

A CaL-B lipáz nanorészecskékre való rögzítése valamint alkalmazása optikailag tiszta aril, heteroaril szekunder alkoholok előállítására

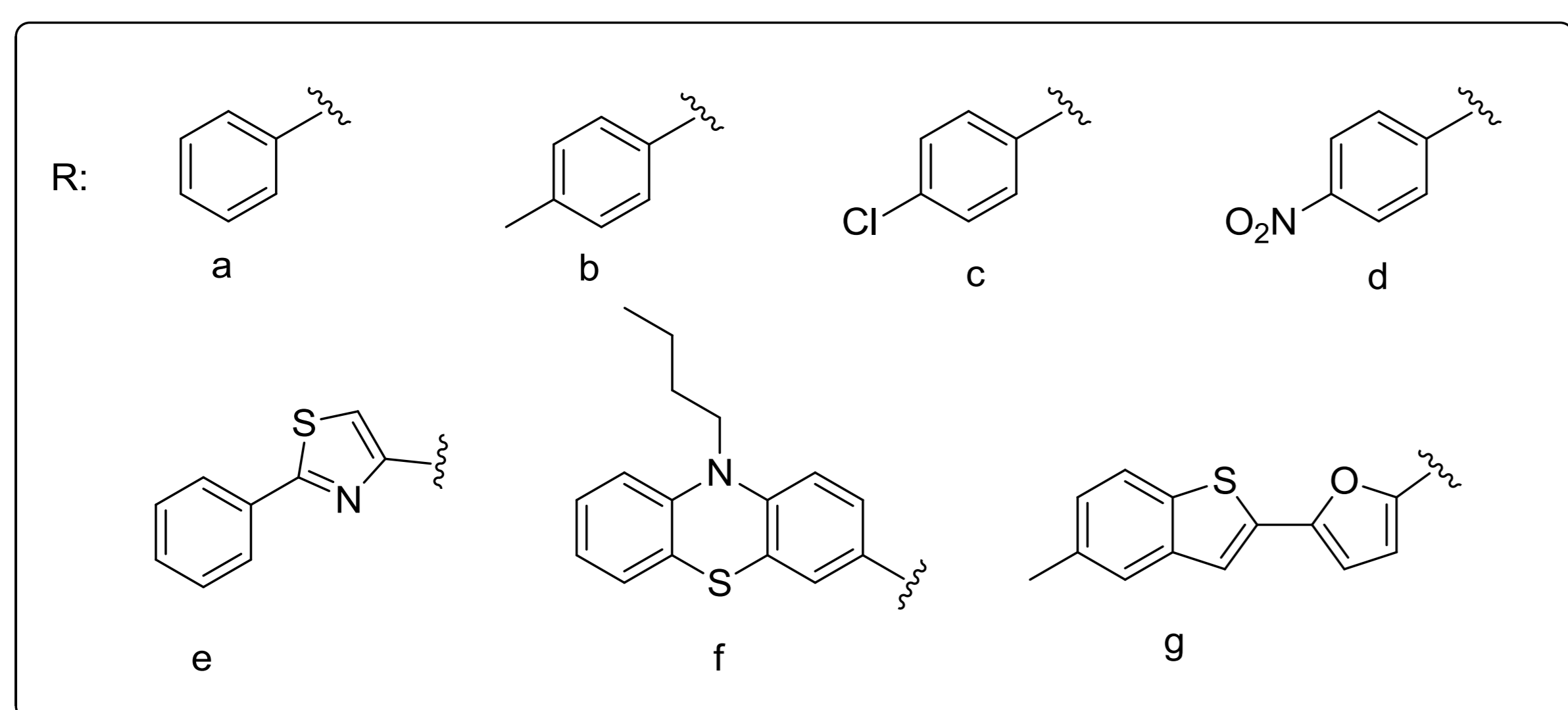
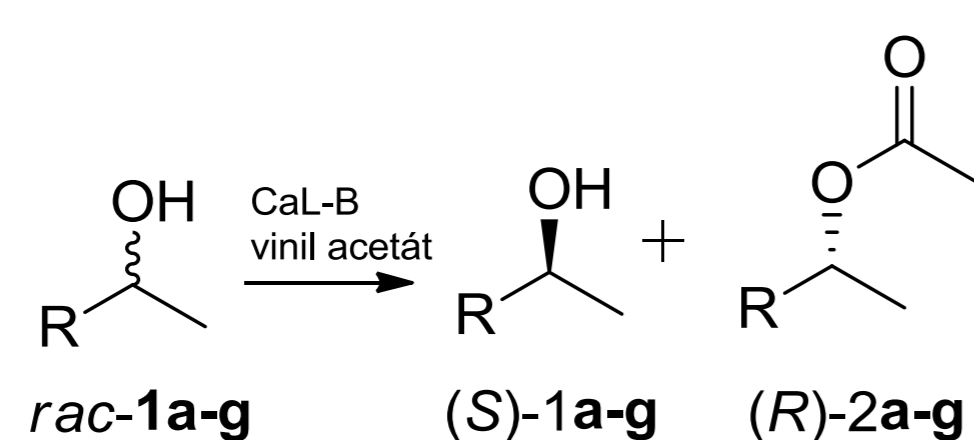
GAL Cristian Andrei, Dr. BARTHA-VÁRI Judith-Hajnal, NAGY Emma-Zsófia-Aletta, TIPONUȚ Norbert, Dr. BENCZE László-Csaba, Dr. TOȘA Monica Ioana, Dr. KATONA Gabriel, Dr. PAIZS Csaba*

Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kémia és Vegyészmérnöki Kar, Arany János utca 11 szám, 400028, Kolozsvár

Bevezető: Számos olyan enantiomertiszta heteroaril alkohol ismert, amely biológiai aktivitással rendelkezik, vagy pedig prekuzorként alkalmazható különböző gyógyszerek előállításában¹. Kutatómunkánk célja királis (hetero)aril vázakra épülő szekunder alkoholok enantioszelektív szintézise nanohordozókra immobilizált CaL-B segítségével². A szén nanocsövet széles körben alkalmazzák biomakromolekulák immobilizálására a mechanikai, termikus, elektromos tulajdonságai illetve az általános biokompatibilitása miatt, mivel nagy rögzítő felületet biztosít, kis diffúziós gáttal és könnyű újrahasonosíthatósággal³. Az így immobilizált enzim magas enantioszelektivitást és aktivitást mutatott számos racém (hetero)aril alkohol enantioszelektív acilezésében, bizonyítva alkalmazhatóságát a biokatalízis területén.

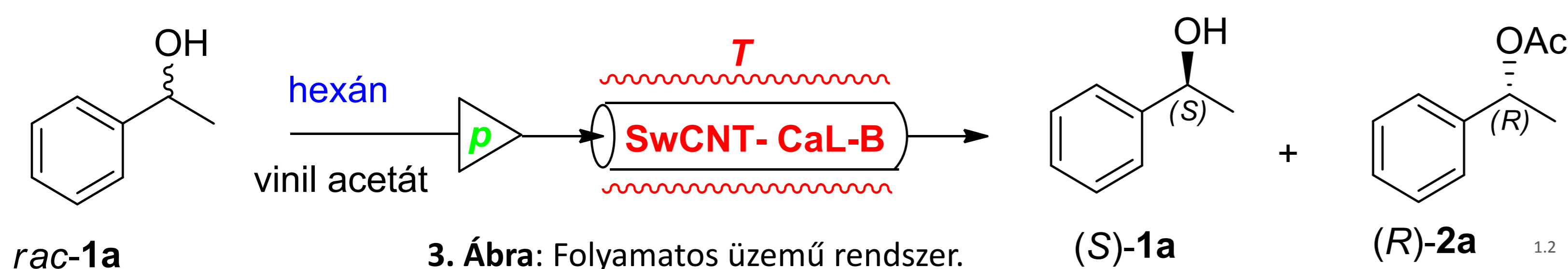
Alkalmazott módszerek: A kereskedelmi forgalomból megvásárolt SwCNT_{COOH}-et karbonil diimidazollal aktiváltuk, majd az 1,3-propán diamin linkerrel reagáltattuk, ezt követte a glicerol diglicidil éterrel a keresztkapcsolás és végül az enzim hozzáadása Tween 80 felületaktív anyag jelenlétében (**1. Ábra**). Vizsgáltuk az ideális enzim:hordozó arányt is (2:1). Az így általunk előállított biokatalizátort szekunder alkoholok kinetikus rezolúciójában vizsgáltuk (**2. Ábra**) „batch” rendszerekben. Továbbá modell szubsztrátként *rac-1a*-t rezolváltunk folyamatos üzemű („flow”) rendszerben (**3. Ábra**).

Eredmények: Az enzimkészítmények reprodukálhatósága és az immobilizálás határfoka egyaránt magas volt (>99%). Az általunk vizsgált alkoholokra nagy enantioszelektivitást és aktivitást mutatott az enzimpreparátum (*rac-1a-g*). Oldószer vizsgálatot végeztünk a szubsztrátumokra (**1. Táblázat**), acilező szerként vinil acetátot használtunk. „Batch” rendszerben vizsgáltuk az újrahasonosíthatóságot és a hőmérséklet befolyását, az optimális körülményeket használva (*rac-1a*) (**4. Ábra**).

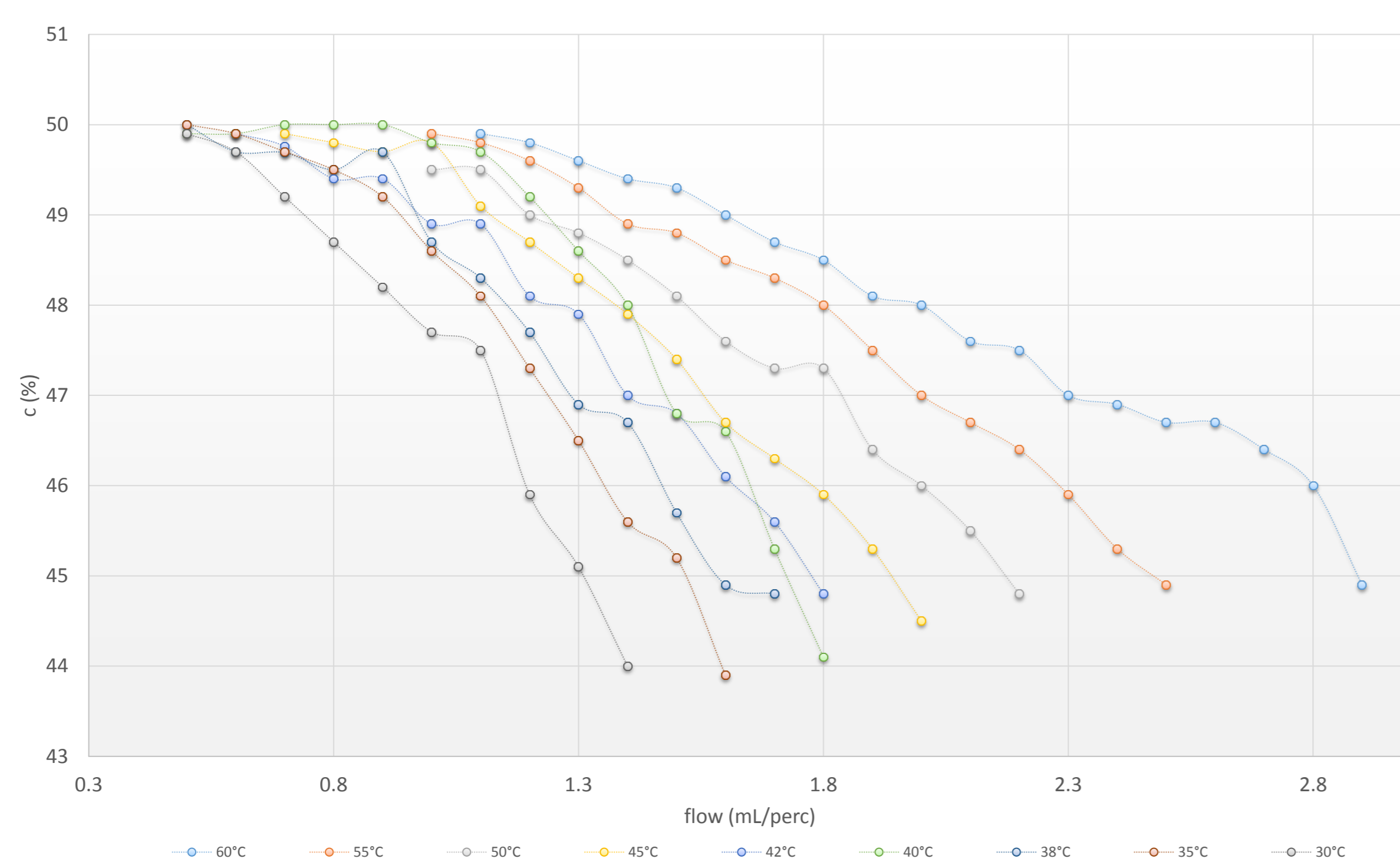


2. Ábra: Enzimatiszta rezolúció „batch” rendszerben.

Az enzimkészítményt folyamatos üzemű reaktorban vizsgáltuk, a hőmérsékletet változtattuk (60, 55, 50, 45, 42, 40, 38, 35, 30°C-on vizsgáltuk), minden esetben a maximális konverzió értékétől (50%), 45%-os konverzióig vizsgáltuk az átfolyási sebesség befolyását a konverzióra (**5. Ábra**) (ID PTFE SynBioCart reaktor, 20 mm × 4,6 mm, 80 mg enzim; V=332,38 mm³, 75%-os telítetlenség).



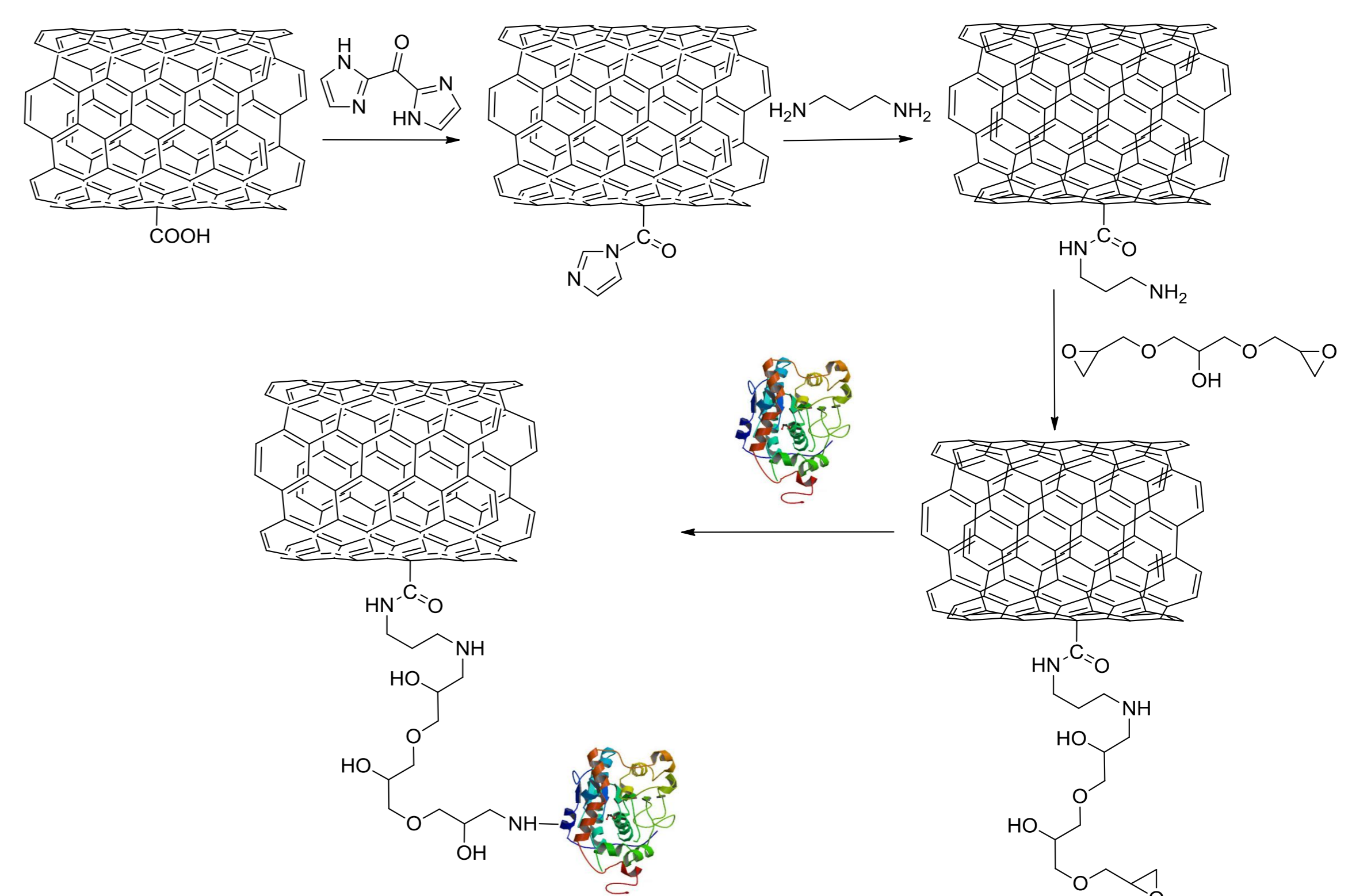
3. Ábra: Folyamatos üzemű rendszer.



5. Ábra: Összesített eredmények „flow” rendszerben *rac-1a*-ra (2 mg/mL *rac-1a*, 10 ek. vinil acetát, hexán).

Köszönetnyilvánítás: az anyagi támogatást a PN-II-PT-PCCA-2011-3.1-1268 számú kutatási projekt biztosította.

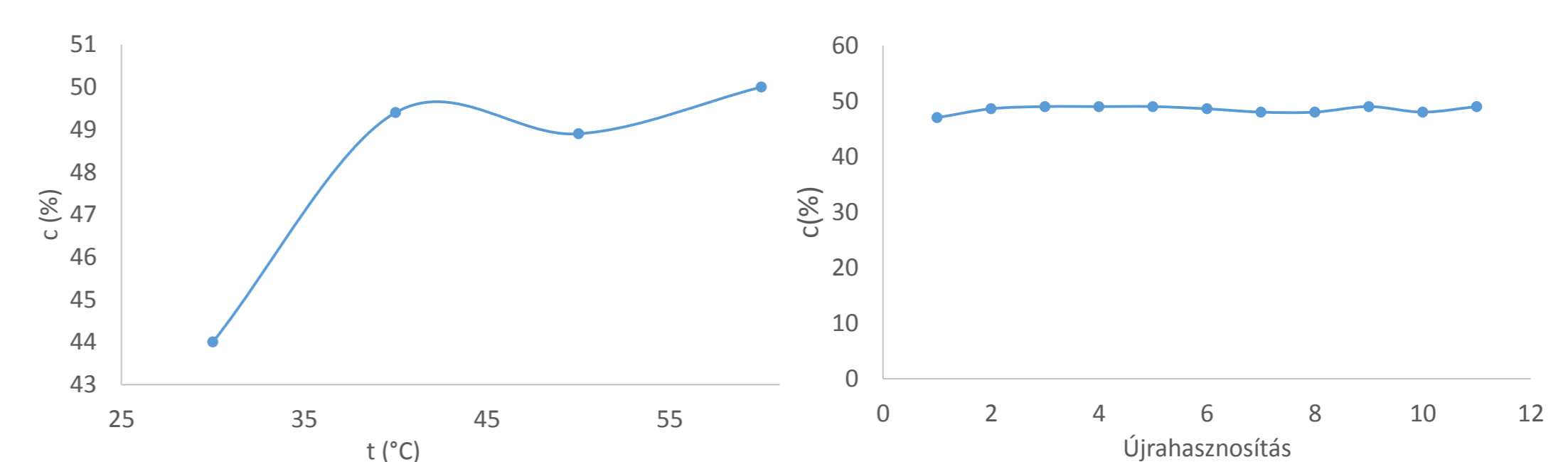
Irodalomjegyzék: 1. Brem, J; Toșa, M. I.; Paizs, C.; Munceanu, A.; Matkovic-Calogovic, D; Irimie, F. D. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**, 1993–1998. 2. Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, 40 (6), 1451–1463. 3. Pavlidis, I. V.; Vorhaben, T.; Tsoufis, T.; Rudolf, P.; Bornscheuer, U. T.; Gournis, D.; Stamatis, H. *Bioresour. Technol.* **2012**, 115, 164–171.



1. Ábra: Immobilizálás menete i) CDI/CH₂Cl₂; ii) H₂N(CH₂)₃NH₂/H₂O iii) glicerol diglicidil éter/CH₂Cl₂; iv) CaL-B/PBS puffer (20 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7).

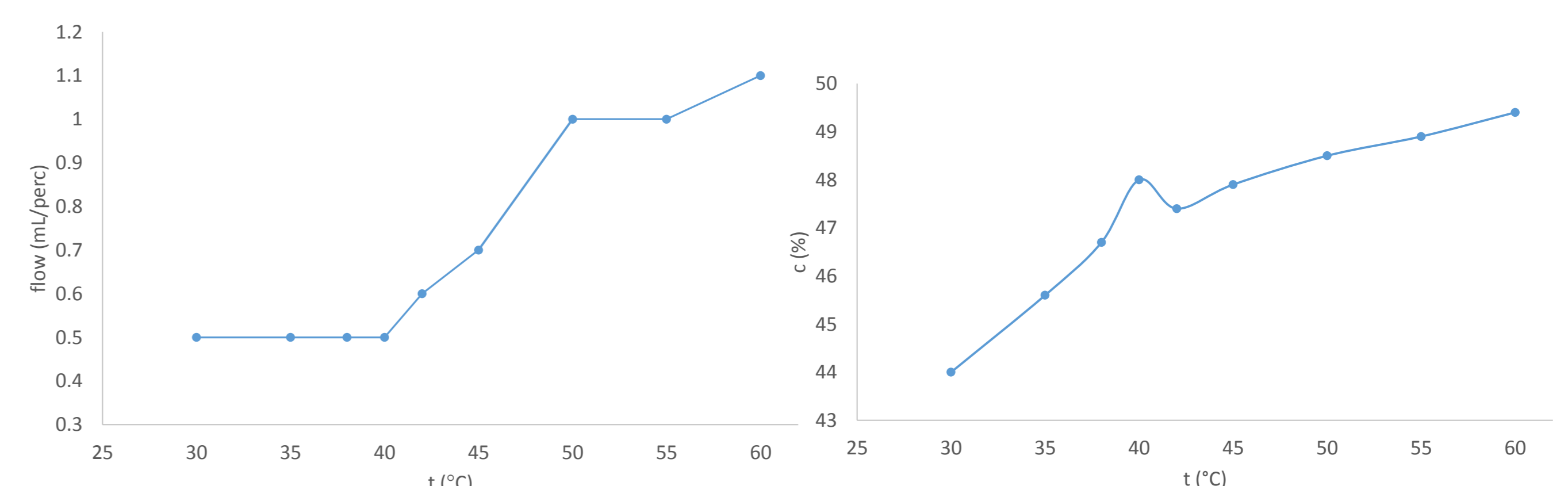
1. Táblázat: Optimális oldószer *rac-1a-g* esetén (*rac-1a-g* 2 mg/mL, 10 ek. vinil acetát, 1 mg CaL-B).

Szubsztrátum	Oldószer	Idő (h)	ees (%)	ee _p (%)	c (%)	E
<i>rac-1a</i>	hexán	4	99	99	50	>>200
<i>rac-1b</i>	hexán	4	99	99	50	>>200
<i>rac-1c</i>	hexán	4	99	99	50	>>200
<i>rac-1d</i>	DIPE	8	98	98	50	>>200
<i>rac-1e</i>	t-BME	8	96	99	49	>>200
<i>rac-1f</i>	t-BME	18	94	99	48	>>200
<i>rac-1g</i>	DIPE	14	99	98	49	>>200



4. Ábra: „Batch” rendszerben az újrahasonosíthatóság és a hőmérséklet hatásának vizsgálata a *rac-1a*-ra (*rac-1a* 2 mg/mL, 10 ek. vinil acetát, 1 mg CaL-B).

A „flow” eredményeket felhasználva, ábrázoltuk a hőmérséklet és az átfolyási sebesség viszonyát (c>49%) (**6. Ábra**), valamint a konverzió hőmérséklet függését állandó átfolyási sebesség mellett (f=1.4 mL/perc) (**7. Ábra**) (mikroreaktor paraméterei).



6. Ábra: A maximális konverziót biztosító átfolyási sebesség értéke a hőmérséklet függvényében.

7. Ábra: Állandó flow mellett a konverzió profil a hőmérséklet függvényében.

Összefoglaló:

- az általunk immobilizált enzim optikailag aktív szekunder alkoholok rezolválásában, „batch” és „flow” rendszerekben magas aktivitást és stabilitást mutatott
- hőmérséklet és átfolyási sebesség profilja is széles körben változtatható
- az általunk eddig vizsgált körülmények között a maximális szubsztrát koncentráció 50 mg/mL volt, ahol elértük a maximális elméleti konverziót
- a modell szubsztráton kívül „flow” rendszerben *rac-1c*-ra és para bróm feniletanolra is vizsgáltuk aktivitását ami szintén magas volt.