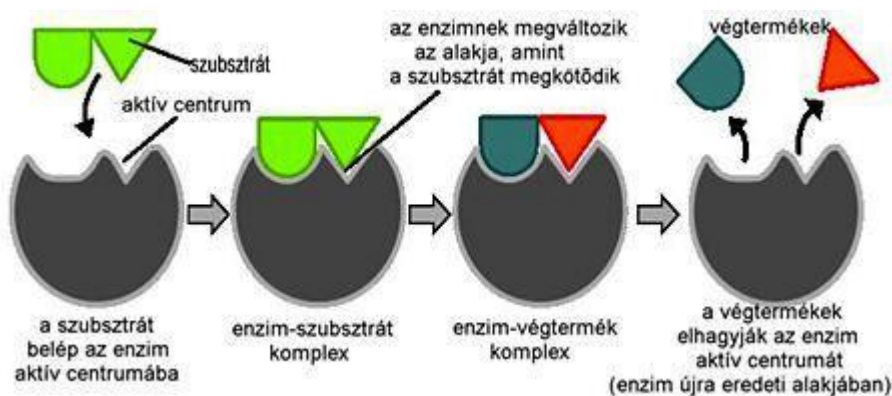
2.1 Enzimek, mint biokatalizátorok

A biológiai katalizátorokat enzimnek nevezzük. Az élő szervezetekben minden anyag enzimreakciók sorozatán keresztül jön létre (anabolizmus), vagy bomlik le (katabolizmus). Ezen kívül meg kell jegyezni, hogy még maguk az enzimek keletkezése is enzimek által katalizált folyamat. Az átalakulási folyamatok összességét metabolizmusnak, vagy anyagcserének nevezzük. (1. ábra).



1. ábra: Enzimreakciók szerepe az élő szervezetekben

Az enzimek aminosavakból épülnek fel, tehát a fehérjék családjába tartoznak. Molekulatömegük $1,2 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ Daltonig változhat [1]. Az enzimek alakfelismerő volta olyan mértékben specifikus, hogy a reakcióban szereplő molekula teljes térszerkezetét figyelembe véve fejtik ki hatásukat. Mindezen tapasztalatok alapján alakult ki a 19. század végén az úgynevezett kulcs-zár elmélet, amelyhez 1958-ban, Daniel Koshland javasolt módosítást [2,3]. Az enzim molekula csak a kiválasztott molekulához illeszkedhet alak és töltéstérkép szerint. Az enzimek geometriai szerkezete biztosítja, hogy csak egyetlen kiválasztott kötést torzítsanak el, éppen annak az aktiválási energiáját csökkentsék le (2. ábra). Ezért van az, hogy a nagyon sokféle, az összegképlet alapján lehetséges izomer közül az élő természetben csak meghatározott típusok fordulnak elő.



2. ábra: Enzimműködés folyamata

Az eddig ismert enzimek közel egyharmada fémiont (vagy fémionokat) tartalmaz, amelyek többféle módon kötődhetnek a fehérjéhez és többféle funkciót láthatnak el. Ezeket két csoportba osztjuk: metalloenzimekre és fémionok által aktivált enzimekre. A metalloenzimekben a fémion az enzimmolekulába beépült alkotórész, a fémion és a fehérje sztöchiometrikus aránya meghatározott értékű. Amennyiben a fémiont kiszakítjuk a metalloenzimből, az enzim elveszíti aktivitását. A fémionok által aktivált enzimek esetében egyensúly áll fenn a fémion és az enzim, továbbá a fémion aktiválta enzim között. Ennél a csoportnál a fém egyszerű kémiai módszerekkel elválasztható a fehérjétől anélkül, hogy az aktivitását teljesen elveszítené. A katalizált reakciók típusa szerint az enzimek az alábbi hat főcsoportba sorolhatók (1- táblázat)[4]:

enzimcsoport	katalizált reakció(k)
hidrolázok	fehérjék peptid kérésének, poliszacharidok glikozidkérésének, zsírok, foszfátok észterkérésének hasítása
oxidoreduktázok	redoxireakciók, melyek során elektronok vagy hidrogénatom kerül át egyik molekuláról a másikra
transzferázok	egy meghatározott atomcsoport átvitele egyik molekuláról a másikra
izomerázok	különböző átrendeződéses reakciók
liázok	a szubsztrátum egy adott csoportjának hidrolitikus eltávolítása
ligázok	két molekula összekapcsolása

1. táblázat: Az enzimek csoportosítása a katalizált reakciók típusa szerint

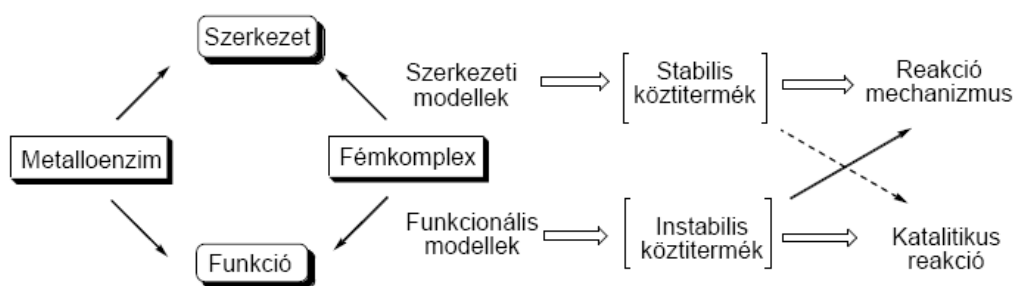
Az enzimek – ipari folyamatokban – biokatalizátorként történő felhasználása, napjainkban igen intenzíven kutatott terület. A legfőbb problémát az jelenti, hogy az iparban alkalmazott reakciókörülmények oly mértékben eltérnek fiziológiás körülményektől, hogy legtöbb esetben az enzimek nem képesek kifejteni hatásukat. Az enzimek biokatalizátorként való felhasználásának előnyeit és hátrányait a 2. táblázat tartalmazza [5-11].

Előnyök	Hátrányok
nagy szelektivitás	nagyon komplex molekulák
nagy aktivitás enyhe körülmények között	magas előállítási költség
nagy átalakítási arány (TON)	belső fragmentálódás
biodegradábilis	
általában természetes anyagok	

2. táblázat: Enzimek biokatalizátorként való felhasználásának előnyei és hátrányai

2.2 Enzimmodellek

Az enzimmodelleknek alapvetően két csoportját különböztetjük meg: *szerkezeti*- és *működési* (funkcionális) modellek (3. ábra).



3. ábra A metalloenzimek szerkezeti és működési modelljei

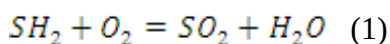
Az enzimek szerkezeti modelljei, az aktív centrum térbeli szerkezetének megismerését segítik elő, a modellek és az enzimek spektroszkópiai adatainak összehasonlításával. Mivel az alkalmazható ligandumok tárháza igen gazdag, azok felhasználásával egyre jobban megközelíthetővé válhat az enzim aktív centrumának felépítése. Azt azonban szem előtt kell tartani, hogy a szintetikus vegyületek sok esetben túl stabilisak ahhoz, hogy katalitikus funkciókat lássanak el.

A funkcionális (működési) modellek esetében nem a szerkezeti hasonlóság a meghatározó. A cél, az oxigénezési folyamat mechanizmusának megértése, és ez által hasonló, mesterséges katalitikus reakciók kidolgozása. Az enzimek szelektivitásának és aktivitásának reprodukciója azonban nagyon nehéz mivel a biotánczó rendszerek gyakran a természetestől eltérő körülmények között működnek. Nem elképzelhetetlen azonban, hogy a gyors ütemben fejlődő modellek megközelítsék, illetve túllépjék a proteinek bizonyos tulajdonságait.

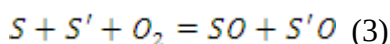
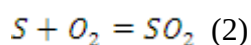
2.3 Oxigenáz és oxidáz enzimek bemutatása

Az enzimek egy rendkívül fontos csoportját képezik az *oxidáz* és *oxigenáz* enzimek, amelyek többsége a metalloenzimek csoportjába sorolható. Széles körben megtalálhatók különböző élő szervezetekben, állatokban, növényekben, mikroorganizmusokban, funkciójukat tekintve pedig fontos szerepet töltenek be a növényi- és állati- szervezetek számára mérgező anyagok lebontásában.

Az oxigenáz enzimek legtöbbje aktív centrumában átmeneti fémet (vas, réz, vanádium, mangán, stb.) tartalmazó metalloenzim. Szerepük az, hogy katalizálják a dioxigén molekula egy vagy két atomjának beépülését a megfelelő szubsztrátumba. Az első esetben monooxigenázokról, míg utóbbiban dioxigenázokról beszélünk. A monooxigenázok által katalizált reakciónál a dioxigén molekula egyik oxigénatomja beépül a szubsztrátumba, a másik vízzé alakul (1).

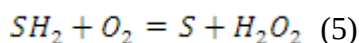
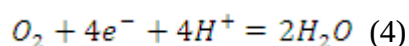


A dioxigenáz enzimek további két csoportra bonthatóak, az intermolekuláris és az intramolekuláris enzimekre. Az intramolekuláris enzimek közös jellemzője, hogy a molekuláris oxigén mindkét atomja ugyanazon szubsztrátumba épül be (2), míg az intermolekuláris dioxigenázok esetén a dioxigén atomjai két szubsztrátum között oszlanak meg (3).



A vastartalmú dioxigenáz enzimek két csoportra oszthatóak, a Fe^{3+} -iont tartalmazó intradiol dioxigenázokra, amelyek aktiválják, a szubsztrátumot mielőtt a molekuláris oxigén reakcióba lépne velük és a Fe^{2+} -iont tartalmazó extradiol dioxigenázokra, melyek megkötik és közvetlenül aktiválják a molekuláris oxigént [12-14]. Készültek dolgozatok mangán- [15], magnézium- [16] és réztartalmú [17] dioxigenáz enzimekről is.

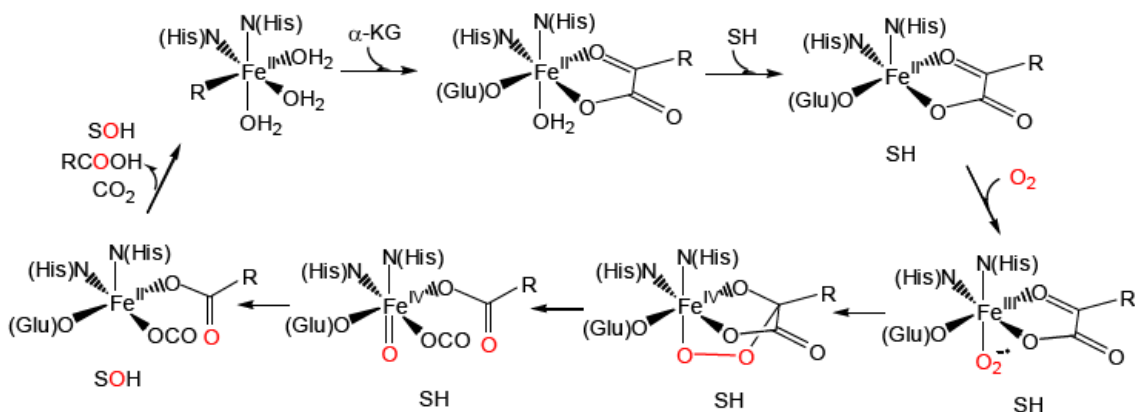
Az oxidáz enzimek is aerob körülmények között fejtik ki hatásukat, de az oxigenázokkal ellentétben itt az oxigén szubsztrátumba való beépülése nem játszódik le, az enzim a szubsztrát oxidatív dehidrogéneződéséért felelős. A fenti reakciókban másodlagos termékként víz vagy hidrogén-peroxid keletkezik (4,5).



2.4 α -Ketoglutarát-függő oxidáz és oxigenáz enzimek (α -KGDO)

Az oxidoreduktáz enzimek fontos csoportját képezik az α -ketoglutarát-függő oxidázok és oxigenázok [18], amelyek különböző, biológiailag fontos vegyületek hidroxilezési reakcióinak katalízisét végzik. Az α -ketosav ebben az esetben kofaktorként, vagyis az enzim működését elősegítő csoportként funkcionál.

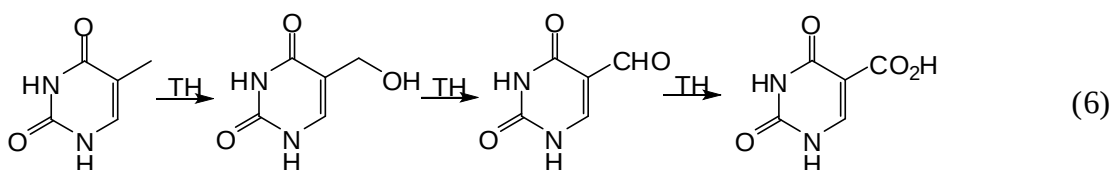
Általánosságban elmondható róluk, hogy α -ketosav jelenléte nélkül az enzimatis reakció (kevés kivétellel) nem játszódik le. Másik fontos sajátosságuk, hogy bár aminosav szekvenciájuk jelentős változatosságot mutat, az aktív helyük szinte kivétel nélkül két hisztidines nitrogénnel és egy glutaminsavból, vagy aszparaginsavból származó karboxilát-funkcióval kötött vas(II)-iont tartalmaz. A 2 N, O donoratom-csoport mellett még három vízmolekula kapcsolódik a vas(II) centrumhoz (4. ábra) [19], így alakul ki a hatos koordináció.

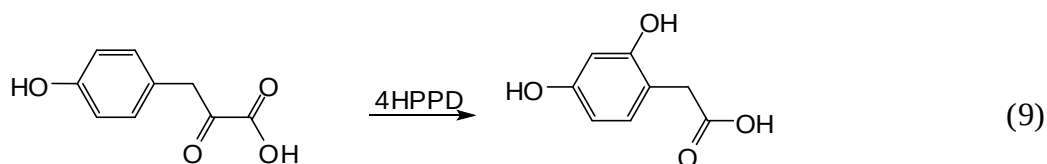
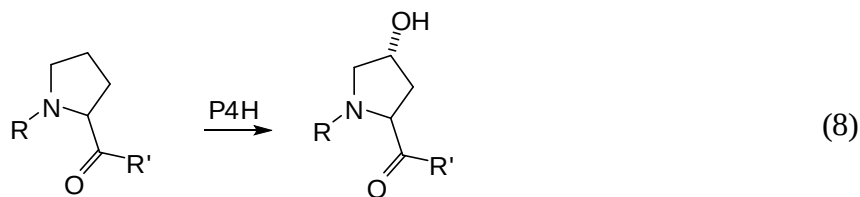
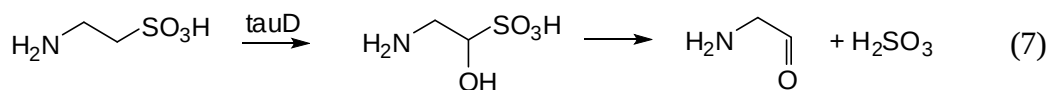


4. ábra: A vastartalmú α -KG-függő dioxigenázok reakcióira javasolt általános mechanizmus

A 4. ábrán látható javasolt mechanizmus [20] épp ezért szinte az összes α -KGDO enzimre érvényes. Első lépésben az α -ketosav kétfogú ligandumként való koordinációja történik öttagú kelátgyűrű kialakulása közben. Ezzel párhuzamosan két vízmolekula kiszorul a koordinációs övezetből. A szubsztrátum ezután megkötődik a vas(II)ion közelében, kiszorítva a maradék vízmolekulát a vas(II)ion mellől, utat nyitva egy dioxigén molekula koordinációjának. A vas(III)-hoz kapcsolódó szuperoxo-ligandum ezután már képes a ketosav ketonos szénatomját támadni, peroxo-vas(IV) intermedier kialakulását eredményezve. Az O-O kötés felhasadásával végül létrejön az oxovas(IV) egység, amely a közelben rögzített szubsztrátum C-H kötését támadja. A termékek (hidroxilezett szubsztrátum, szén-dioxid és karbonsav) a ciklus zárásaként elhagyják az aktív helyet. Az előbbi átmeneti állapotok közül többnek a röntgenszerkezete ismert.

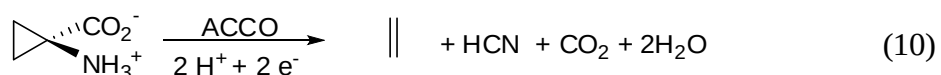
A fentebb ismertetett mechanizmussal írható le többek között az alábbi enzimek működése, a nukleinsavak metabolizmusát katalizáló timin hidroxiláz (TH) (6) [21]; taurin dioxigenáz (TauD) (7), amelynek a szulfít metabolizmusban van szerepe [22]; a prolil 4-hidroxiláz (P4H) (8), amely a kollagént stabilizáló 4-hidroxi-prolint állítja elő [23]; a 4-hidroxi-fenil-piruvát dioxigenáz (4HPPD) (9), ahol maga a kofaktor a szubsztrátum is egyben [24].



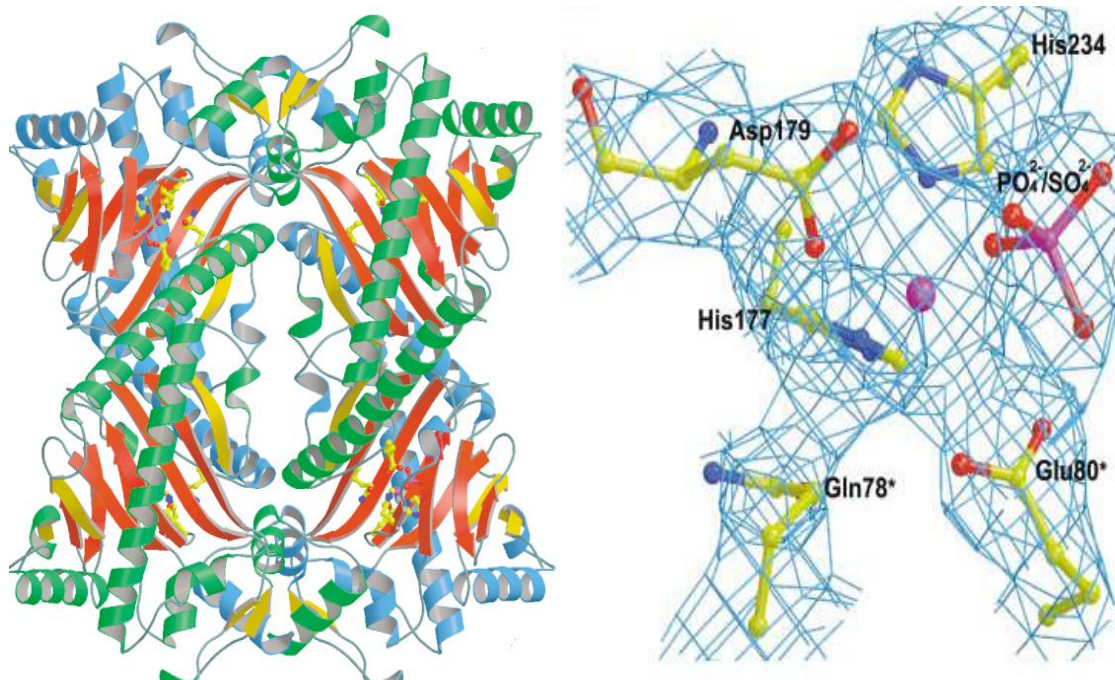


2.5 1-Amino-ciklopropán-1-karbonsav oxidáz (ACCO) enzim és modellreakciói

Az etilén növényi hormon, a gyümölcsök érését gyorsítja, és a növények virágzására hat, a magvak csírázását és a hagymák, gumók kihajtását befolyásolja. Az etilént a kertészetben és a gyümölcsstermesztésben is felhasználják hormonhatása miatt, mivel a zölden szedett gyümölcsöknek segíti az utóérését, és időzíthető vele egyes dísnövények virágzása. A növényekben az etilén bioszintézisen az utolsó lépése az 1-amino-ciklopropán-1-karbonsav (accH) átalakítása, melyet az ACC oxidáz enzim katalizál (10) [25-28].



A *Petunia hybrida*-ból izolált enzim (ACCO) szerkezetét az 5. ábra szemlélteti. Röntgendiffrakciós mérések alapján megállapították, hogy a központi fémionhoz 2 hisztidin (His177, His 234) és egy aszparaginsav (Asp179), (2N, O) koordinálódik egyfogú ligandumként [29].



5. ábra ACC oxidáz enzim szerkezete [29]

Az ACC oxidáz enzim eltérően a többi α -KGDO proteintól, működéséhez nem 2-oxoglutarát, hanem aszkorbát kosubsztrát szükséges, emellett a szén-dioxid (vagy bikarbonát), mint aktivátor játszik szerepet az etilén szintézise során. Mágneses cirkuláris dikroizmus (MCD) vizsgálatokkal alátámasztották, hogy az enzim aktív centrumában jelenlévő vas(II)ion alapállapotban hatos koordinációjú, hasonlóan a többi, ebbe a csoportba tartozó enzimhez. A szubsztrátum koordinációját tekintve szintén eltérés tapasztalható a többi α -KGDO enzimtől. Míg utóbbi esetben az α -ketosav jobban kötődik a központi fémionhoz, mint az átalakítandó szubsztrátum, addig az ACCO enzim esetében a szubsztrátum (accH) mind az amino-, mind pedig a karboxilát-csoportján keresztül közvetlenül koordinálódik a központi vas(II)ionhoz. A szubsztrátum és a kosubsztrát hozzáadását követően az aktív helyen ötös koordináció alakul ki, amely elősegíti a dioxigén megkötődését és aktiválását. Ezen eredmények összhangban vannak a korábban elvégzett ún. „steady-state” kinetikai mérésekkel, ahol bebizonyították, hogy a szubsztrátum a dioxigén előtt koordinálódik a központi fémionhoz. Az azonban még nem tisztázott, hogy a kosubsztrát az accH előtt vagy a dioxigén után koordinálódik a vas(II)ionhoz [26, 30-38].

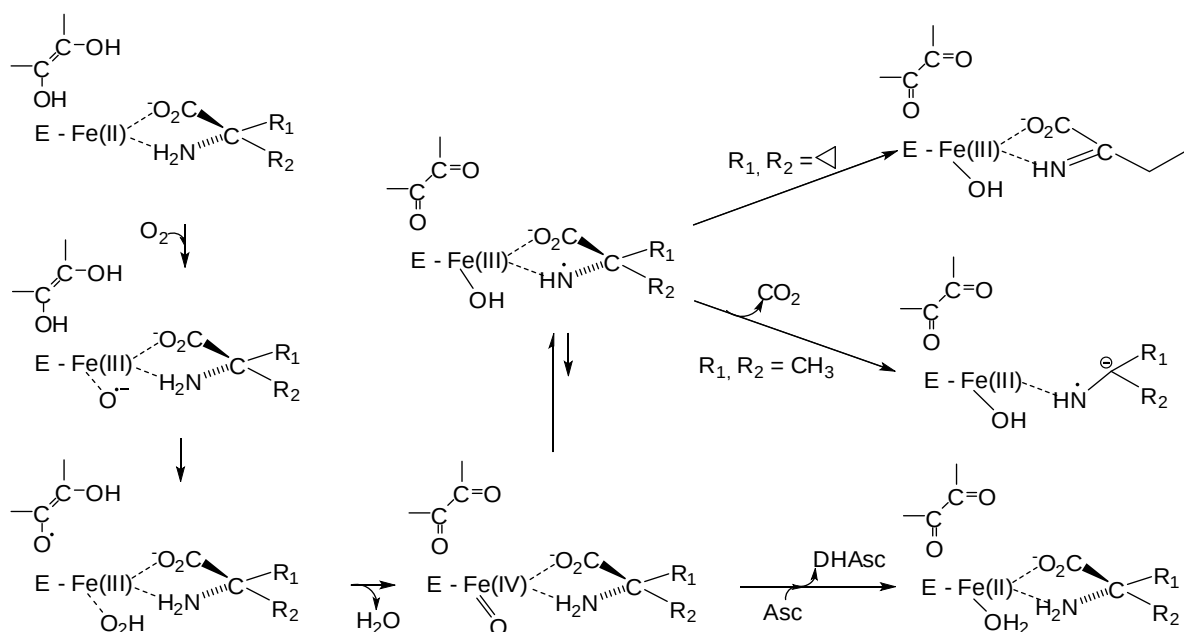
2006-ban Klinman és munkatársai 3 nyíltláncú (aibH: 2-amino-izovajsav), valamint 4 gyűrűs (N-MeaccH: N-metil-1-amino-ciklopropán-1-karbonsav, acc-NH₂: 1-amino-

ciklopropán-1-karbonsavamid, acc-OMe: 1-amino-ciklopropán-1-karbonsav-metilészter) aminosavval végeztek mechanizmus vizsgálatokat. Megállapították, hogy a gyűrűs származékok esetében etilén keletkezett, az alifás aminosavak esetében pedig dekarboxileződés játszódott le. A kinetikai vizsgálatok eredményeit az 1. táblázatban foglaltuk össze. Az adatokból jól látható, hogy nincs egyértelmű összefüggés a szubsztrátumok szerkezete, kötésfelhasadási energiái és a reakció sebessége között (k_{cat}). Ebből arra lehet következtetni, hogy a sebességmeghatározó lépés a szubsztrátum aktiválását megelőzően történik, melynek során egy oxovas(IV) részecske alakul ki. A reakciók feltételezett mechanizmusát a 6. ábra szemlélteti [39].

Szubsztrátum	k_{cat} (s^{-1})	K_{M} (μM)	BDE (kcal/kmol)
accH	36,4±1,4	0,099±0,018	97,4
N-MeaccH	12,2±0,5	0,107±0,021	91,4
acc-NH ₂	11,3±0,6	0,214±0,047	87,1
acc-OMe	27,3±1,7	2,76±0,55	97,3
aibH	22,1±1,6	0,92±0,29	100,0
D-alanin	29,8±0,9	4,42±0,49	98,8
glicin	9,5±0,6	1,0±0,4	99,0

3.táblázat: ACC oxidáz enzim kinetikai vizsgálatának eredményei
(BDE: kötésfelhasadási energia)

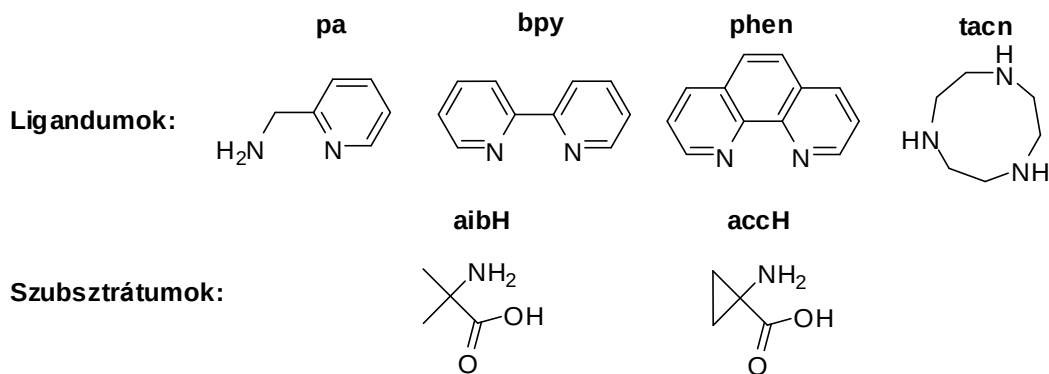
Első lépésként a szubsztrátum kétfogú ligandumként való koordinációja történik meg öttagú kelátgyűrű képződése közben. Ezt követően aszkorbát jelenlétében a dioxigén koordinálódik a központi fémionhoz (1). A vas(III)hoz kapcsolódó szuperoxo-ligandum ezután már képes az aszkorbát szomszédos szénatomját támadni (2), a sebességmeghatározó lépésben oxovas(IV) intermedier kialakulását eredményezve (3), amely közvetlenül felelős a szubsztrátum aktiválásáért. Ennek során egyelektronos oxidáción keresztül iminoil-gyök keletkezik (4). Aszkorbát felesleg esetén az oxovas(IV) intermedier reakciója szubsztrátummal és az aszkorbáttal kompetitív (egymással versengő) reakciót eredményez, amelynek során a kiindulási Fe(II)-komplex és víz keletkezik (5) [38].



6. ábra ACCO enzim feltételezett működési mechanizmusa

(Asc: aszkorbát; DHAsc: dehidro-aszkorbát)

Simaan és munkatársai az 7. ábrán látható ligandumokkal és szubsztrátumokkal réz(I)-, réz(II)- és vas(III)tartalmú (ES) komplexeket állítottak elő és vizsgálták reakciójukat hidrogén-peroxiddal, mint oxidálószerrel.



7. ábra ACC oxidáz modellek előállításánál használt ligandumok és szubsztrátumok
(pa: 2-pikolil-amin; tacn: 1,4,7-triaza-ciklononán; aibH: 2-amino-izovajsav)

Azt tapasztalták, hogy minden esetben az enzimatisz útnak megfelelő termékek keletkeznek, tehát ezek a komplexek funkcionálisan jól modellezik az ACC oxidáz enzimet. A vizsgálatok során megállapították, hogy bázis (NaOH) hozzáadásával lényegesen növelhető a képződő etilén mennyisége. Ezt azzal magyarázták, hogy bázis hatására a hidrogén-peroxid deprotonálódik, melynek következtében reaktív fém-peroxo komplex alakul ki [40-43].

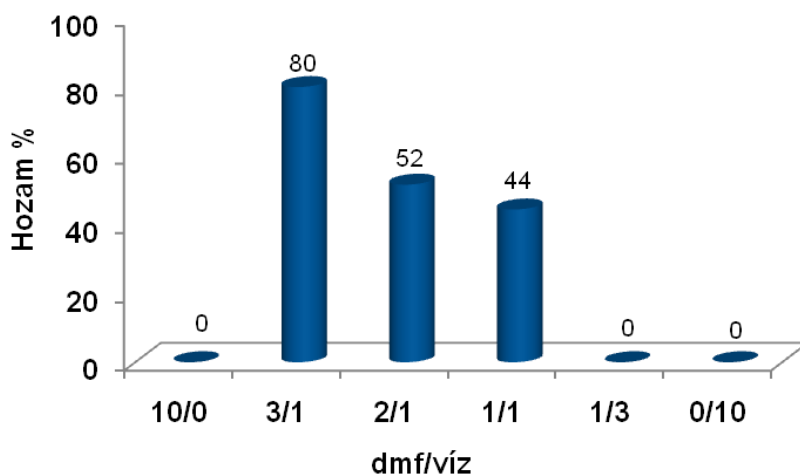
3 EREDMÉNYEK és ÉRTÉKELÉSÜK

3.1 ACC oxidáz enzim modellreakcióinak vizsgálata

Az etilén fontos szerepet játszik a növények érési és növekedési folyamataiban. A növényi sejtek a fenti folyamatokon kívül számos más esetben is termelnek etilént, pl. különféle stressz (fizikai sérülés, fagyás, kiszáradás, nehézfémso mérgezés) esetén, ezért az ACCO enzim által katalizált folyamat megértése potenciális mezőgazdasági és kereskedelmi fontossággal is kecsegtethet.

Célunk volt, hogy a reakció termékeinek, intermedierjeinek azonosítása után az előállított komplexek felhasználásával katalitikus rendszereket dolgozzunk ki. Modell-vegyületként választottuk az irodalomban már ismert $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{SALEN})\text{Cl}]$ komplexet [44]. A választást az indokolta, hogy a SALENH_2 ligandum könnyen, olcsón előállítható, $\text{Fe}(\text{III})$ -komplexei nem érzékenyek, továbbá, számos SALEN-típusú ligandummal előállított, különböző átmenetifémet tartalmazó komplex (Mn, Co, Fe, Pd, Ni, Cu) bizonyult katalitikusan aktívnak szerves vegyületek oxidációs reakcióiban [45-47].

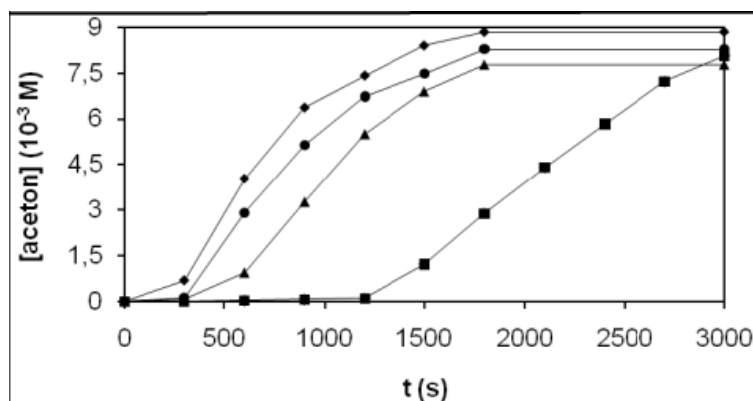
Korábban Baráth Gábor vizsgálta 2-aminoizovajsav - mint alternatív szubsztrátum – $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{SALEN})\text{Cl}]$ -al való oxidációját különböző dmf/víz arányok mellett és azt találta, hogy a 3:1 arányú dmf/víz elegyben érhető el a legnagyobb hozam (8. ábra).



8.ábra A hozam változása a dmf/víz arány függvényében a 2-amino-izovajsav oxidációs reakciójában.

$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{SALEN})\text{Cl}] = 7,20 \times 10^{-6} \text{ M}$; $[\text{aibH}] = 3,60 \times 10^{-2} \text{ M}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 3,60 \times 10^{-2} \text{ M}$; $T = 25^\circ \text{C}$

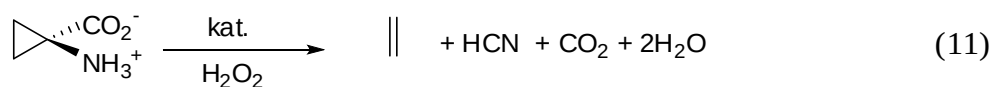
Továbbá vizsgálták a reakcióelegyhez adott ammónium-hidroxid mennyiségének hatását (9. ábra), és azt tapasztalták, hogy a szubsztráttal ekvimoláris mennyiségben bemért ammónium-hidroxid koncentráció mellett minimalizálódik az indukciós szakasz. Feltételezésük szerint a bázis az aminosav deprotonálásában játszik szerepet, így gyorsítván annak koordinációját a fém-centrumhoz.



9.ábra Bázis hatása 2-amino-izovajsav oxidációs reakciójában

$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{SALEN})\text{Cl}] = 7,20 \times 10^{-6} \text{ M}$; $[\text{aibH}] = 3,60 \times 10^{-2} \text{ M}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,13 \times 10^{-2} \text{ M}$; ■ bázis nélkül; ▲ $[\text{NH}_4\text{OH}] = 0,28 \times 10^{-2} \text{ M}$; ● $[\text{NH}_4\text{OH}] = 1,80 \times 10^{-2} \text{ M}$; ◆ $[\text{NH}_4\text{OH}] = 3,60 \times 10^{-2} \text{ M}$; dmf/víz; $T = 25^\circ \text{C}$

A funkcionális modellek kidolgozása során szubsztrátumként 1-amino-ciklopropán-1-karbonsavat (accH), oxidálószerként hidrogén-peroxidot, katalizátorként pedig $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{SALEN})\text{Cl}]$ komplexet használtunk. A komplex aktivitását vizsgálva megállapítottuk, hogy hatékonyan katalizálja az accH oxidációját (11), a reakciókat gázkromatográfiás méréssel követtük nyomon a termék koncentrációjának időbeli változásán keresztül.

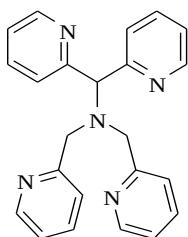


Az oxidációs reakciókat dmf/víz 3:1 arányú keverékében, 1:5000:5000 komplex, szubsztrátum, hidrogén-peroxid arány mellett, 35°C hőmérsékleten végeztük.

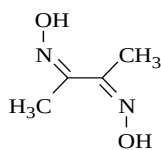
Az eredmények figyelembevételével megállapíthatjuk, hogy a $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{SALEN})\text{Cl}]$ komplex hatékony katalizátornak bizonyult 1-amino-ciklopropán-1-karbonsav oxidációjában. Termékként az enzimatis útnak megfelelően etilén keletkezett, tehát ezen rendszer funkcionális ACC oxidáz modellnek tekinthető.

Az oxidációs reakciókat kiterjesztettük más hem illetve nem-hem típusú ligandumokat tartalmazó katalizátorokra is (10. ábra).

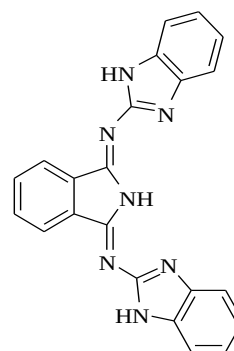
nem hem típusú ligandumok:



N4Py

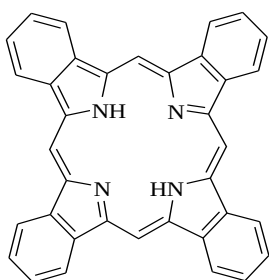


Hdmg

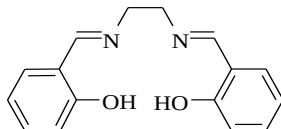


(bim)₂ind

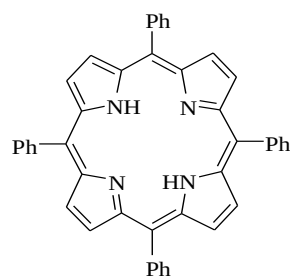
hem típusú ligandumok:



ftalocianin

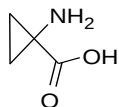


H₂SALEN



TPP

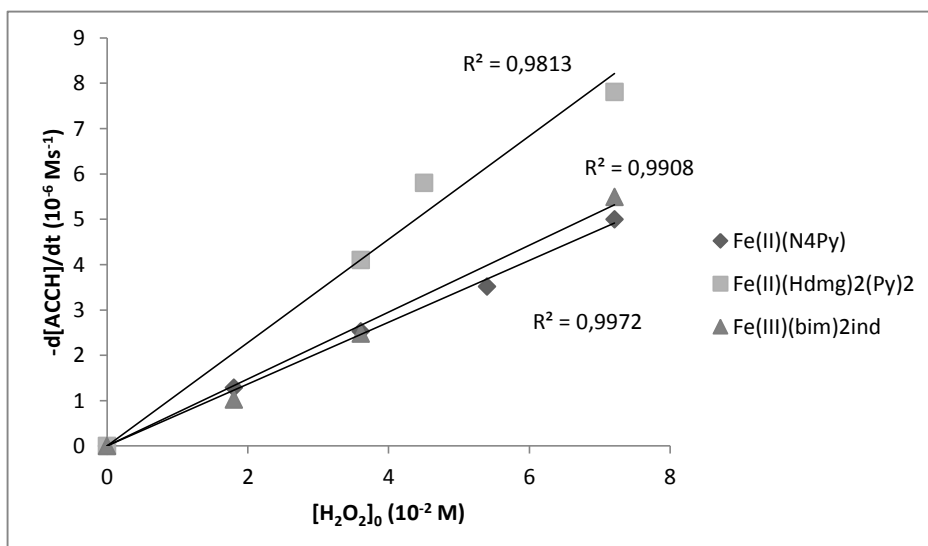
szubsztrátum:



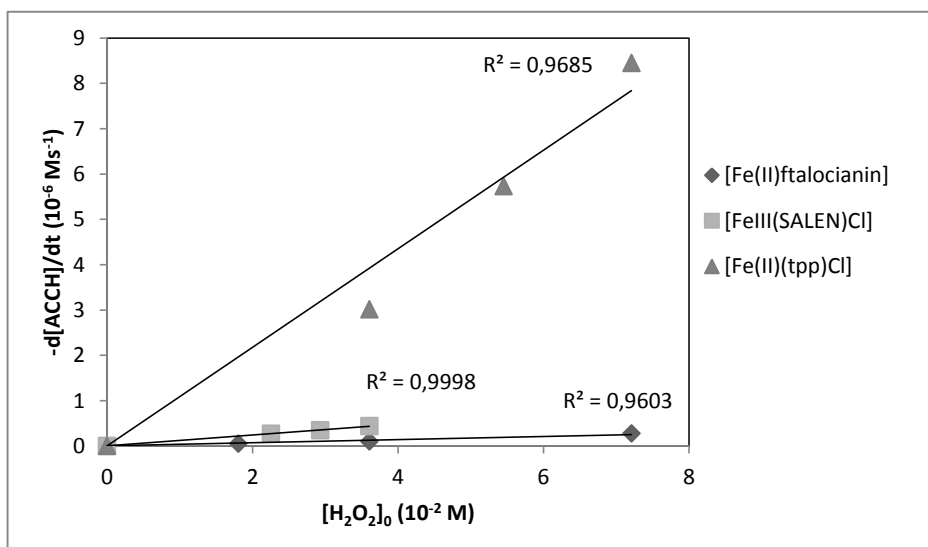
accH

10. ábra: Alkalmazott nem hem és hem típusú ligandumok valamint a reakciókban alkalmazott szubsztrátum: N4Py (N,N-bisz(2-piridilmetil)-N-bisz(2-piridil)metilamin), H₂dmg (dimetil-glioxim), (bim)₂ind. (1,3-bisz(2-benzimidazolino)), ftalocianin; H₂SALEN: (N,N-bisz(szalicilidén)etiléndiamin), TPP: (tetrafenil porfirin)

A 10. ábrán látható ligandumokból állítottuk elő a reakciók során alkalmazott vas tartalmú komplexeket. Mindegyik esetében vizsgáltuk a kezdeti reakciósebesség változását eltérő H₂O₂ koncentrációk mellett.



11. ábra: A nem-hem típusú ligandumokkal alkotott komplexekkel végzett reakciók H₂O₂ függése.



12. ábra: A hem típusú ligandumokkal alkotott komplexekkel végzett reakciók H₂O₂ függése.

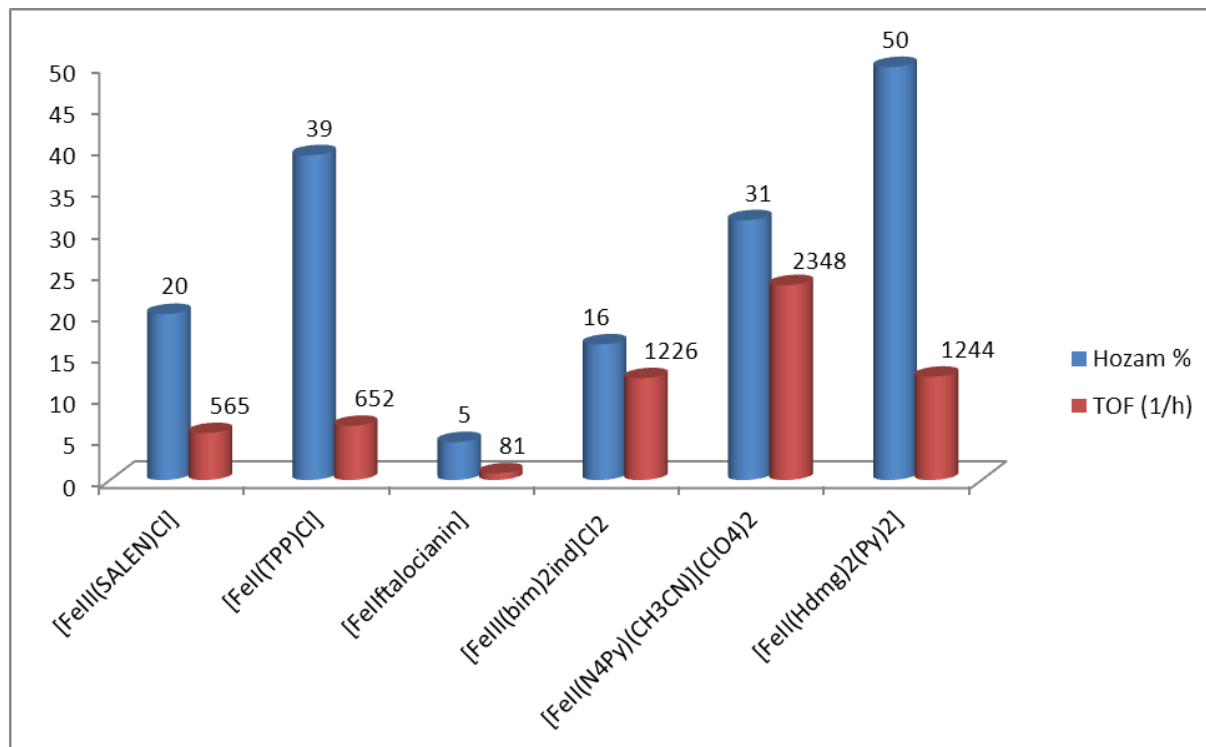
Az oxidálószer-től való függést mindegyik komplex esetében először a következő mól arányok alapján végeztük: katalizátor: oxidálószer (H₂O₂): bázis (NH₄OH): szubsztrátum (ACCH)= 1:5000:5000:5000. Ezután alacsonyabb és magasabb peroxid koncentrációt

alkalmazva is megvizsgáltuk a rendszereket, majd a kapott kezdeti reakciósebességek értékeit ábrázoltuk a különböző kezdeti H_2O_2 koncentrációk függvényében (11. és 12. ábra).

A kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy katalizátoraink még magas H_2O_2 koncentrációnál is aktívak maradnak. Mind a hem mind pedig a nem-hem rendszerek esetében megállapítottuk, hogy a reakció oxidálószerre nézve elsőrendű kinetikát mutat.

Az aktivitási sorrend a nem-hem illetve a hem típusú modellek esetében a következő: $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Hdmg})_2(\text{Py})_2] > [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{bim})_2\text{ind}]\text{Cl}_2 > [\text{Fe}^{\text{II}}(\text{N4Py})(\text{CH}_3\text{CN})](\text{ClO}_4)_2$; $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPP})\text{Cl}] > [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{SALEN})\text{Cl}] > [\text{Fe}^{\text{II}}\text{ftalocianin}]$. A ftalocianin kivételével az összes komplex aktívabbnak bizonyult a korábban választott $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{SALEN})\text{Cl}$ komplexhez képest.

A 13. ábra szemlélteti a különböző modellek által elért hozamokat és a számolt TOF értékeket. A TOF értékekből megállapítható, hogy adott reakcióidő alatt egy katalizátormolekula mennyi szubsztrátum molekulát képes terméké alakítani. Az ábra alapján jól látható, hogy a hem tartalmú modellek közül a $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPP})\text{Cl}]$ esetében, míg a nem-hem típusú rendszereknél a $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{N4Py})(\text{CH}_3\text{CN})](\text{ClO}_4)_2$ komplex reakciójában adódtak a legnagyobb TOF értékek.



13. ábra: A felhasznált katalizátorokkal elért hozamok és TOF értékek.

$([\text{S}] = 3,6 \times 10^{-2} \text{ M}, [\text{komplexek}] = 7,2 \times 10^{-6} \text{ M}, [\text{NH}_4\text{OH}] = 3,6 \times 10^{-2} \text{ M}, \text{dmf/víz (3:1)}, T = 35^\circ\text{C})$

Az eredmények figyelembevételével megállapíthatjuk, hogy a $[Fe^{II}(Hdmg)_2(Py)_2]$, $[Fe^{III}(bim)_2ind]Cl_2$, $[Fe^{II}(N4Py)(CH_3CN)](ClO_4)_2$, $[Fe^{II}(TPP)Cl]$, $[Fe^{III}(SALEN)Cl]$, $[Fe^{II}ftalocianin]$ komplexek hatékony katalizátorai az 1-amino-ciklopropán-1-karbonsav oxidációs reakciójának. Termékként az enzimatis útnak megfelelően etilén keletkezett, tehát az általunk használt rendszerek funkcionális ACC oxidáz modellnek tekinthetők.

További céljaink között szerepel modellrendszereink vizsgálata más szubsztrátumokkal valamint a reakciók lehetséges intermediereinek vizsgálata.

4 KÍSÉRLETI RÉSZ

Kísérleteinket levegő és nedvesség gondos kizárásával, inert technika alkalmazásával végeztük. Az alkalmazott Ar gázt szárítottuk (P2O5, blaugél), szén-dioxid- és oxigénmentesítettük KOH illetve DEOXO katalizátorral töltött oszlopokkal. A használt oldószereket standard módszerekkel tisztítottuk, szárítottuk és argon alatt tároltuk. A $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{SALEN})\text{Cl}]$, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Hdmg})_2(\text{Py})_2]$, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{N4Py})(\text{CH}_3\text{CN})](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{bim})_2\text{ind}]\text{Cl}_2$ komplexeket irodalmi adatok alapján állítottuk elő klasszikus Schlenk technikát alkalmazva [48], a $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPP})\text{Cl}]$ és a $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{ftalocianin}]$ kereskedelmi termékek voltak.

$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{SALEN})\text{Cl}]$ komplexet irodalmi adatok alapján állítottuk elő [48]

$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Hdmg})_2(\text{Py})_2]$ komplex előállítás: Dimetil-glioximot (11 g, 0,095 mol) feloldottunk 400 ml, piridint (49g, 0.62 mol) tartalmazó metanol oldatban. Ehhez adtuk hozzá a Fe^{II} -acetátot (8 g, 0.045 mol). 10 perc eltelte után az oldatot szűrtük és a kiváló vöröses-barna szilárd anyagot 100 ml 10 (V/V)%-os piridines metanol oldattal valamint 100 ml 30-60°C-os petroléterrel mostuk. A terméket vákuum alatt szárítottuk. Hozam: 16,09 g (83 %).

$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{N4Py})(\text{CH}_3\text{CN})](\text{ClO}_4)_2$ komplex előállítás: pikolil-klorid-hidroklorid-ot (6,8g, 41,5 mmol) hozzáadtuk NaOH (5 M, 8,3 ml) vizes oldatához 0 °C fokon. 10 perc kevertetés után az oldatot bisz-(2-piridil)-metilamin (4,13g, 20,75mmol) és egy másik részlet NaOH oldathoz öntöttük (5 M, 8,3 ml). Az így kapott oldatot 25°C-on 48 óráig kevertettük, majd cc. HClO_4 hatására sárga csapadékot választottunk le, melyet forró vízben átkristályosítottunk. Az elkészített N4Py metanolos vagy acetonitriles (1:1 arány) oldatához hozzáadtunk $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ -ot. Az oldatot 5 perc kevertetés után etil-acetát fürdőbe helyeztük. A kiváló vörös kristályokat etil-acetáttal mostuk, szűrtük.

$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{bim})_2\text{ind}]\text{Cl}_2$ komplex előállítás: $(\text{bim})_2\text{ind}$. (1,50g, 4 mmol) és $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,08 g, 4 mmol) feloldottunk 30 ml metanolban és 6 órán keresztül refluxáltattuk argon atmoszférában. Szobahőmérsékletre lehűtve szűrtük a kivált barna színű csapadékot, hideg metanollal mostuk, majd vákuumban szárítottuk. Hozam: 1,44g (72%).

Reakciókinetikai mérések: Az aminosavak $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{SALEN})\text{Cl}]$, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{N4Py})(\text{CH}_3\text{CN})](\text{ClO}_4)$, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Hdmg})_2(\text{Py})_2]$, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{bim})_2\text{ind}]\text{Cl}_2$, $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{ftalocianin}]$, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPP})\text{Cl}]$ komplex által katalizált reakcióit 35 °C-on végeztük. Egy gumiszeptummal zárható 20 cm³ térfogatú üvegedényben, dmf/víz (3:1) arányú keverékében feloldottuk a szubsztrátumot, majd hozzáadtuk a komplexet. Az edényt lezártuk a szeptummal, ezt követően a hidrogén-peroxidot

a szeptumon keresztül óvatosan a reakcióelegyhez csepegtettük. Ezután 5 percenként történő mintavétellel gázkromatográfiás módszer segítségével követtük nyomon az oxidációs reakciókat. A mintavételezés a gáztérből történt.

A meghatározáshoz egy HP 5890A (lángionizációs detektor), 30 m-es Supelcowax 10 kolonnával rendelkező gázkromatográfiás (GC) berendezést használtunk.

A gáztérből minden esetben 250 μ l gázmintát vettünk és ezt injektáltuk be a GC-be.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] R. W. Hay, *Bio-Inorganic Chemistry*, Ellis Harwood Ltd., Chichester (1984).
- [2] E. Fischer, *Ber. Dt. Chem. Ges.*, **27**, 2985 (1894).
- [3] D. Koshlud, *PNAS*, **44**, 98 (1958).
- [4] Kőrös E., *Bioszervetlen kémia*, Gondolat Kiadó, Budapest (1980).
- [5] S. J. Benkovic, A. Ballesteros, *TIBTECH*, **15**, 385 (1997).
- [6] M. Wegman, M. Janssen, F. van Rantwijk, *Adv. Synth. Catal.*, **343**, 559 (2001).
- [7] R. Chen, *TIBTECH*, **19**, 13 (2001).
- [8] N. Declerck, M. Machius, P. Joyet, *Prot. Eng.*, **16**, 287 (2003).
- [9] A. S. Bommarius, J. M. Broering, *Biocatal. Biotransfor.*, **23**, 125 (2005).
- [10] J. Sylvestre, H. Chautard, F. Cedrone, *Org. Proc. Res. Dev.*, **10**, 562 (2006).
- [11] M. Leisola, O. Turunen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 1225 (2007).
- [12] L. Que, *Bioinorganic Catalysis*, Second ed., Marcel Dekker, Inc, New York, (1999).
- [13] D. M. Arciero, J. D. Lipscomb, B. H. Huynh, T. A. Kent, E. Münck, *J. Biol. Chem.*, **258**, 4981-4991 (1983).
- [14] Y. Z. Wang, J. D. Lipscomb, *Protein Expr. Purif.*, **10**, 1-9 (1997).
- [15] Y. R. Boldt, M. J. Sadowsky, L. B. M. Ellis, L. Que, Jr., L. P. Wackett, *J. Bacteriol.*, **177**, 1225-1232 (1995).
- [16] A. Gibello, E. Ferrer, M. Martin A. Garridopertierra, *Biochem. J.*, **301**, 145-150 (1994).
- [17] T. Oka, F. J. Simpson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 1-5 (1971).
- [18] A. G. Prescott, M. D. Lloyd, *Nat. Prod. Rep.*, **17**, 367 (2000).
- [19] E. L. Hegg, L. Que, Jr., *Eur. J. Biochem.*, **250**, 625 (1997).
- [20] E. I. Solomon, T. C. Brunold, M. I. Davis, J. N. Kemsley, S.-K. Lee, N. Lehnert, F. Neese, A. J. Skulan, Y.-S. Yang, J. Zhou, *Chem. Rev.*, **100**, 235 (2000).
- [21] C.-K. Liu, C.-A. Hsu, M. T. Abbott, *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 180 (1973).
- [22] M. J. Ryle, R. Padamkumar, R. P. Hausinger, *Biochemistry*, **38**, 15278 (1999).
- [23] K. I. Kirivikko, T. Pihlajaniemi, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, D. L. Purich, Ed., Wiley Interscience, **72**, 325 (1998).
- [24] B. Lindblad, G. Lindstedt, S. Lindstedt, M. Rundgren, *J. Biol. Chem.*, **252**, 5073 (1977).
- [25] D. O. Adam, S. F. Yang, *PNAS*, **76**, 170 (1979).
- [26] J. G. Dong, J. C. Fernandez-Maculet, S. F. Yang, *PNAS*, **89**, 9789 (1992).

- [27] G. D. Peiser, T. T. Wang, N. E. Hoffman, S. F. Yang, H.W. Liu, C. T. Walsh, *PNAS*, **81**, 3059 (1984).
- [28] M. Costas, M. P. Mehn, M. P. Jensen, L. Que, Jr., *Chem. Rev.*, **104**, 939 (2004).
- [29] Z. Zhang, J. S. Ren, I. J. Clifton, C. J. Schofield, *Chem. Biol.*, **11**, 1383 (2004).
- [30] D. G. Mcrae, J. A. Coker, R. L. Legge, J. E. Thompson, *Plant Physiol.*, **73**, 784 (1983).
- [31] J. J. Smith, P. John, *Phytochemistry*, **32**, 1381 (1993).
- [32] J. C. Fernandez-Maculet, J. G. Dong, S. F. Yang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **193**, 1168 (1993).
- [33] A. M. Rocklin, *PNAS*, **96**, 7905 (1999).
- [34] N. M. W. Brunhuber, J. L. Mort, R. E. Christoffersen, N. O. Reich, *Biochemistry*, **39**, 10730, (2000).
- [35] J. S. Thrower, R. Blalock, J. P. Klinman, *Biochemistry*, **40**, 9717 (2001).
- [36] A. M. Rocklin, K. Kato, H. W. Liu, L. Que Jr., J. D. Lipscomb, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **9**, 171 (2004).
- [37] D. L. Tierney, A. M. Rocklin, J. D. Lipscomb, L. Que Jr., B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 7005 (2005).
- [38] J. Zhou, A. M. Rocklin, J. D. Lipscomb, L. Que Jr., E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 4602 (2002).
- [39] J. E. Baldwin, D. A. Jackson, R. M. Adlington, B. J. Rawlings, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 206 (1985).
- [40] W. Ghattas, C. Gaudin, M. Giorgi, A. Rockenbauer, A. J. Simaan, M. Réglie, *Chem. Commun.*, 1027 (2006).
- [41] W. Ghattas, M. Giorgi, C. Gaudin, A. Rockenbauer, M. Réglie, A. J. Simaan, *Biinorg. Chem. Appl.*, 43424 (2007).
- [42] W. Ghattas, M. Giorgi, Y. Mekmouche, T. Tanaka, A. Rockenbauer, M. Réglie, Y. Hitomi, A. J. Simaan, *Inorg. Chem.*, **47**, 4627 (2008).
- [43] W. Ghattas, Z. Serhan, N. El Bakkali-Taheri, M. Réglie, M. Kodera, Y. Hitomi, A. J. Simaan, *Inorg. Chem.*, **48**, 3910 (2009).
- [44] S. Routier, H. Vezin, E. Lamour, J. L. Bernier, J. P. Catteau, C. Bailly, *Nucl. Acids Res.*, **27**, 4160 (1999).
- [45] K. C. Gupta, A. K. Sutar, C. C. Lin, *Coord. Chem. Rev.*, **254**, 1926 (2009).
- [46] J. Woltinger, J. E. Bäckvall, A. Zsigmond, *Chem. Eur. Jr.*, **5**, 1460 (1999).
- [47] B. Fan, H. Li, W. Fan, C. Jin, R. Li, *Appl. Catal., A: G.*, **340**, 67 (2008).

- [48] J. Kaizer, E. J. Klinker, N. Y. Oh, J.-U. Rohde, W. J. Song, A. Stubna, J. Kim, E. Münck, W. Nam, L. Que, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 472 (2004).
- [49] I. W. Pang, Dennis V. Stynes, *Inorg. Chem.* **590**, Vol. 16, No. 3 (1977).