

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie  
Studijní obor: Biochemie



Bc. Michal Tupec

Chemoenzymová syntéza antivirálních profarmak

Chemo-enzymatic synthesis of antiviral prodrugs

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Konzultant: Ing. Marie Zarevúcka, CSc.

Praha 2015

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Michal Tupec

## **Poděkování**

Na tomto místě bych velice rád poděkoval paní Ing. Marii Zarevúcke, CSc., a paní prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc., za jejich vedení, četné rady a inspiraci při řešení diplomové práce.

Dále mé díky patří všem členům skupiny *Infochemikálií*, zejména pak Ing. Janě Brabcové, Ph.D., a Ing. Martině Kojecké, a členům skupiny *Chemie sociálního hmyzu* na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i., za vytvoření přátelského prostředí.

Jsem zavázán panu doc. José M. Palomovi, Ph.D., a jeho týmu za poskytnutí zázemí a užitečných rad v průběhu stáže na *Instituto de Catálisis y Petroleoquímica* v Madridu.

V neposlední řadě děkuji paní RNDr. Marcele Krečmerové, CSc., za poskytnutí syntetických derivátů nukleosidů a paní Mgr. Soně Hermannové, Ph.D., z Ústavu polymerů Vysoké školy chemicko-technologické Praha za provedení analýzy enzymových nosičů pomocí infračervené spektroskopie. Děkuji také paní Ing. Lucii Holasové z Analytické laboratoře na ÚOCHB za měření optické otáčivosti.

Děkuji celé svojí rodině za veškerou podporu v rámci studia.

Tato práce vznikla za finanční podpory v rámci interního grantu AV ČR (M200551203) a projektu na podporu ÚOCHB (RVO61388963).

## Abstrakt

Lipasy našly široké uplatnění při výrobě potravin a v některých odvětvích průmyslu, později i v syntetické organické chemii, kde za velmi mírných podmínek katalyzují hydrolytické a esterifikační reakce v rámci chemie chránicích skupin či za účelem rozlišení enantiomerů.

V této práci byla komerčně dostupná lipasa z bakterie *Pseudomonas fluorescens* imobilizována pomocí sol-gelového procesu do organokřemičitých materiálů s propylovým, oktylovým nebo fenylovým substituentem. Nejvyšší hydrolytická aktivita byla zjištěna u enzymu na oktylovém nosiči. Imobilizované enzymy se mezi sebou lišily v hydrolytické aktivitě stanovené na různě dlouhých 4-nitrofenylesterech. Další experimenty ukázaly na poměrně dobrou pH stabilitu enzymů při inkubacích (pH 3 až 11) a dále také dobrou teplotní stabilitu v isooktanu (teploty až 100 °C). Většina organických rozpouštědel nemá výrazný vliv na aktivitu lipasy.

Za použití modelové látky ze skupiny acyklických analogů nukleosidů – 9-(2',3'-dihydroxypropyl)adeninu (DHPA) – byla provedena řada biokatalytických pokusů. Bylo např. zjištěno, že jako donory acylu jsou nejvhodnější vinylestery, že lipasa vykazuje preferenci k vinylesterům s delším acylem, že esterifikace DHPA nejrychleji probíhá v nepolárních rozpouštědlech a že je možná i v rozpouštědlech, v nichž je tato látka zcela nerozpustná. Pokusy o esterifikaci dalších acyklických analogů stejně jako pokusy o enantioselektivní esterifikaci DHPA byly neúspěšné.

Uspokojivé výsledky byly získány i při acylacích druhého modelového substrátu 2-fenylpropanolu, kde např. v případě reakce vedoucí k jeho benzoátu docházelo k měřitelné preferenci lipasy vůči *S* enantiomeru.

Klíčová slova: sol-gel, chromatografie, imobilizace, bioorganická chemie

## Abstract

Lipases have been widely applied in the manufacture of food products and in some areas of the industry, nowadays they are used in synthetic organic chemistry catalyzing the hydrolytic/esterification reactions under very mild conditions in the field of protecting groups or enantiomer resolution.

In this study, the commercial lipase from bacterium *Pseudomonas fluorescens* was immobilized using the sol-gel process into organosilicate materials with propyl, octyl or phenyl substituents. The highest hydrolytic activity was found in the enzyme on the octyl-derived carrier. The immobilized enzymes differ in their hydrolytic activities on 4-nitrophenyl esters of various lengths. Subsequent experiments revealed quite good pH stability of the enzymes in a buffer (incubations in pH 3 through pH 11), as well as good temperature stability in isoctane (incubations at up to 100 °C). The majority of organic solvents seem to have no substantial effect on the lipase activity.

The biocatalytic properties were studied on a model compound from the group of the acyclic nucleoside analogues, 9-(2',3'-dihydroxypropyl)adenine (DHPA). It was found for example that the best acyl donors are vinyl esters, that the lipase shows a preference towards longer vinyl esters, that the reaction proceeds faster in non-polar solvents or that it is possible even under the conditions where the substance is completely insoluble. The attempts for the esterification of other acyclic nucleoside analogues were unsuccessful, and so it was in the case of enantioselective esterification of DHPA.

Satisfactory results were obtained also during the acylation reactions of the second model compound 2-phenylpropanol. For example, in the reaction leading to a benzoate ester the lipase was found to prefer the *S* enantiomer to a certain extent.

(In Czech)

Keywords: sol-gel, chromatography, immobilization, bioorganic chemistry

# Obsah

Seznam zkratk a značek	8
1 Úvod	9
1.1 Lipasy a katalýza nukleofilní substituce	9
1.2 Imobilizace enzymů	17
1.3 Acyklické analogy nukleosidů	28
2 Cíl práce	36
3 Materiál a metody	37
3.1 Chemikálie a roztoky	37
3.2 Enzymy	40
3.3 Přístrojové vybavení	40
3.4 Charakterizace enzymů	43
3.5 Imobilizace lipas	49
3.6 Biotransformační reakce katalyzované připravenými lipasami	50
3.7 Analýza složek reakčních směsí	55
3.8 Statistická analýza, využití výpočetních technologií	61
4 Výsledky	63
4.1 Výsledky imobilizace a charakterizace enzymů	63
4.2 Výsledky biotransformačních reakcí	76
5 Diskuze	92
5.1 Imobilizace a charakterizace enzymů	92
5.2 Biotransformační reakce katalyzované lipasami	94
6 Shrnutí	100
Literatura	101

## Seznam zkratek a značek

Následující seznam zkratek a značek použitých v této práci zahrnuje i výrazy od udaných odvozené.

$[\alpha]$	optická otáčivost, $[[\alpha]] = ^\circ$	KN	komerční název
%v	objemové procento	$J$	$J$ -vazba ( $J$ -coupling), $[J] = \text{Hz}$
%w	hmotnostní procento	m	multiplet
@	(imobilizovaný) na nosiči	MEHQ	4-methoxyfenol
$\delta$	chemický posun, $[\delta] = \text{ppm}$	MTBE	<i>tert</i> -butylmethylether
ABq	(pseudo)kvartet spinového systému ABX	$N$	počet hodnot v souboru
APT	test vázaných protonů ( <i>attached proton test</i> )	$p$	$p$ -hodnota
ar.	aromatický	P	produkt
$a_w$	aktivita vody	$PfL$	lipasa z <i>Pseudomonas fluorescens</i>
C	stupeň konverze	q	kvartet ( <i>quartet</i> )
CaLB	lipasa B z <i>Pseudozyma antarctica</i> (dříve <i>Candida antarctica</i> )	$r$	korelační koeficient
COSY	korelační spektroskopie ( <i>correlation spectroscopy</i> )	R	$R$ enantiomer
d	dublet	RPM	otáčky za minutu ( <i>revolutions per minute</i> )
DHPA	9-(2',3'-dihydroxypropyl)adenin	s	singlet
E	enzym	S	substrát
$E$	enantioselektivita	$S$	$S$ enantiomer
$ee$	enantiomerní přebytek ( <i>enantiomeric excess</i> )	SG	sol-gel, ormosil
HMBC	heteronukleární vícevazebná korelační spektroskopie ( <i>heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy</i> )	t	triplet
HQ	hydrochinon	$t_R$	retenční čas, $[t] = \text{min}$
HSQC	heteronukleární jednokvantová korelační spektroskopie ( <i>heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy</i> )	TEOS	tetraethoxysilan
		TES	triethoxysilan
		TMOS	tetramethoxysilan
		TMS	trimethoxysilan



# 1 Úvod

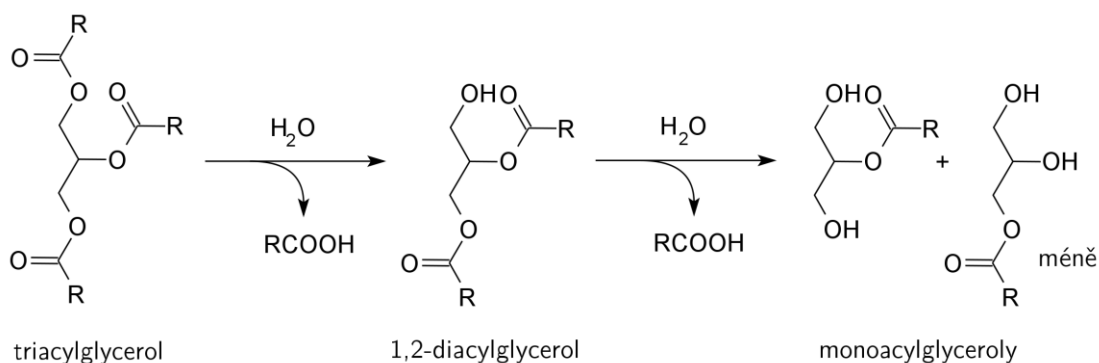
Tato diplomová práce je zaměřena na využití imobilizovaných lipas při esterifikacích nepřirozených substrátů v organickém prostředí.

## 1.1 Lipasy a katalýza nukleofilní substituce

Lipasy patří spolu s proteasami a glykosidasami k nejdůležitějším hydrolytickým enzymům. V dnešní době jsou jejich specifické katalytické vlastnosti využívány v široké oblasti organické syntézy a biotechnologie.

### 1.1.1 Lipasy

Lipasy (EC 3.1.1.3<sup>1</sup>) neboli triacylglycerolacylhydrolasy jsou středně velké rozpustné proteiny katalyzující hydrolýzu esterových vazeb v jednoduchých tucích (glyceridy, estery glycerolu a mastných kyselin, na obr. 1) [1,2]. Od dalších esteraz se odlišují právě specificitou pro substráty s delšími acyly (kapryláty a delší), které běžně tvoří s vodnou fází emulze [3,4].



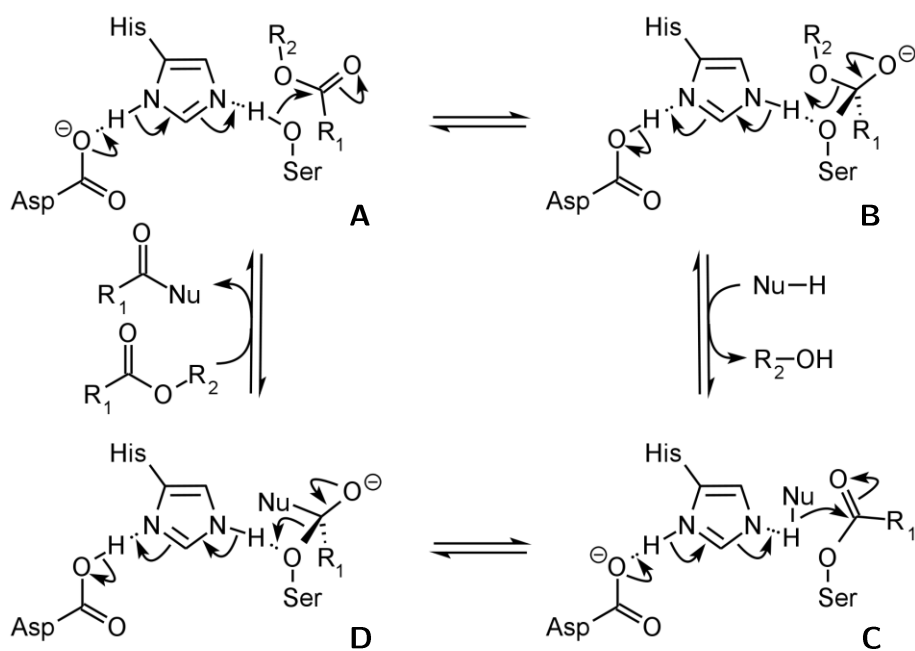
Obr. 1: Hydrolýza triacylglycerolů (lipolýza) katalyzovaná lipasami.

Nejznámější savčí lipasa, tzv. pankreatická lipasa, působí v tenkém střevě, kam je spolu s dalšími enzymy v podobě trávicích šťáv vylučována slinivkou břišní [5]; v krvi, játrech a ledvinách převládají spíše esterasy [3]. Pankreatická lipasa hraje velmi důležitou roli při trávení tuků [5,6]. Pokud koncentrace solí žlučových kyselin (zejména taurodeoxycholátu) ve střevě překročí kritickou micelární koncentraci, dochází k inhibici pankreatické lipasy. Tato inhibice lipolýzy se však neuplatňuje, je-li přítomen malý protein zvaný kolipasa [7], který se s lipasou asociuje.

<sup>1</sup> Číslo enzymové klasifikace.

Rychlost hydrolýzy glycerylesterů má následující relativní pořadí, které se vysvětluje vlivem indukčního efektu a sterické náročnosti v alkoholové části esteru [8]: triglycerid > 1,2-diglycerid > 1,3-diglycerid > 1-monoglycerid > 2-monoglycerid. Nejprve tedy vznikají ve větší míře 1,2-glyceridy, které jsou poté pomaleji hydrolyzovány na 2-monoglyceridy [6]; u těchto sekundárních esterů byla popsána možnost neenzymové izomerizace za vzniku primárních 1-monoglyceridů.

Lipasy nesou řadu strukturních rysů společných s proteasami [6,9]. Jádro proteinu bývá tvořeno osmi paralelními  $\beta$ -skládanými listy spojenými se šesti  $\alpha$ -helikálními úseky – toto uspořádání nese název  $\alpha/\beta$  hydrolasové ( $\alpha/\beta$  hydrolase fold) [10]. Zajímavým strukturním motivem lipas je  $\alpha$ -helikální smyčka, která se nachází v těsné blízkosti aktivního místa, částečně ho zakrývá a stabilizuje pomocí elektrostatických interakcí a hydrofobního efektu; tato smyčka bývá nazývána jako hydrofobní „víčko“ (*hydrophobic lid*) [9,11]. Například lidská pankreatická lipasa nebo lipasa z houby *Geotrichum candidum* jsou glykoproteiny [6,11].

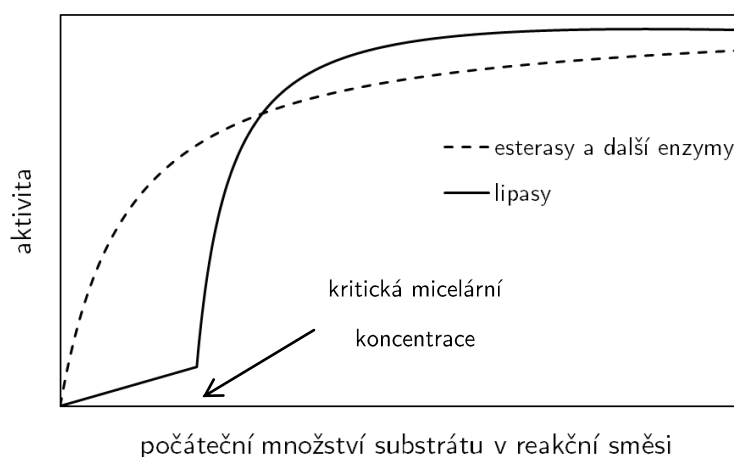


Obr. 2: Katalytický cyklus lipasy (podle [12,13]).

Aktivní centrum lipas je podobně jako u serinových proteas tvořeno velmi konzervovanou trojicí aminokyselin, tzv. katalytickou triádou (obr. 2), která je umístěna na ohybech  $\alpha/\beta$  hydrolasového uspořádání; prostorové rozmístění jednotlivých aminokyselin v aktivním místě lipas však není stejné jako u proteas [9,6,11]. Jedná se o serin, histidin a aspartát/glutamát, přičemž histidin se nachází uprostřed triády jako zprostředkovatel přenosu protonů.

Katalytický cyklus lipasy představuje obecně nukleofilní substituci na karbonylové skupině (obr. 2 na str. 10); začíná deprotonací zbytku serinu, jenž se následně aduje na karbonylovou vazbu prvního substrátu (A) [12–14], kterým je karboxylová kyselina nebo její derivát. Vzniká první tetraedrický intermediát (B) a jeho záporný náboj je stabilizován dvěma NH jednotkami peptidového řetězce, které tvoří tzv. oxyaniontovou jamku (*oxyanion hole*) [9,11]. Eliminací odstupující skupiny (1. produkt) se získá acyl-enzymová forma lipasy (C), což je vlastně druhý produkt reakce, který je za určitých podmínek izolovatelný [15]. Do aktivního centra se poté dostává druhý substrát – vhodný nukleofil (NuH; voda, alkohol, amin apod.) –, jenž se aduje na karbonyl *O*-acylserinu za vzniku druhého tetraedrického intermediátu (D). Ten se opět rozpadá společně s regenerací aktivního místa (uvolnění serinu) a vznikem posledního produktu reakce, jímž je modifikovaný derivát karboxylové kyseliny nebo karboxylová kyselina.

Z kinetického hlediska se lipasy od ostatních enzymů liší především tím, že nejvyšších aktivit dosahují, pokud je jejich substrát přítomen ve druhé fázi např. ve formě emulze a je tedy překročena jeho rozpustnost nebo kritická micelární koncentrace [16,17]. Při nízkých koncentracích stoupá aktivita lipasy se vzrůstající koncentrací substrátu jen velmi pozvolna (obr. 3), kdežto při stejných koncentracích způsobuje rozpustný substrát u esterasy výraznější nárůst aktivity podobně jako tomu je u většiny enzymů, které vyhovují kinetickému modelu podle Michaelise a Mentenové [14].

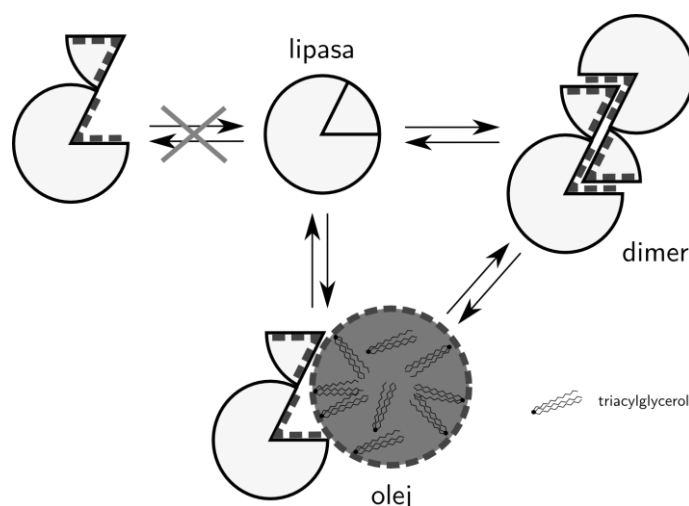


Obr. 3: Enzymová kinetika lipas a esterasy v závislosti na koncentraci substrátu (podle [14]).

Tomuto jevu, jenž je základem pro odlišení lipas od jiných esterasy, se říká aktivace v mezifázi (*interfacial activation*) a jako hlavní příčina se uvádí existence dvou

základních konformací lipasy – uzavřené formy a katalyticky aktivní otevřené formy (možné stavy jsou znázorněny na obr. 4) [6,18–20].

V případě uzavřené formy hydrofobní část „víčka“ interaguje oblastí, kde se nachází aktivní místo enzymu a do jisté míry brání průběhu reakce [18]. Pokud je lipasa volně rozpuštěna v roztoku, uzavřený stav převládá, jelikož otevřená konformace s odhalením hydrofobních skupin (vlevo na obr. 4) je v polárním prostředí méně termodynamicky stabilní. Během procesu adsorpce lipasy na povrch jiné fáze, může se jednat o substrát nebo jinou složku reakční směsi (stěna reakční nádoby apod.), dojde ke konformačnímu posunu „víčka“ směrem od aktivního místa a reakce může probíhat bez omezení [18]; teprve při změně konformace se vytvoří oxyaniontová jamka, která stabilizuje tetraedrický intermediát [18,21]. Adsorpce lipasy na substrát také znamená menší limitaci reakce, protože enzym ani substrát nemusejí difundovat v roztoku.



Obr. 4: Konformační stavy lipasy v závislosti na prostředí (podle [22]).

V případě, že je koncentrace molekul lipasy vysoká, může také dojít ke tvorbě dimerní seskupení, které navzájem interagují prostřednictvím hydrofobních oblastí, jak je naznačeno na obr. 4 vpravo [22,23].

Ne všechny lipasy vykazují zmíněný způsob aktivace, například u lipas *CaLB* nebo z *Pseudomonas glumae* a z *Bacillus subtilis* nebyla aktivace v mezifázi prokázána [24,14].

### 1.1.2 Využití lipas v biotechnologii

Existuje jen málo skupin enzymů, které ještě nebyly použity v organické syntéze či biotechnologii. Lipasy patří k těm nejčastěji využívaným enzymům, jelikož mají výhodu velmi široké substrátové specifity, vysoké stability v organických

rozpouštědlech (popsána i reakce při 100 °C [25]) a také nevyžadují pro katalytickou činnost žádné koenzymy, jež by jinak bylo nutné regenerovat [26]. Využití nacházejí např. v potravinářském (mléčné výrobky, pekárenství), kožedělném, kosmetickém a papírenském průmyslu, v rámci výroby pracích prášků a ve farmaceutickém a chemickém průmyslu při přípravě enantiomerně čistých látek [1,2,14,20,27].

Co se týče zastoupení zdrojových organizmů lipas, většinou se pracuje s lipasami z bakterií (rody *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus* a další) a z kvasinek (rody *Pseudozyma*, *Candida*, *Yarrowia*, ...), které tyto organizmy sekretují do extracelulárního prostoru, následují lipasy z plísní (rody *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Geotrichum* apod.) a méně užívané jsou savčí enzymy (např. vepřová pankreatická lipasa) [1,2,14,28]. Přestože jsou mikrobiální lipasy studovány už několik desítek let, stále existuje velké množství neprobádaných mikroorganismů nebo kmenů, které mohou být zdrojem lipas se zajímavými vlastnostmi. Poměrně časté je provádění screeningů půdních mikroorganismů s ohledem na stabilitu případných produkovaných lipas v organických rozpouštědlech nebo na jejich teplotní stabilitu, nebo se hledají nové enzymy přímo u extremofilů [14,29,30].

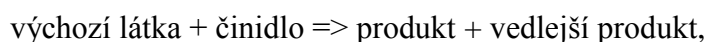
V průběhu let došlo na základě genomových studií u některých tradičních mikroorganismů produkujících lipasy ke změně taxonomického zařazení spojené se změnou jména (např. *Candida antarctica* => *Pseudozyma antarctica*, *Pseudomonas cepacia* => *Burkholderia cepacia*, *Mucor miehei* => *Rhizomucor miehei*). V této práci jsou pro jednotnost uváděna nová označení zdrojových druhů.

Výtěžek, regioselektivitu či stereoselektivitu reakce lze v organickém prostředí ovlivnit celou řadou faktorů. V první řadě hrají vždy roli vzájemné poměry výchozích látek a také poměry enzymu k výchozím látkám [31,32]. Důležitá je také charakteristika použitého enzymu, zda a jak je imobilizovaný apod.

Na průběh reakce má také vliv rozpouštědlo a teplota [26,33–37]. Ukazuje se, že většina reakcí s lipasami probíhá lépe v nepolárních rozpouštědlech [33]. Rozpouštědlo ovlivňuje reakci prostřednictvím relativní permitivity, dielektrické konstanty, rozdělovacího koeficientu nebo např. viskozity (souhrnné údaje běžně používaných rozpouštědel jsou uvedeny v tabulce 1 na str. 15) [38,39].

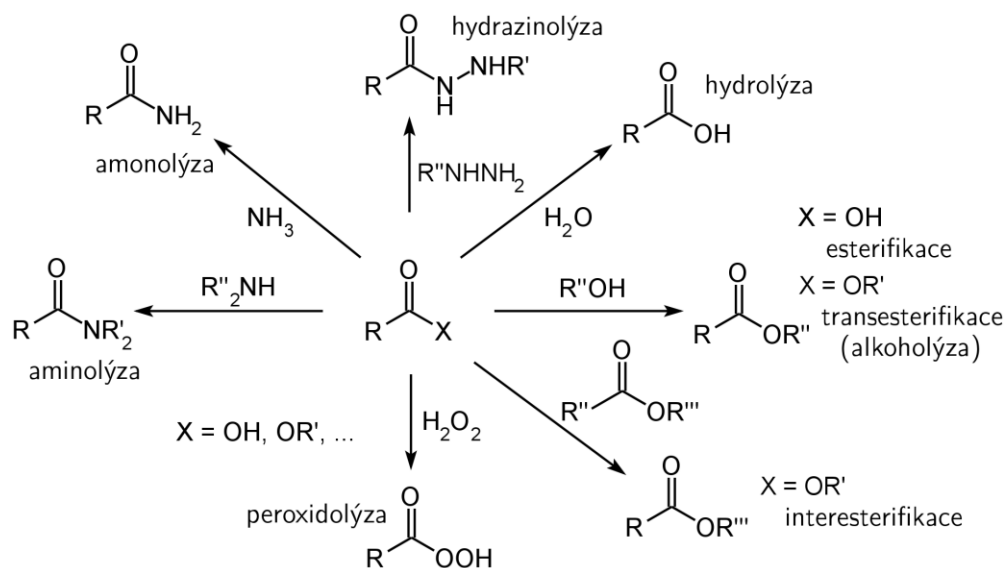
Často zkoumaným faktorem bývá také voda přítomná v reakční směsi [28,33,35,40], přesněji její termodynamická aktivita ( $a_w$ ). Ta může být poměrně přesně regulována pomocí přidavku různých anorganických solí do reakční směsi nebo preinkubací složek reakční směsi v přítomnosti jejich nasycených roztoků [41–43].

Lipasy jsou schopné katalyzovat reakce s nepřeberným množstvím substrátů, některé reakce derivátů karboxylových kyselin jsou uvedeny na obr. 5. Většina reakcí je prováděna podle obecné přeměny



přičemž za výchozí látku je považován ten substrát, jehož derivát chceme připravit a následně izolovat (má složitější strukturu, je dražší apod.), a jako činidlo se označuje druhý reaktivnější substrát (např. donor acylu, nukleofil), jenž je většinou v nadbytku. Na rozdíl od produktu, příp. výchozí látky, činidlo ani vedlejší produkt nebývají po provedení reakce izolovány/recyklovány.

Kromě esterifikačních reakcí kyselin a alkoholů katalyzují lipasy především transesterifikace a interesterifikace (podvojná záměna u esterů), dále pak syntézu amidů a hydrazidů, peroxykyselin nebo laktonů [20,28,44,45]. Lipasy také katalyzují hydrolýzy polyesterů [46] a velmi často jsou používány pro syntézu složek biodieselového paliva [47].



Obr. 5: Reakce derivátů karboxylových kyselin katalyzované lipasami v rámci biotechnologie (podle [20]).

Mezi zatím spíše okrajové aplikace lipas patří katalýza „nestandardních“ reakcí, resp. jejich spřažení s jinými bio- nebo (metalo)organokatalyzátory (tzv. *kombokatalýza*) [48]. Příkladem mohou být různé kondenzační reakce, např. Knoevenagelova kondenzace, Michaelova adice nebo Mannichova reakce [49–53], a nepřímá katalýza Priležajevovy reakce a Bayerovy-Villigerovy oxidace [50,54].

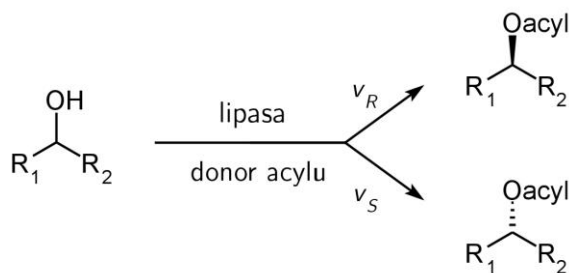
Tab. 1: Seznam běžných rozpouštědel a jejich vybraných vlastností [55–57].

rozpouštědlo	$\rho / \text{g.mL}^{-1}$	$\theta_b / ^\circ\text{C}$	$\eta / \text{cP}$	$\mu / \text{D}$	$\epsilon_r$	$\log P$
voda	0,998	100	0,89	1,85	80,2	—
dimethylsulfoxid	1,101	189	1,99	3,96	47,2	-1,35
dimethylformamid	0,945	153	0,79	3,82	38,3	-1,01
methanol	0,791	65	0,54	1,7	33	-0,74
dioxan	1,034	102	1,18	0,45	2,2	-0,42
acetonitril	0,786	82	0,37	3,93	36,6	-0,34
ethanol	0,789	78	1,07	1,69	25,3	-0,30
aceton	0,785	56	0,31	2,88	21	-0,24
kyselina octová	1,045	118	1,06	1,7	6,2	-0,17
2-propanol	0,781	82	2,04	1,58	20,2	0,05
2-butanon	0,805	80	0,43	2,76	18,5	0,25
tetrahydrofuran	0,883	66	0,46	1,75	7,5	0,46
pyridin	0,982	115	0,88	2,22	13,3	0,65
ethylacetát	0,900	77	0,42	1,78	6,1	0,73
vinylacetát	0,926	73	—	1,79	—	0,73
butanol	0,810	118	2,54	1,66	17,8	0,84
diethylether	0,714	35	0,22	1,15	4,3	0,89
<i>terc</i> -butylmethylether	0,741	55	0,27	1,32	4,5	1,05
dichlormethan	1,327	40	0,41	1,6	8,9	1,25
chloroform	1,479	61	0,54	1,04	4,8	1,97
diisopropylether	0,724	68	0,33	1,13	4,04	2,00
benzen	0,877	80	0,60	0	2,3	2,13
tetrachlormethan	1,594	77	0,91	0	2,2	2,64
toluen	0,867	111	0,56	0,38	2,4	2,73
cyklohexan	0,774	81	0,89	0	2	3,44
pentan	0,626	36	0,22	0	1,8	3,45
hexan	0,660	69	0,30	0,08	1,9	4,0
heptan	0,680	98	0,39	0	1,9	4,5
isooktan	0,692	99	0,5	—	1,9	4,5
olivový olej	0,911	300	84	—	—	>15

*Vysvětlivky:*  $\rho$  ... hustota;  $\theta_b$  ... bod varu;  $\eta$  ... viskozitní koeficient;  $\mu$  ... dipólový moment;  $\epsilon_r$  ... relativní permitivita;  $\log P$  ... rozdělovací koeficient oktanol/voda.

Studují se také aplikace biokatalyzátorů při reakcích v bezrozpuštědlových (*solvent-free*) podmínkách či v iontových kapalinách [58–60].

V neposlední řadě se lipasy používají při tzv. kinetickém rozlišení enantiomerů (*kinetic resolution*) [34,61,62], kde doplňují obecně velmi enantioselektivní oxidoreduktasy [63]. Kinetické rozlišení využívá chirální podstaty enzymů, resp. jejich aktivního místa, která může vést k tomu, že jeden z enantiomerů výchozí látky je enzymem přeměňován přednostně (tj. rychlosti  $v_R$  a  $v_S$  pro *R* a *S* enantiomer se liší, obr. 6 na str. 16) [61,62]. Čím vyšší je absolutní rozdíl v rychlostech, tím obohacenější bude produkt o jeden z enantiomerů. Kinetické rozlišení je komplementární například k chirálním separacím enantiomerů pomocí chromatografických metod nebo k diastereomerní krystalizaci, ale i k přímé asymetrické syntéze [62].



Obr. 6: Kinetické rozlišení enantiomerů alkoholu pomocí lipasy.

Při maximální konverzi (50 %) a enantioselektivitě ( $E > 200$ ) je možné získat polovinu výchozí látky ve formě čistého enantiomeru a druhou polovinu ve formě jejího enantiomerně čistého derivátu (produktu). Jelikož se jedná o chemicky odlišné sloučeniny, je možné od sebe oddělit klasickými izolačními metodami. Pro získání obou čistých enantiomerů výchozí látky je nutno vzniklý produkt ještě nespecificky (achirálně) převést zpět, např. hydrolýzou [61].

Na základě poznatků z asymetrické organické syntézy byly sestaveny vztahy pro výpočet parametrů stereoselektivity při biotransformacích [61]. Jedná se hlavně o veličinu enantiomerní přebytek, jež udává enantiomerní čistotu vznikajícího produktu, příp. substrátu, v průběhu reakce; obecně se vypočítá podle vzorce 1,

$$ee = \frac{a(M) - a(m)}{a(M) + a(m)} \quad (1)$$

kde  $ee$  ... enantiomerní přebytek,  $[ee] = 0$ ;  $a$  ... molární zlomek,  $[a] = 0$ ;  $M$  ... majoritní enantiomer;  $m$  ... minoritní enantiomer,

a pro výpočet enantioselektivity/enantiomerního poměru enzymu (*enantiomeric ratio*) slouží rovnice 2,

$$E = \frac{\ln [(1 - C)(1 - ee_S)]}{\ln [(1 - C)(1 + ee_S)]} \quad (2)$$

kde  $E$  ... enantioselektivita,  $[E] = 0$ ;  $C$  ... stupeň konverze,  $[C] = 0$ ;  $ee_S$  ... enantiomerní přebytek u substrátu,  $[ee] = 0$ .

Uvedené rovnice platí jen pro reakce, jež je možné aproximovat jako nevratné [64]. V případě rovnovážných reakcí je nutné do výpočtu zahrnout i hodnotu rovnovážné konstanty reakce.



## 1.2 Imobilizace enzymů

Imobilizace enzymů představuje proces, při kterém je enzym převeden, nejčastěji pomocí tzv. nosiče (*carrier, support*), na nerozpustnou formu, jež tvoří v reakční směsi novou fázi. Jedná se o přeměnu homogenního katalyzátoru (v případě reakcí ve vodných roztocích) na formu heterogenní, která je snáze separovatelná od dalších reakčních složek [65], což je velmi důležité pro ekonomické průmyslové aplikace biokatalyzátorů.

Obzvláště při reakcích ve vodném prostředí je imobilizace nutností, pokud je potřeba enzym posléze recyklovat. Volné formy enzymů nejsou rozpustné ve skoro žádném z organických rozpouštědel, takže se na ně dá pohlížet v tomto prostředí také jako na heterogenní složky; i zde však imobilizace může být žádoucí. Při klasických esterifikacích katalyzovaných lipasami se například kromě hlavního produktu (ester) uvolňuje i reakční voda, stejně tak bývá voda přítomna, ač v menší míře, i ve většině organických rozpouštědel; v prostředí s vodou nemísitelného rozpouštědla to pak znamená vysokou afinitu této vody k polárním látkám v enzymovém preparátu (včetně molekuly enzymu) a často v důsledku toho dochází k rozpuštění enzymu či ke tvorbě velice viskózní suspenze, kterou je velmi obtížné převézt zpět na suchý enzym s výchozí aktivitou [66].

Hlavními nevýhodami volných enzymů jsou také jejich nižší stabilita v extrémních podmínkách (pH, teplota, iontová síla) a nižší dlouhodobá stabilita ve vodném prostředí [65], např. v důsledku kontaminace mikroorganismy. Některé komerční enzymové preparáty dále bývají stabilizovány různými přídatnými složkami, tyto složky však mohou potenciálně interferovat s katalyzovanou reakcí nebo mohou být zdrojem neidentifikovatelných píků při chromatografických analýzách reakčních směsí. Dále se v případě volných enzymů v organickém prostředí může projevit limitace rychlosti reakce, protože molekuly enzymu mohou v důsledku obtížně dispergovatelných hustých shluků [33].

Naproti tomu za výhody použití neimobilizovaných enzymů při biotransformačních reakcích lze označit především nižší finanční náklady a také jistota zachování původní specifity a aktivity enzymu.

Imobilizované formy enzymů často vykazují stabilitu v širší oblasti pH a rovněž vyšší teplotní stabilitu než jejich volné formy [67]. V důsledku imobilizace může docházet ke změně substrátové specifity nebo např. ke zvýšení enantioselektivity [68–71]. U imobilizovaných lipas bývá často pozorována hyperaktivace (tedy po imobilizaci je získána vyšší celková aktivita, než jaká byla na začátku vzata

k imobilizaci), což může být způsobeno optimální orientací lipasy na povrchu nosiče [44,72–75].

Heterogenní biokatalyzátory vzniklé imobilizací lze po přípravě podrobně charakterizovat se zaměřením na samotný nosič nebo na enzym. Základními metodami charakterizace imobilizovaných enzymů, jsou stanovení enzymové aktivity [28]; hodnoty aktivity jsou vztaženy na hmotnost celého (*bulk*) nosiče nebo pouze na množství imobilizovaných proteinů, případně převedeny na relativní aktivity vztažením na aktivitu volného enzymu. Stanovení aktivity často mívají odlišné podmínky, než jaké se používají u rozpustných enzymů, jelikož je potřeba zajistit míchání směsi, aby nedocházelo k limitaci rychlosti reakce difuzí, nebo zajistit odlišný způsob vzorkování. U lipas a dalších hydrolytických enzymů se běžně stanovuje hydrolytická a syntetická (esterifikační) aktivita, přičemž je třeba mít na paměti, že aktivity lipas získané při hydrolytických reakcích nemusejí odpovídat aktivitám při reakcích syntetických (tj. v nevodném prostředí) [44,76]. Vždy je proto výhodnější stanovovat aktivitu imobilizovaných lipas alespoň dvěma nezávislými způsoby.

Vhodnost imobilizačního protokolu se dokládá stanovením účinnosti imobilizace (*protein loading, coupling yield*), tedy poměru množství proteinů obsažených v imobilizátu k množství proteinů, které byly použity k imobilizaci [28,77]. Alternativně může být použita pro výpočet účinnosti i aktivita enzymu, veličina je pak označována jako výtěžek aktivity (*activity yield*) [78].

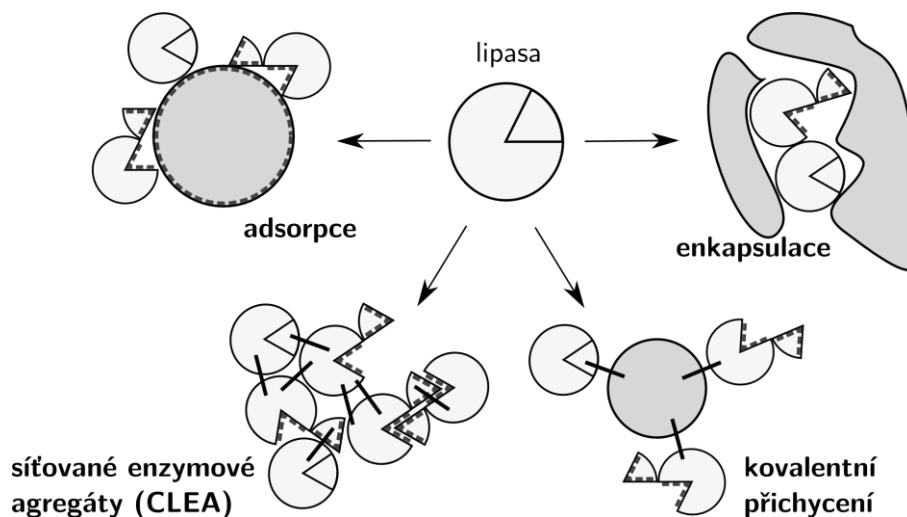
Dále se při charakterizaci stanovuje pH optimum a pH stabilita [69,78,79], teplotní optimum a teplotní stabilita [69,78–81], stabilita v rozpouštědlech [82], skladovací (dlouhodobá) stabilita [69,79] a také procesní stabilita (*reusability*), která udává průběh aktivity enzymu v závislosti na počtu po sobě opakovaných reakcí [44,69,72,82].

### 1.2.1 Techniky imobilizace enzymů

Existují dva hlavní přístupy k imobilizaci enzymů, které vycházejí z vlastností daného enzymu a také z účelu, pro který je enzym imobilizován. Jedná se o metody chemické a fyzikální [28,65].

Chemické metody jsou charakteristické tím, že při imobilizaci vzniká kovalentní, často ireverzibilní, vazba mezi enzymem a nosičem (nebo látkou jiné povahy) prostřednictvím spojky (*linker*) [65]. Základní metody jsou chemické síťování do formy agregátů a dále kovalentní přichycení na nosič (spodní část obrázku 7 na str. 19).

**Sítované enzymové agregáty** (CLEA, *cross-linked enzyme aggregates*) vznikají kovalentním spojením více molekul enzymu dohromady prostřednictvím bifunkční spojky, kterou je nejčastěji glutaraldehyd [65]. Výsledná vazba může být ještě chemicky upravena, aby byla nevratná, např. iminiové spojení vzniklé použitím glutaraldehydu se redukuje tetrahydridoboritanem na sekundární amin.



Obr. 7: Základní způsoby imobilizace lipas a dalších enzymů.

Nevýhodou sít sítovaných enzymových agregátů je malá velikost vzniklých částic, separace katalyzátoru od reakční směsi nebo opakované použití mohou být obtížné [83].

**Kovalentní přichycení** (*covalent attachment*) spočívá v reakci reaktivního aminokyselinového zbytku v řetězci enzymu (volná aminoskupina, thiol apod.) s vhodnou skupinou (epoxid, aldehyd, sukcinimid), která je kovalentně vázaná k nosiči [28,83]. Příkladem může být imobilizace na bromkyanem aktivované deriváty agarosy [84].

Nespornou výhodou imobilizace enzymů pomocí kovalentního přichycení je zamezení poklesu aktivity biokatalyzátoru v důsledku postupné desorpce enzymu z nosiče [28]. Při návrhu imobilizačního procesu je třeba mít alespoň základní informaci o struktuře daného proteinu (především o poloze derivatizovatelných aminokyselin), aby se zabránilo imobilizaci prostřednictvím úseku enzymu, který je potřebný pro katalytickou funkci.

Enzymy nebývají během fyzikálních metod imobilizace chemicky (kovalentně) modifikovány, a tudíž zůstávají velice podobné svým neimobilizovaným formám – toto představuje hlavní výhodu oproti chemickým metodám. Mezi základní dvě metody

fyzikální imobilizace se řadí adsorpce a enkapsulace (schematicky vyobrazeny na obrázku 7 na str. 19).

**Adsorpce** spočívá ve tvorbě nevazebných interakcí (solné můstky, van der Waalovy interakce) mezi molekulou enzymu a nosičem, v případě lipas se s výhodou využívá hydrofobního efektu [74]. Nosiče mívají často podobu porézních kuliček z organických polymerů, např. z polypropylenu, polymethakrylátu, nebo amorfních prášků (chitosan, křemelina, deriváty agarosy apod.) [65,70,75,77,85], ale jsou popsány i imobilizace na polymery převážně anorganické (např. oktyl-silikagel) [44,86].

Výhodou adsorpční metodiky je jednoduchost provedení [74]; imobilizace většinou spočívá ve smíchání roztoku enzymu s vhodným nosičem a jejich několikahodinové inkubaci [87], po které následuje promytí a sušení vzniklého biokatalyzátoru. Velkou nevýhodou adsorbovaných enzymů je riziko jejich desorpce z povrchu nosiče, která je zřejmě zodpovědná za nižší procesní stabilitu takovýchto enzymů [70]. K desorpci enzymu však dochází v organickém prostředí v mnohem menší míře, než je tomu v případě styku s vodnou fází, kde hrají navíc roli iontová síla a pH [44,87]. Nevýhodou adsorpční imobilizace je i omezená kapacita povrchu nosiče, takže při aplikaci příliš velkého množství enzymu dochází k vícevrstvé adsorpci, tedy vzniku méně aktivních enzymových shluků [44].

Imobilizace, při níž je enzym fyzikálně uzavřen v nosiči, tj. nikoliv imobilizován pouze adsorpcí na jeho povrchu, se nazývá **enkapsulace** (*encapsulation, entrapment*) nebo také klecová imobilizace. Enkapsulované enzymy jsou zadržovány díky své vysoké molekulové hmotnosti uvnitř polymerního nosiče prostřednictvím klecového efektu, při kterém malé molekuly rozpouštědla, reaktantů, produktů mohou volně difundovat ve struktuře nosiče, avšak větší proteinová molekula enzymu už ne [67,88,89]. Kromě čistě mechanické zábrany se rovněž snižuje rychlost podélné difuze a celková konformační pohyblivost enzymu v důsledku tvaru a uspořádání mikroutin a mikrokanálek uvnitř nosiče [67,90]. V neposlední řadě hrají důležitou roli při zadržování enzymu uvnitř nosiče také nekovalentní interakce, příp. hydrofobní efekt.

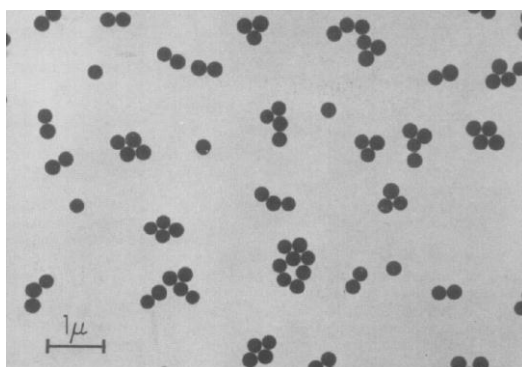
Zadržení enzymu je také možným důvodem, proč mají enkapsulované lipasy vyšší procesní stabilitu než jejich adsorbované nebo síťované formy [70].

Nevýhodou klecové imobilizace enzymů do polymerních nosičů je často nemožnost uvolnit enzym zpět např. za účelem regenerace nosiče [88,91]; při snaze porušit polymerní síť v důsledku použití destruktivních činidel dochází k poškození molekul enzymu a tedy k nenávratné ztrátě jeho aktivity [91]. Tato nevýhoda se však stává

výhodou, pokud je cílem připravit imobilizovaný enzym bez přílišného poklesu aktivity z důvodu difuze enzymu z nosiče (tzv. *leaching*).

### 1.2.2 Imobilizace s využitím sol-gelového procesu

Oxidy křemíku a hliníku – silikagel (hydratovaná forma  $\text{SiO}_2$ ) a alumina  $\text{Al}_2\text{O}_3$  – a jejich deriváty jsou v průmyslu běžně užívanými surovinami pro výrobu skel a keramiky a v chemickém výzkumu a vývoji mají stále nezastupitelnou úlohu, např. jako stacionární fáze při chromatografii. Postup výroby materiálů na bázi oxidu křemičitého s definovanými vlastnostmi určených pro speciální aplikace se liší od běžné průmyslové výroby, kde jsou jako zdroje využívány vodní sklo nebo tetrachlorsilan, a to především v tom, že se používají *organokřemičité* monomery jako tetramethoxysilan apod. [92,93] Polymerace těchto polyvalentních monomerů probíhá tzv. sol-gelovým procesem. Praktickým příkladem je úspěšně zavedený Stöberův proces pro výrobu monodisperzních sférických částic silikagelu v silně bazickém prostředí amoniaku (obr. 8) [94,95].



Obr. 8: Monodisperzní částice silikagelu získané Stöberovým procesem [94].

#### 1.2.2.1 Sol-gelový proces

V průběhu sol-gelového procesu vzniká směs koloidních částic dispergovaných v rozpouštědle (**sol**), které jsou navíc mezi sebou ještě kovalentně síťovány (**gel**) [96]. Jako výchozí látky se používají alkokoxyd kovů či polokovů nebo jejich reaktivní soli [93,96]. Dále se v procesu vždy uplatňuje voda a případně další rozpouštědlo; při použití alkoholů jako rozpouštědla může docházet kromě hydrolyzy rovněž k alkoholýze, resp. k alkokoxydové výměně na křemíku. Pro katalýzu sol-gelového procesu se nejčastěji využívají acidobazické sloučeniny, např. kyselina chlorovodíková, sírová nebo amoniak [97].

Sol-gelový proces je závislý na počátečních podmínkách polymerace – jmenovitě se nejvíce projevují povaha silanového monomeru, jeho molární poměr k vodě a k rozpouštědlu a také použitý katalyzátor, pH polymerační směsi nebo teplota [93,95,98–101]. Vhodnou variací těchto prvotních faktorů a rovněž výběrem následného zpracování sol-gelu lze získat materiály se značně rozdílnou velikostí částic, hustotou, porozitou a plochou povrchu [92]. Obecně platí, že sol-gel vzniká rychleji se zvyšující se koncentrací protonů či hydroxidových iontů [97] a při dostatečném poměru vody k silanům [102].

Běžný výrobní proces sol-gelu je možné rozdělit na sedm základních fází [96], přičemž poslední dvě se při práci s organickými látkami, včetně biomolekul, z důvodu užití vysokých teplot neuplatňují:

- 1) *smíchání reaktantů* – hydrolýza a kondenzace monomerů,
- 2) *odlévání* – lití polymerační směsi do kýžené formy (příprava monolitů),
- 3) *gelace* – síťování koloidních částic prostřednictvím kondenzací,
- 4) *zrání gelu* – ustálení polymerní sítě,
- 5) *sušení* – odstranění vody a rozpouštědla,
- 6) *dehydratace/stabilizace* – odstranění silanolových skupin,
- 7) *denzifikace* – přeměna na skla.

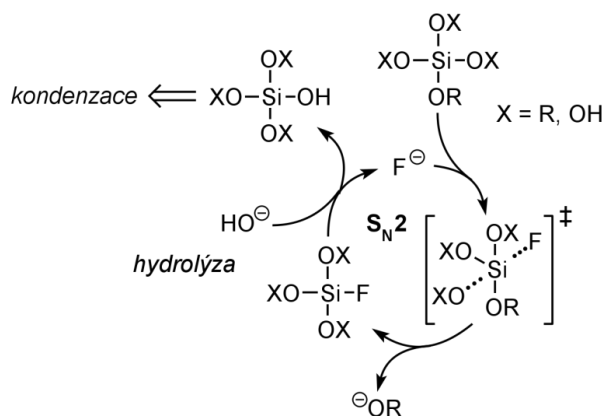
Polymerace je při sol-gelovém procesu spojením dvou chemických dějů – hydrolýzy monomerů na reaktivní částice a jejich následné polykondenzace [93]. Oba děje probíhají současně, resp. polykondenzace začíná ihned po vzniku prvních hydrolyzovaných částic, a nelze je tedy při studiu úplně oddělit. Studium kinetiky a mechanismů polymerace navíc ztěžuje velký počet jednotlivých monomerních či oligomerních částic, které mohou vzniknout paralelně různým stupněm hydrolýzy a kondenzace [99].

V úvahu připadají dva extrémní případy [92]:

- a) Pokud převáží hydrolýza silanových monomerů na deriváty kyseliny křemičité, např. díky nadbytku vody, vznikají ve velké míře křemičité oligomery, jež jsou kyselejší a snadno tedy napadají další monomery za tvorby velkého, velmi zesíťovaného polymeru (Ostwaldovo zrání [101]). Výsledný gel je kvůli fázové separaci průsvitný, po vysušení nedochází k jeho přílišné deformaci a má tedy i velmi nízkou hustotu.
- b) Převažuje-li polykondenzace jednotlivých monomerů na oligomerní částice – to je typické pro nízký obsah vody v systému –, vzniká velké množství kratších a převážně lineárních polymerů, neboť velké molekuly kondenzují pomaleji než volné monomery. Gel připravený za těchto podmínek bude průhledný, jelikož

neproběhne fázová separace, a při jeho sušení může dojít z důvodu nižšího stupně síťování ke kolapsu mikropórů spojenému se vzrůstem hustoty.

Hydrolyzá křemičitých alkoxidů může být úplná, tj. kondenzuje teprve kyselina křemičitá, nebo neúplná, kdy kondenzují také částečně hydrolyzované alkoxidy, jež však i nadále mohou podléhat hydrolyze [98]. Úplná hydrolyzá převažuje při kyselé katalýze a dostatečném množství vody, naopak bazická katalýza či menší množství vody umožňují hydrolyzá neúplnou. Přítomnost nehydrolyzovaných alkoxidových skupin pak ovlivňuje vlastnosti připraveného sol-gelu.



Obr. 9: Mechanismus navržený pro bazickou hydrolyzá křemičitých alkoxidů katalyzovanou fluoridem (podle [97]).

Polykondenzace je obvykle pomalejší než hydrolyzá a tudíž rychlost určujícím krokem gelace [98]. Bylo zjištěno, že gelační časy pro tetraethoxysilan jsou nejkratší při použití kyseliny fluorovodíkové či fluoridových iontů jako katalyzátoru [97,102,103]. Hydrolyzá fluoridy neprobíhá čistě acidobazickým mechanismem, nýbrž prostřednictvím nukleofilní substituce vedoucí přes reaktivní pentavalentní přechodný stav (obr. 9) nebo intermediát [97,103].

V případě, že je cílem sol-gelového procesu vyrobit stabilní matici oxidu křemičitého (různá skla a keramika), využívá se vysokoteplotní denzifikace příslušných sol-gelů (např. při 600 °C) [92,93,96]. Tato rozsáhlá oblast zpracování sol-gelů však, jak již bylo řečeno, nemá při imobilizaci enzymů význam.

Mezi metody užívané k popisu křemičitých sol-gelů a jim podobných heterogenních nosičů se řadí prvková analýza (hlavně stanovení obsahu uhlíku), malouhlový rentgenový rozptyl (SAXS, *small-angle X-ray scattering*), měření specifické plochy povrchu, termoanalytická měření jako termogravimetrie, diferenciální termická analýza či diferenciální skenovací kalorimetrie, a v neposlední řadě také nukleární magnetická

rezonance (zvláště  $^{29}\text{Si}$ ), infračervená spektroskopie či elektronová mikroskopie [73,92,96,99,104,105].

#### 1.2.2.2 Imobilizace lipas a dalších enzymů

Sol-gelový proces je, jak již bylo naznačeno, možné provádět za velice mírných podmínek (široká škála pH, vhodné i pro nižší teploty), proto netrvalo dlouho a od aplikací anorganických se výzkum obrátil na spojení nejprve s organickou chemií [100,101,106,107] a později i s biochemií [67,89,108,109] – tedy na imobilizaci proteinů, protilátek, dokonce i celých buněk do sol-gelových materiálů. Materiály na bázi oxidu křemičitého jsou fotochemicky stálé, nejsou snadno hydrolyzovatelné, vydrží široké rozmezí teplot, mají vysokou adsorpční schopnost a především jsou plně modifikovatelné, a to co se týče vlastní vnitřní struktury (porozita, plocha povrchu apod.), tak co se týče modifikací povrchových skupin. Tímto lze vytvořit nosič pro libovolné použití, „na míru“ dané imobilizované látky [72,110,111]. Celá řada imobilizovaných katalyzátorů již našla uplatnění v průmyslu [112].

Enkapsulace enzymu do křemičitého sol-gelu byla poprvé popsána v roce 1990 na příkladu alkalické fosfatasy a její imobilizace pomocí tetramethoxysilanu [91]. Bylo zjištěno, že fosfatasa takto připravená zůstává stabilní v řádech měsíců oproti její formě rozpuštěné v roztoku a vykazuje také lepší stabilitu při zvýšené teplotě. Dále byly podobným způsobem připraveny imobilizovaný trypsin, katalasa, ureasa, glukosaoxidas nebo křenová peroxidasa [67,90]; dva poslední enzymy byly společně použity jako enzymový senzor pro stanovení glukosy [88,90]. Gely připravené pouze z tetramethoxysilanu nebo s téměř zanedbatelným přídavkem polydimethylsiloxanu (0,5%) mají po vysušení podobu monolitických xerogelů – jsou kompaktní, průhledné (tedy vhodné pro optické aplikace) a vysoce mechanicky odolné.

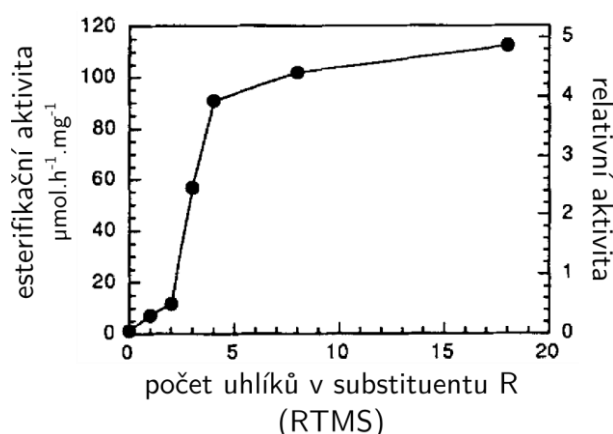
Jedna z často užívaných modifikací obecné metody sol-gelové imobilizace je dvoustupňová polymerace, tj. prvotní hydrolýza reaktivnějších prekurzorů (tetramethoxysilan apod.) za nižšího pH a následné přidání enzymu (spojené s úpravou pH na vyšší hodnoty) do již připraveného solu [89,101,113–115] – enzym je takto inkorporován do struktury až ve fázi kondenzace/gelace materiálu a snižuje se riziko jeho denaturace.

Dalším krokem ve vývoji sol-gelové imobilizace enzymů a jiných organických sloučenin je využití organoalkoxysilanů jako monomerů – vznikající polymery pak bývají nazývány **ormosily** (*organically modified silicas*) či *ormocery* (*organically modified ceramics*) [101]. Monomery s přímou vazbou křemík-uhlík přináší po zabudování do struktury sol-gelu celou řadu nových vlastností (snížení i zvýšení



polarity, redukce počtu volných silanolů, modifikace iontoměničových a adsorpčních vlastností apod.) a mohou být samy zdrojem reaktivních skupin při případné kovalentní imobilizaci biomolekul [107].

Lipasy byly poprvé enkapsulovány dvoustupňovým sol-gelovým procesem v roce 1994 [116] s využitím tetramethoxysilanu jako jediného monomeru. Enzymy z *Burkholderia cepacia* a *Candida cylindracea* na nosiči ve formě hydrogelu vykazovaly vyšší esterifikační aktivitu při syntéze isoamylbutyrátu než jejich (xero)gely po sušení na vzduchu či po lyofilizaci.



Obr. 10: Závislost esterifikační aktivity lipasy z *Burkholderia cepacia* na délce substituentu v alkytrimethoxysilanu (RTMS) použitím při imobilizaci (z [66], upraveno).<sup>a</sup>

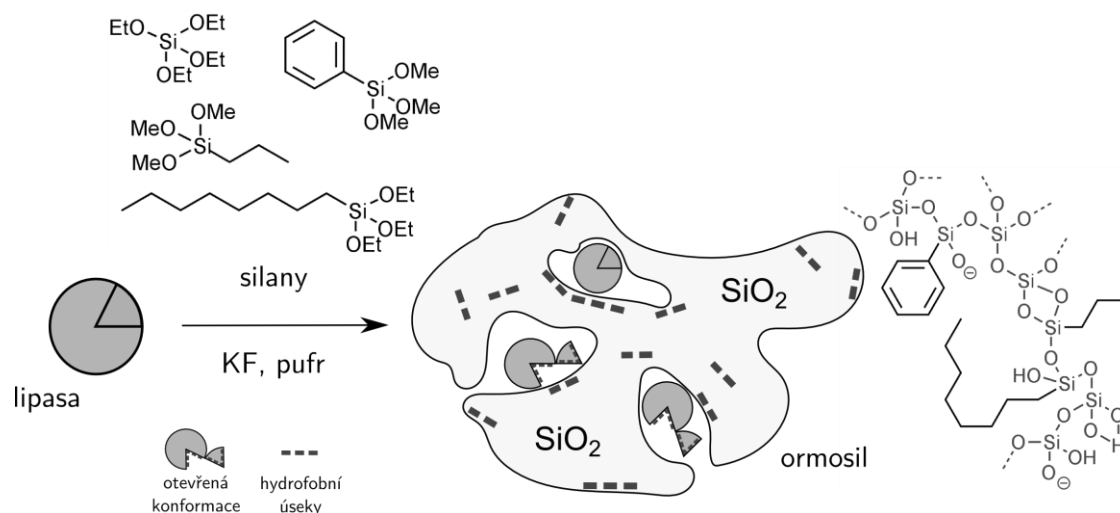
<sup>a</sup> Esterifikace oktanolu s kyselinou laurovou. Poměr TMOS/RTMS při imobilizaci 1:1.

Hydrolyza tetramethoxysilanu může být silně exotermní [98], proto je výhodnější provádět jedнокrokovou sol-gelovou imobilizaci za nižších teplot [117,118]. Naopak hydrolyza stericky náročných silanů, např. s fenylovým substituentem, bez přítomnosti pomocného organického rozpouštědla téměř neprobíhá [99], pro tento účel se při polymeracích řečených monomerů využívá přidavku 2-propanolu, acetonu apod., jež usnadňují tvorbu emulzního systému. Při imobilizaci dochází ke styku enzymu s organickými složkami mísitelnými i nemísitelnými s vodou, tj. k situaci, jež může přispět k denaturaci volného enzymu a tedy nutnému snížení aktivity enzymu [67,91]; to je další z důvodů, proč je vhodnější provádět imobilizaci či alespoň její počáteční fázi za snížené teploty. Polymerace bývají katalyzované fluoridovými ionty, jež mohou mít také negativní vliv na aktivitu enzymu [3,67].

První práce popisující imobilizaci lipasy do ormosilu byly publikovány v polovině 90. let [66,119]. Ilustrativní schéma tohoto způsobu imobilizace je uvedeno na obrázku 11 na str. 26, na obr. 12 na str. 27 je pak uvedena fotografie jednoho z ormosilů pořízená pomocí elektronového mikroskopu. Při imobilizaci lipasy z *Burkholderia cepacia* byly

použity různě dlouhé alkyltrimethoxysilany a oligomerní dimethylsiloxany kopolymerující s tetramethoxysilanem [66]; imobilizace provedená pouze s tetramethoxysilanem měla za následek značné snížení aktivity enzymu. Naopak bylo pozorováno mnohonásobné zvýšení esterifikační aktivity s rostoucí délkou alkylového řetězce silanu (obr. 10 na str. 25) [66,118]; toto pozorování je převážně vysvětlováno aktivací lipasy pomocí hydrofobního efektu [72,104], tedy mechanismem pro lipasy velmi typickým. Imobilizace do hydrofobního ormosilu může enzym v otevřené konformaci „uzamknout“, jelikož se předpokládá, že gelace probíhá v těsné blízkosti molekuly enzymu, kdy se uplatňují polární interakce mezi silanoly (SiOH) a polárními skupinami polypeptidu a zároveň nepolární interakce hydrofobních úseků [73,120,121].

Proces imobilizace lipas (jsou nazývané sol-gelovými lipasami 1. generace) patentovaný skupinou M. T. Reetze se později dočkal také komerčního využití [112,122].



Obr. 11: Schematické znázornění imobilizace lipasy do ormosilu.<sup>a</sup>

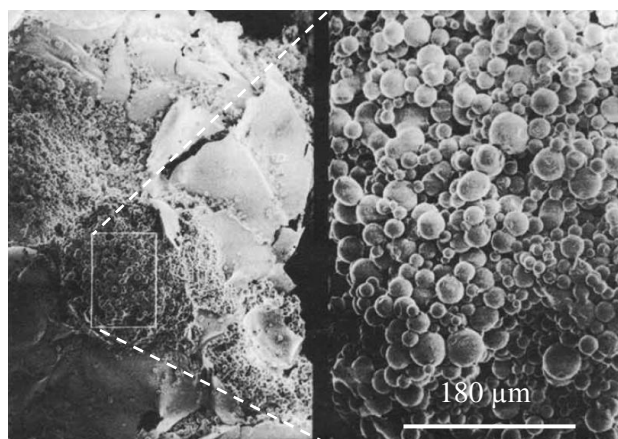
<sup>a</sup> Vpravo je naznačena struktura sol-gelu vzniklého při použití silanů s propylovou, oktylovou a fenylovou substitucí, tedy monomerů studovaných v rámci této práce.

Lipasa z *Candida cylindracea* byla např. imobilizována dvoukrokově pomocí směsi methyltrimethoxysilanu a tetramethoxysilanu [119] anebo polymerací sol-gelu na povrchu částic křemeliny či silikagelu [81,123]. U získaných enzymů byla zjištěna vyšší teplotní stabilita než u lipasy imobilizované na stejné gely pouze adsorpcí a rovněž se projevil nárůst esterifikační aktivity se zvyšujícím se poměrem alkyltrialkoxysilanu k tetraalkoxysilanu.

Byly rovněž popsány imobilizace lipas do sol-gelu na povrchu či uvnitř různých dalších nosičů, např. porézních skleněných kuliček [124], polyvinylformalové pryskyřice [125], křemeliny *Celite* [72,115,126] nebo pylového sporopoleninu [69].

Obecně se takto dosahuje vzniku tenčí vrstvy ormosilu, což znamená snížení difuzních limitací katalyzovaných reakcí [115,126]. Výsledné biokatalyzátory vykazují díky přidané rigidnější složce i vyšší mechanickou odolnost a jsou vhodné pro použití v průtokových reaktorech. V případě magnetických komponent (např. ferit) mohou tyto usnadnit separaci enzymu od reakční směsi [110,127]. Jako zajímavé řešení se také jeví potažení práškové lipasy pomocí vrstvy ormosilového materiálu v nadkritickém CO<sub>2</sub> [114] nebo využití ternárních směsí silanů při imobilizaci [126].

Ke stabilizaci enzymu v sol-gelu se často využívají přísady hydrofilních polymerů typu polyethylenglykolu či polyvinylalkoholu [110,113,128,129] nebo „pufrujících“ proteinů jako např. hovězí sérový albumin [117]. Byl také zjištěn pozitivní vliv přísady crownetheru 18-crown-6, iontových kapalin (např. [C<sub>16</sub>mim][BF<sub>4</sub>] a [Omim][Tf<sub>2</sub>N]), kalixarenů (např. Calix[6]-NH<sub>2</sub>) či chloridu draselného na aktivitu celé řady lipas [72,113,130–133]. Naopak při přísady monosacharidů nebo β-cykloextrinu se neprojevil žádný významný vliv na aktivitu [105,113].



Obr. 12: Mikrostruktura ormosilu<sup>a</sup> pod skenovacím elektronovým mikroskopem (z [117], upraveno).

<sup>a</sup> Připravený polymerací methyltrimethoxysilanu s polydimethylsiloxanem 6:1.

Během imobilizace enzymů do sol-gelu hraje poměrně důležitou roli i způsob jeho zpracování po polymeraci. Nejméně náročným, ale z hlediska aktivity enzymu nejméně výhodným, způsobem je prosté sušení připraveného sol-gelu na vzduchu (např. při zvýšené teplotě) [111,128]. Při odstraňování vodné fáze z hydrogelu za zvýšené teploty a sníženého tlaku dochází postupně v důsledku nárůstu povrchového napětí ke zborcení struktury pórů (*shrinkage*) a vzniku xerogelu [101], který se svou pevností a vysokou hustotou blíží sklu, což limituje využití pro katalýzu. Nejlepších výsledků je dosaženo při použití nadkritické tekutiny (např. CO<sub>2</sub>) [73,128], jež zajistí zachování

mikrostruktury a dá vzniknout aerogelu vynikajícímu vysokou plochou povrchu a nízkou hustotou bez významné ztráty porozity. Šetrnější možností jsou také lyofilizace či substituce vodné fáze v gelu méně polárním rozpouštědlem (aceton, 2-propanol, ...) a následně rozpouštědlem nepolárním s nižším povrchovým napětím (alkan, ...) [111] – tímto způsobem lze získat materiály na pomezí xerogelů a aerogelů zvané ambigely [121].

Jako nevýhodu použití ormosilů při immobilizaci enzymů je možné zmínit značnou křehkost připravených materiálů (závisí na průběhu polymerace a následném zpracování) [67,106,134], avšak tato je problémem i v případě organických porézních polymerů ve formě kuliček, jež jsou používány při adsorpční immobilizaci [68]. Z hlediska prováděných enzymových reakcí je také nevýhodnou, že část enzymových molekul je enkapsulována hluboko ve struktuře nosiče [67], některé mohou být zcela zablokovány, a tedy se prakticky při reakcích neuplatňují. Dále je možná přítomnost celé řady různých konformačních stavů jednoho enzymu a tedy různě aktivních molekul. Opačným problémem může také být, že se k enkapsulovanému enzymu nedostanou větší substráty, např. celé proteiny k immobilizované protease.

### 1.3 Acyklické analogy nukleosidů

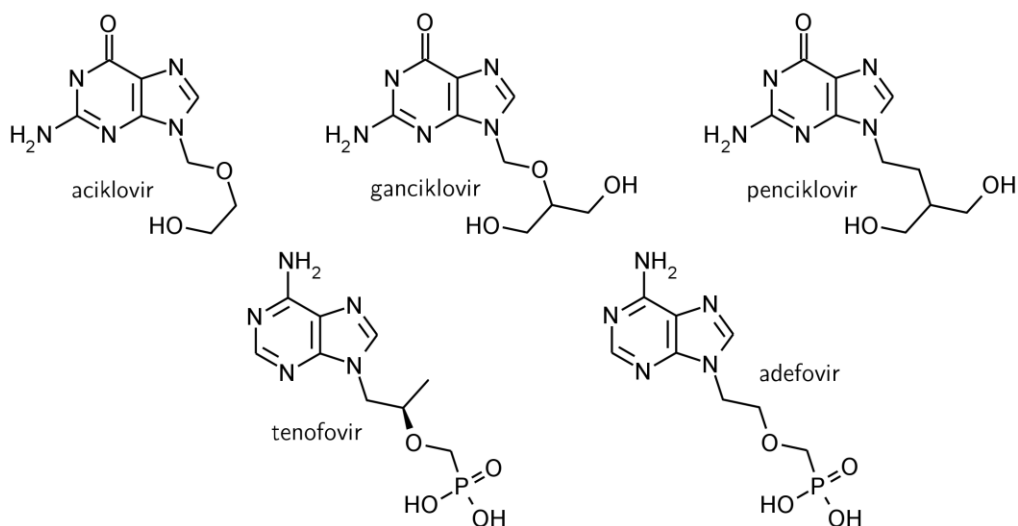
Mezi nejznámější aplikaci analogů nukleosidů, tedy látek strukturně odvozených od pro organizmy přirozených nukleosidů (adenosin, thymidin, uridin apod.), je bezesporu využití dideoxynukleosidtrifosfátů při Sangerově metodě sekvenování DNA [135]; zde působí jako tzv. *chain terminators* způsobující terminaci replikace.

Výzkum analogů složek nukleových kyselin s cílem najít nové léčivé látky byl odstartován zjištěním, že některé z nukleosidových analogů se chovají jako substráty či inhibitory enzymů, které přeměňují jejich přirozené varianty [136], nebo dalších enzymů důležitých pro metabolismus (zvláště pak těch, jež jsou virového původu) [137,138]. Hlavními mechanismy, kterými se analogy nukleosidů uplatňují, jsou inhibice specifických enzymů, např. inosin-5'-monofosfátdehydrogenasy, (S)-adenosyl-L-homocysteinhydrolasy nebo virových DNA polymeras a reverzních transkriptas [139].

Později byly připraveny látky mající vedle báze nukleových kyselin acyklickou část, jež se svou strukturou více či méně podobá skeletu deoxyribosy. Dnes se tato skupina látek nazývá **acyklické analogy nukleosidů** (*acyclic nucleoside analogues*, dále jen „acyklické analogy“) nebo také acyklonukleosidy [138]. Velkou oblastí praktického využití acyklických analogů je nyní právě terapie virových onemocnění [140].

### 1.3.1 Acyklické analogy s terapeutickým využitím

Jedním z prvních, a zřejmě neúspěšnějším, z řady acyklických analogů nukleosidů je acykloguanosin (aciklovir, KN např. *Cyclovir*<sup>®</sup>, *Zovirax*<sup>®</sup>, struktura na obr. 13), jehož antivirální aktivita při herpesvirové infekci byla popsána v roce 1978 [141]. Sloučenina je po transportu do buňky nejprve selektivně metabolizována prostřednictvím virové thymidinkinasy (ATP-thymidin 5'-fosfotransferasy) a posléze pomocí buněčných kinas až na aktivní aciklovir-trifosfát; tento produkt působí jako substrát a zároveň jako silný inhibitor virové DNA polymerasy, čímž způsobuje nevratnou terminaci replikace virové DNA a zamezení rozšiřování infekce [136]. Kromě toho působí aciklovir i proti cytomegalovirové infekci a viru *Varicella zoster* způsobujícímu plané neštovice a pásové opary [141].



Obr. 13: Acyklické analogy účinné v terapii virových onemocnění.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Látky v horní řadě jsou v této formě používány v léčivých přípravcích, u sloučenin ve spodní řadě se používají pouze jejich „prolékové“ formy.

Sloučenina 9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin **1** (DHPA, na obr. 16 na str. 34) byla poprvé popsána v roce 1972 [142]; tato látka je ve své acyklické části komplementární s acyklickou částí acikloviru, jejich pomyslným spojením lze získat cyklus ribosy. Později byla provedena syntéza celé řady příbuzných derivátů této látky včetně enantiomerně čistých variant [137,143,144], přičemž jako nejvíce biologicky aktivní se projevil (*S*)-DHPA (*R* enantiomer byl neaktivní). V případě této sloučeniny byla pozorována antivirální aktivita proti viru vakcinie a spalniček, herpesvirům a také proti viru vezikulární stomatitidy [145]. (*S*)-DHPA a další adenosinové deriváty působí především jako kompetitivní reverzibilní nebo ireverzibilní inhibitory (*S*)-adenosyl-L-homocysteinhydrolasy, která se podílí na methylačních reakcích a je

tedy důležitá i pro maturaci virové částice [137]. Látka (S)-DHPA byla dříve obsažena v léčivém přípravku *Duviragel*<sup>®</sup> (*Léčiva*) určeném k léčbě oparů [146]; v současné době se již v klinické praxi nepoužívá.

Dalším jednoduchým acyklonukleosidem, jenž byl úspěšně zaveden do klinické praxe [140], je např. ganciklovir (KN *Vitrasert*<sup>®</sup> či *Cytovene*<sup>®</sup>, obr. 13 na str. 29), který působí proti herpesvirům (včetně viru Eppsteina-Barrové) a cytomegalovirům [147]. Dále se pak používá penciklovir (KN *Denavir*<sup>®</sup>, obr. 13 na str. 29), jenž je aktivní rovněž proti herpesvirům a také proti viru planých neštovic [148,149].

V léčivých přípravcích je možné najít kromě volných forem zmíněných látek také jejich estery, tedy „prolékové“ formy (vizte dále, obr. 14 na str. 32) [140]. Valaciklovir (KN *Valtrex*<sup>®</sup>) a valganciklovir (KN *Valcyte*<sup>®</sup>) jsou estery příslušných acyklonukleosidů s aminokyselinou L-valinem. Penciklovir je pak možné nahradit jeho profarmakem famciklovirem (KN *Famvir*<sup>®</sup>), což je diacetát 6-deoxypencikloviru, jenž se v organismu enzymově deacyluje a oxiduje na penciklovir [140].

Dlouholetá spolupráce skupin A. Holého a E. De Clercq v oblasti výzkumu acyklických analogů s antivirálním účinkem vedla k objevu řady velmi aktivních sloučenin s velkým rozsahem terapeutické šíře, které nesou fosfonovou skupinu, tzv. acyklických nukleosidfosfonátů [150–152]. Tyto látky jsou *de facto* analogy nukleotidů (nukleosidfosfátů), na rozdíl od přirozených nukleosidfosfátů kromě acyklické části obsahují stabilnější nehydrolyzovatelnou vazbu uhlík-fosfor. Na prototypickou sloučeninu (S)-9-(2-fosfonylmethoxy-3-hydroxypropyl)adenin lze pohlížet jako na spojení dříve známých antivirotik se širokým spektrem účinku (S)-DHPA a kyseliny fosfonoctové nebo fosfonomravenčí [139,151]. Mechanismus působení nukleosidfosfonátů uvnitř buněk napadených virem je podobný alifatickým acyklickým analogům, chybí zde však krok první fosforylace katalyzovaný virovou kinasou [151].

Praktického využití v medicíně se z množství připravených derivátů dočkaly tři acyklické nukleosidfosfonáty: adefovir a tenofovir (obr. 13 na str. 29), resp. jejich „prolékové“ formy, a cidofovir (na obr. 46 na str. 94) [140]. Jejich zavedení a kombinace s dalšími antiviroty (např. ritonavir, efavirenz, ...) znamenalo přelom v léčbě nemoci AIDS způsobené virem HIV nebo hepatitidy typu B [153].

Cidofovir (KN *Vistide*<sup>®</sup>) působí hlavně proti cytomegalovirovým infekcím [140,151], ale je aktivní i vůči dalším herpesvirům, hepadnavirům, adenovirům či poxvirům [139]. V hostitelské buňce napadené virem je přeměněn

cytidinmonofosfátkinasou na cidofovir-fosfát a ten následně na cidofovir-difosfát, který je substrátem a zároveň účinným inhibitorem virové DNA polymerasy [139].

Adeninové deriváty adefovir a tenofovir působí podobným způsobem na virovou DNA polymerasu a navíc také na reverzní transkriptasu (RNA-dependentní DNA polymerasu) [139]; jediným rozdílem je, že díky absenci hydroxylové skupiny nemohou po své inkorporaci sloužit jako templát k dalšímu prodlužování řetězce DNA (jsou tedy *chain terminators*). Ze svých výchozích forem jsou v buňce obě látky přeměněny na příslušné difosfáty prostřednictvím adenosinmono-fosfátkinasy nebo 5-fosforibosyl-1-pyrofosfátsynthetasy.

Adefovir-dipivoxil (KN *Hepsera*<sup>®</sup>, na obr. 14 na str. 32) je „proléková“ forma adefoviru – formální diester s pivaloyloxymethanolem. Vykazuje vysokou aktivitu proti herpesvirům a hepadnavirům (virus hepatitidy typu B) a oproti předchozím případům také proti retrovirům (HIV a některé zvířecí retroviry) [151].

„Prolékovou“ formou tenofoviru je v léčivech tenofovir-disoproxil (KN *Viread*<sup>®</sup>, formální diester s isopropyloxykarbonyloxymethanolem, struktura je na obr. 14 na str. 32), resp. jeho sůl s kyselinou fumarovou. Ta je mimo jiné používána ve třech kombinovaných léčivých přípravcích určených k léčbě AIDS [140]: v kombinaci s efavirenzem a emtricitabinem (KN *Atripla*<sup>®</sup>), s elvitegravirem, kobicistat a emtricitabinem (KN *Stribild*<sup>®</sup>) a s emtricitabinem (KN *Truvada*<sup>®</sup>). Tenofovir působí především proti retrovirům (HIV) a hepadnavirům [139].

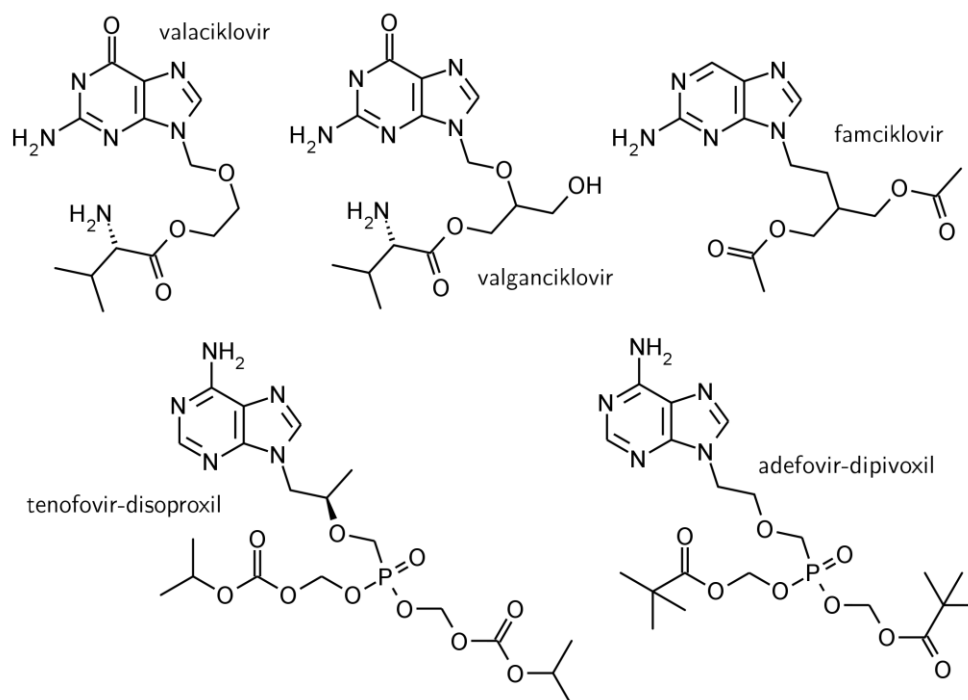
Vývoj acyklických analogů nukleosidů neutichá, hledají se stále nové deriváty s fyziologickými účinky [154] a také jsou studovány nové „prolékové“ formy již popsaných látek [155–157]. Jako velmi slibný kandidát s antivirálními účinky se prozatím ukazuje sloučenina 6-fosfonylmethoxyethoxy-2,4-diaminopyrimidin (PMEO-DAPym) odvozená od adefoviru [158].

### 1.3.2 Prolékové formy terapeutických látek

Terapeuticky aktivní sloučeniny bývají často cíleně chemicky upravovány za vzniku „prolékových“ forem (také profarmak, angl. *prodrugs*), tedy neaktivních prekurzorů, které jsou teprve v cílové tkáni/buňce sledem několika (1–2) enzymových či spontánních kroků převedeny na aktivní sloučeninu [159–161]; např. velmi často používané soli účinných látek se k „prolékovým“ formám neřadí. Jedněmi z nejstarších známých „prolékových“ forem jsou kyselina acetylsalicylová (aspirin), která je zajímavá tím, že kromě funkce „prolékové“ formy (část se hydrolyzuje na aktivní

kyselinu salicylovou) je sama také aktivní látkou působící na cyklooxygenasu, isoniazid nebo heroin (diacetylmorfin) [161].

Hlavním důvodem pro hledání nových „prolékových“ forem je potenciální zlepšení fyzikálně-chemických vlastností (rozpuštnost, pH stabilita, ...) a farmakologických parametrů absorpce (zvláště biodostupnost, *bioavailability*), distribuce, metabolismu nebo eliminace (ADME) účinné látky v cílové tkáni a také snížení její případné toxicity pro necílové tkáně [139,153,161].



Obr. 14: „Prolékové“ formy acyklických analogů nukleosidů v klinické praxi.

Základní dvě skupiny „prolékových“ forem jsou „prolékové“ formy s pomocnou skupinou (*promoiety*), tedy látky mající navíc určitý, většinou hydrolyticky, odbouratelný řetězec a bioprekurzorové „prolékové“ formy, které jsou převedeny na cílovou látku nehydrolytickými reakcemi (např. oxidací, redukcí apod.) [159]. Příkladem „prolékové“ formy, jež nese pomocnou skupinu a je zároveň i bioprekurzorem, je již zmíněný famciclovir, který k převedení na penciclovir musí být enzymově hydrolyzován a oxidován.

Kromě běžnějších nízkomolekulárních „prolékových“ forem existují také makromolekulární profarmaka tvořená konjugáty účinné látky s polymery, např. s polyethylenglykolem, poly-L-glutamátem, peptidy či protilátkami [159,162]. Alternativními způsoby pro podpoření vstřebávání účinných látek kromě tvorby „prolékových“ forem mohou být např. enkapsulace do micelárních systémů nebo adsorpce na nanočástice [163,164].



Do podoby „prolékových“ forem bývají derivatizovány i látky, které vlastně samy o sobě fyziologicky aktivní nejsou (např. aciklovir, penciklovir), nýbrž aktivními se stávají až po metabolické přeměně, tj. samy jsou „prolékovými“ formami [161]. Tímto způsobem v organismu dochází k vícenásobné aktivaci látky: nejprve je zbavena po průchodu do cílové tkáně části, jež tento průchod usnadnila, a následně je přeměněna na aktivní sloučeninu.

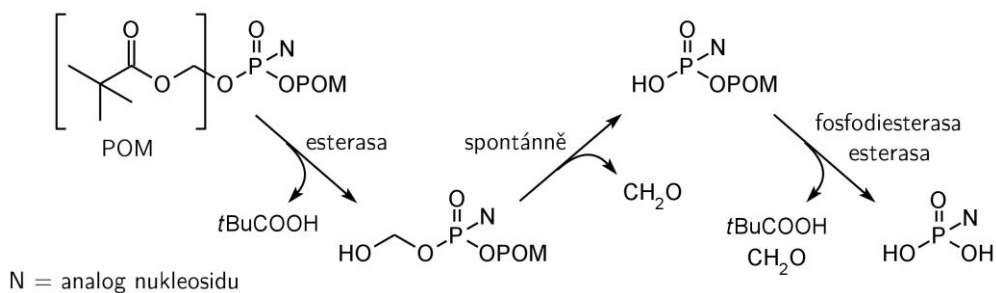
Za reaktivní skupiny, jež jsou ve sloučeninách vhodnými nositeli pomocných skupin, se považují nukleofilní skupiny  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-SH$  a elektrofilní  $-COOH$  a  $-PO(OH)_2$  [161]. Podle charakteru výchozí látky a cílového použití mohou být získané „prolékové“ formy polárnější/hydrofobnější, nabitě/nenabitě apod.

Mezi nejčastější modifikace patří převedení příslušné látky na estery [159,160]. Jedná o estery s alifatickými karboxylovými kyselinami (časté jsou acetáty, pivaláty) nebo alkoholy, které vedou obecně ke snížení ionizace a polaritě, či s aminokyselinami, jež pak působí amfifilně [159,161]. Aminokyselinové deriváty mají tu výhodu, že mohou být transportovány do buněk pomocí peptidových přenašečů, jako je tomu v případě valacikloviru [165]. Ke zvýšení polaritě látek se používá fosfátová skupina nebo tvorba glykosidů [160,161]. „Prolékové“ formy fosforečné či fosfonové skupiny mají často podobu jednodruhových a smíšených monoesterů či diesterů s alkylovými substituenty (např. steroidní skelet, aryl, crownether, saligenyl, ...) nebo glycerolipidů, dalším způsobem je také převedení dané skupiny na bis(pivaloyloxymethyl)ový, dithioethylový, bis(*S*-acylthioethyl)ový či fosforamidátový derivát [166,167].

K uvolnění „prolékových“ forem dochází, jak již bylo uvedeno, nejčastěji enzymovou katalýzou [159]. Při návrhu pomocných skupin či bioprekursorů je důležitá alespoň částečná znalost substrátové a tkáňové specificity enzymů [168] a také případných membránových přenašečů [159,160]. Například esterasy se v lidském organismu vyskytují v několika různých formách (paraoxonasa, karboxylesterasa, acetylcholinesterasa atd.). Dalšími enzymy uplatňujícími se při metabolismu „prolékových“ forem jsou alkalická fosfatasa, amidasy, glykosidasy či různé oxidoreduktasy (cytochrom P450) [161]. Pro „prolékovou“ formu valacikloviru byl dokonce popsán specifický protein hydrolyzující esterovou vazbu s L-valinem nazvaný valaciklovirasa; tento protein se strukturně podobá enzymu bifenylylhydrolase [168].

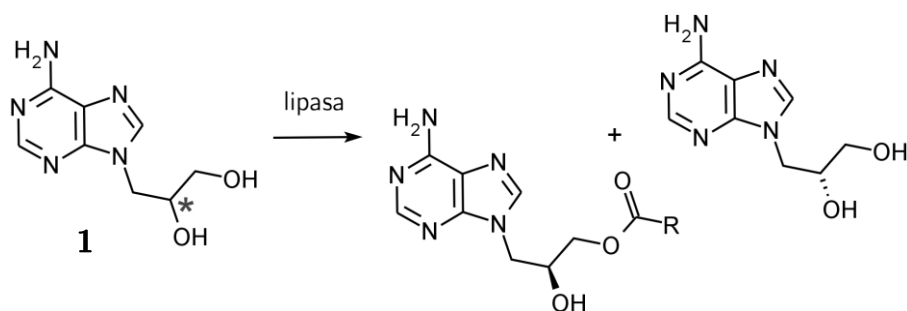
Nežádka dochází po převedení látky na „prolékovou“ formu ke snížení biologické aktivity nebo dokonce ke zvýšení toxicity [144,156,157], protože se u modifikované účinné látky mohou v organismu uplatňovat i jiné mechanismy. Např. alifatické

3'-estery DHPA při testech *in vitro* pozbyly antivirální aktivity původní látky a v případě 3'-palmitátu byla zjištěna buněčná toxicita [144].



Obr. 15: Mechanismus biologické aktivace profarmaka nukleosidfosfonátu/fosfátu (podle [166]).

Acyklické analogy nukleosidů úspěšně dokládají důležitost „prolékových“ forem, jelikož většina z nich je v léčivých přípravcích obsažena právě ve formě esterů (obr. 14 na str. 32), které jsou hydrolyzovány až po průchodu do cílového organismu [140]. Například bis(pivaloyloxymethylové) uspořádání ve zmíněném profarmaku adefovoviru je nejprve esterásou hydrolyzováno na hydroxymethylfosfonátovou skupinu, která posléze samovolně uvolní formaldehyd; hydrolyza druhé fosfoesterové vazby pak vede ke vzniku volné fosfonové funkce (obr. 15) [166].



Obr. 16: Schéma cílené enantioselektivní acylace DHPA **1** pomocí lipasy.

Jedním z cílů této práce je studium stereoselektivity acylace modelové látky katalyzované lipasou – tímto modelem je již zmíněný DHPA **1** (obr. 16). V předchozím textu bylo ilustrováno, že v případě chirálních biologicky aktivních sloučenin bývá aktivnější pouze jeden z enantiomerů. Pokud by se podařilo najít optimální postup pro biotransformaci DHPA **1** za vzniku enantiomerně čistých látek, tento by pak mohl být využitelný pro esterifikace dalších podobně polárních polyfunkčních substrátů.

Chirální centrum u této sloučeniny není přímo vedle primárního hydroxyly, nýbrž u hydroxyly sekundárního, proto by se enantiosektivita lipas měla projevit spíše až při vzniku sekundárního 2'-esteru, eventuálně při jeho hydrolýze.

## 2 Cíl práce

Mezi hlavní cíle předkládané diplomové práce patří:

1. Formou literárního přehledu stručně představit problematiku využití lipas v biotechnologiích a dále problematiku acyklických analogů nukleosidů.
2. Připravit lipasy ve formě heterogenních katalyzátorů pro použití v syntetických reakcích a tyto charakterizovat.
3. Provést syntetické reakce vedoucí k esterům acyklických analogů nukleosidů a nukleotidů. Charakterizovat produkty biotransformačních reakcí.

## 3 Materiál a metody

V následujících seznamech jsou uvedeny všechny chemické látky a chemické přípravky, jež byly během experimentů použity, včetně případných specifikací.

### 3.1 Chemikálie a roztoky

#### 3.1.1 Rozpouštědla

# *Fluka AG*, Švýcarsko

isooktan (čistý)

# *Lachema*, ČSSR

pentan (97 %)

# *Lachema*, ČR

hexan (p. a.)

# *Penta*, ČR

aceton (p. a.), butanol (p. a.), *tert*-butylmethylether (č., MTBE), diethylether (nestabilizovaný, p. a.), ethylacetát (p. a.), 2-propanol (p. a.), chloroform (stabil. 1% amylalkohol, p. a.), methanol (p. a.), methylethylketon (č.), petrolether (p. a., destilační rozmezí 40–65 °C), toluen (p. a.)

# pracoviště ÚOCHB AV ČR

cyklohexan (č.), ethanol (98%v), heptan (č.), tetrachlormethan

# pracoviště VÚV TGM

destilovaná voda, ultračistá voda (systém *Milli-Q*<sup>®</sup>)

# *Sigma-Aldrich*, USA

acetonitril pro HPLC (*CHROMASOLV*<sup>®</sup> pro gradientovou eluci, >99,9 %), benzen (bezvodý, 99,8 %), dichlormethan pro HPLC (*CHROMASOLV*<sup>®</sup>, stab. amylen, >99,8 %), dimethylformamid (bezvodý, 99,8 %), dimethylsulfoxid pro UV spektroskopii, 2-methoxyethanol (bezvodý, 99,8 %)

# *TCI Europe*, Belgie

dimethylsulfoxid-*d*<sub>6</sub> (>99,9 % D), 1,4-dioxan (stab. BHT, >99 %), chloroform-*d* (stabilizovaný Ag, >99,6 % D)

### 3.1.2 Čisté látky

# *Lachema*, ČSSR

kyselina boritá (č.), kyselina citronová (monohydrát, p. a.), kyselina octová (p. a.),

# *Lach-Ner*, ČR

acetanhydrid (p. a.), chlorid hořečnatý (hexahydrát, p. a.), kyselina chlorovodíková (35%w, p. a.)

# *Penta*, ČR

dihydrogenfosforečnan sodný (dihydrát, p. a.), hydroxid sodný (p. a.), chlorid vápenatý (bezvodý granulovaný, p. a.), síran sodný (bezvodý, p. a.)

# pracoviště ÚOCHB AV ČR

fluorid draselný

# *Sigma-Aldrich*, USA

bromfenolová modř, dodecylsíran sodný pro elektroforézu (99 %), feny(trimethoxy)silan (FTMS, 97 %), glycerol pro molekulární biologii (>99 %), hovězí sérový albumin (98 %), 4-nitrofenol pro spektrofotometrii, peroxodisíran amonný (>98 %), polyvinylalkohol (relativní molekulová hmotnost ~72000), tetraethoxysilan (TES, 99,999 %), tetramethylethylendiamin pro elektroforézu (99 %), triethoxy(oktyl)silan (TEOS, >97,5 %), trimethoxy(propyl)silan (TMPS, 97 %), Tris (*Trizma*<sup>®</sup> base)

# *Serva Electrophoresis*, SRN

modř *Coomassie Brilliant R-250*

# *TCI Europe*, Belgie

tetramethylsilan (pro NMR, >99 %)

### 3.1.3 Enzymové substráty

# *Fluka AG*, Švýcarsko

vinylacetát (stabil. HQ, >99 %)

# pracoviště ÚOCHB AV ČR

9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin (**1**, DHPA)

# *Sigma-Aldrich*, USA

2-fenylpropanol (**2**, hydratropylalkohol, >97 %), 4-methylumbelliferylbutyrát (vhodný pro fluorescenci, >95 %), 4-nitrofenylbutyrát (>98 %), 4-nitrofenylkaprinát, 4-nitrofenylkaprylát (>95 %), 4-nitrofenyllaurát (>98 %), 4-nitrofenylpalmitát (>98 %), vinylbenzoát (stabil. HQ/MEHQ, >99 %), vinylaurát (>99 %), vinylpropionát (stabil. MEHQ, 98 %)

# *TCI Europe*, Belgie

2-fenylpropanol (**2**, hydratropylalkohol, >98 %), vinylbutyrát (stabil. HQ, >98 %), vinylkaprinát (stabil. MEHQ, >99 %), vinylkapronát (stabil. MEHQ, >99 %), vinylkaprylát (stabil. MEHQ, >99 %), vinylmyristát (stabil. MEHQ, >99 %), vinylpalmitát (stabil. MEHQ, >96 %), vinylstearát (stabil. MEHQ, >95 %)

### 3.1.4 Ostatní

# *Bio-Rad Laboratories*, USA

40%w roztok akrylamidů (akrylamid/*N,N'*-metylenbisakrylamid 19:1)

# *DuPont*, USA

teflonová (PTFE) páska [(0,2×12×15000) mm a (0,2×19×15000) mm]

# *Fluka AG*, Švýcarsko

silikagel 60 pro kolonovou chromatografii (póry 60 Å, částice 40–63 µm)

# *Agilent Technologies*, USA

chirální analytická kolona pro kapilární GC *HP-Chiral 20B* [20% permethylovaný β-cyklohextrin na (35% fenyl)methylpolysiloxanu, tloušťka filmu 0,25 µm, (30000×0,25) mm]

# *Merck*, SRN

silikagel pro TLC s fluorescenčním indikátorem [hliníkové desky (20×20) cm, póry 60 Å, tloušťka vrstvy 0,2 mm]

# *Messer*, Rakousko

helium 5.0, dusík 4.6, dusík 5.0

# *Phenomenex*, USA

analytická kolona pro HPLC *Kinetex*<sup>®</sup> C18 [oktadecyly vázané na silikagelu (uhlík 12 %), částice 5 µm s pevným jádrem, póry 100 Å, plocha povrchu 200 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>, *endcapped*, (150×4,6) mm]

# *Serva Electrophoresis*, SRN

standard molekulových hmotností pro SDS-PAGE (*Protein Test Mixture 5*)

# *Sigma-Aldrich*, USA

čínidlo na stanovení proteinů *Bradford reagent* (roztok Coomassie Brilliant G-250 a H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>); křemelina pro filtraci *Celite*<sup>®</sup> 545; molekulová síta (aktivovaná při 200 °C, velikost pórů 4 Å)

## 3.2 Enzymy

# *Sigma-Aldrich*, USA

lipasa z *Pseudomonas fluorescens* (*Lipase AK "Amano"*, lyofilizovaná, deklarovaná aktivita >20000 U.g<sup>-1</sup> <sup>2</sup>)

## 3.3 Přístrojové vybavení

analytické váhy *AT261 Delta Range* (*Mettler Toledo*, USA)

automatický dávkovač vzorků na TLC *Linomat 5* (*CAMAG*, Švýcarsko)

automatický dávkovač vzorků pro GC *7683 Series* (*Agilent Technologies*, USA)

automatický sběrač frakcí *FCC61* (*Laboratorní přístroje Praha*, ČSSR)

stolní centrifuga *MICRO 240A* (*Denville Scientific*, USA)

dávkovací ventil pro HPLC *7725i* (*Rheodyne*, USA)

digitální valivá třepačka *Stuart Equipment SRT6D* (angl. *tube roller*, *Bibby Scientific*, VB)

elektrický zdroj pro elektroforézu (*Hoefer*, USA)

elektroforetická souprava *Mighty Small II* (*Hoefer*, USA)

generátor vodíku *40H* (*Dominick Hunter*, VB)

horizontální třepačka *KS 130 basic* (*IKA Laboratory Equipment*, SRN)

mini-inkubátor *Cultura* (*Merck*, SRN)

kývavá třepačka *BenchRocker 3D* (*Benchmark Scientific*, USA)

kvartérní pumpa pro HPLC *Delta 600* (*Waters*, USA)

laboratorní váhy *440-35N* (*Kern*, SRN)

lázně *T100* (*Medingen Labortechnik*, SRN) a *GD100* (*Grant Instruments*, VB)

lázeň k rotační vakuové odparce *WB* (*Heidolph Instruments*, SRN)

magnetické míchačka *MONO* (*Variomag*, USA)

---

<sup>2</sup> Hydrolýza olivového oleje při pH 8 a 55 °C.



magnetické míchačky s ohřevem *RH3* (*MLW*, Polsko) a *RH basic 2* (*IKA Laboratory Equipment*, SRN)

pH elektroda *SlimTrode* (*Hamilton*, USA)

pH metr *pH 213* (*Hanna Instruments*, USA)

plynový chromatograf *HP6850 Series* (*Hewlett-Packard*, USA)

průtokový UV detektor *HP1050 Series* (*Hewlett-Packard*, USA)

rotační vakuová odparka *Laborota 4002* (*Heidolph Instruments*, SRN)

řídící stanice pro HPLC *600 Controller* (*Waters*, USA)

souprava pro přípravu elektroforetických gelů *Multiple Gel Caster* (*Hoefler*, USA)

stolní UV komora *CM-10* (vlnové délky 254 a 365 nm; *Spectroline*, USA)

třepací inkubátory – třepačka *UNIMAX1010* s termostatem *INKUBATOR 1000* (*Heidolph Instruments*, SRN) a *NB-205* (*N-BIOTEK*, Jižní Korea)

UV komora *EDAS 290* (*Kodak*, USA)

UV trasluminátor *UVT-20 S/M/L* (vlnové délky 254, 312 a 365 nm; *Herolab*, SRN)

UV/VIS spektrofotometr *SPECORD 210* (*Analytik Jena*, SRN)

vortex *MS2 Minishaker* (*IKA Laboratory Equipment*, SRN)

vývěva *Rotavac senso* (*Heidolph Instruments*, SRN)

Všechny experimenty byly prováděny, pokud není uvedeno jinak, při laboratorní teplotě (cca 23 °C).

Není-li v textu uvedeno odlišně, je výraz „voda“ ekvivalentní výrazu „destilovaná voda“ a „roztok“ je ekvivalentní výrazu „vodný roztok“.

Rozpouštědla určená pro biotransformační reakce byla před použitím sušena bezvodým síranem sodným a poté destilována; acetonitril pro HPLC byl sušen bezvodým chloridem vápenatým a následně destilován. Vinylacetát byl uchován nad molekulovými síty. Při práci s reakčními směsmi obsahujícími těkavá organická rozpouštědla byly závitky lahvíček a dalších nádob utěšňovány teflonovou páskou.

#### Použité pufrы a roztoky:

<i>barvicí lázeň</i>	roztok methanolu (450 mL.L <sup>-1</sup> ), kyseliny octové (90 mL.L <sup>-1</sup> ) a modři <i>Coomassie Brilliant R-250</i> (2,5 g.L <sup>-1</sup> ),
<i>elektrodový pufr</i>	roztok 25mM Tris, 195mM glycinu a dodecylsíranu sodného (1 g.L <sup>-1</sup> ),
<i>fosfátový pufr</i>	roztok dihydrogenfosforečnanu sodného o příslušné koncentraci titrovaný na požadované pH 5M roztokem NaOH,
<i>odbarvovací lázeň</i>	roztok složený z 500 mL vody, 430 mL methanolu a 75 mL kyseliny octové
<i>polymerační směs pro 5% zaostřovací gel</i>	750 μL 40%w roztoku akrylamidů, 4,40 mL vody, 750 μL 1M Tris pufru o pH 6,8, 60 μL 10%w roztoku dodecylsíranu sodného, 60 μL 10%w roztoku peroxodisíranu amonného a 6 μL tetramethylethylendiaminu,
<i>polymerační směs pro 15% separační gel</i>	3,70 mL 40%w roztoku akrylamidů, 3,60 mL vody, 2,50 mL 1,5M Tris pufru o pH 8,8, 100 μL 10%w roztoku dodecylsíranu sodného, 100 μL 10%w roztoku peroxodisíranu amonného a 4 μL tetramethylethylendiaminu,
<i>redukující vzorkový pufr</i>	roztok 125mM Tris pufru (pH 6,8), 20%v glycerolu, dodecylsíranu sodného (40 g.L <sup>-1</sup> ), 2%v β-merkptoethanolu a bromfenolové modři (200 mg.L <sup>-1</sup> ),

<i>Tris pufr</i>	roztok Tris o příslušné koncentraci upravený na požadované pH 5M roztokem HCl,
<i>univerzální pufr</i>	ekvimolární roztok kyseliny citronové, dihydrogenfosforečnanu sodného a kyseliny borité o příslušné koncentraci titrovaný na požadované pH 5M roztokem NaOH nebo HCl,
<i>vzorkový pufr</i>	roztok 125mM Tris pufru (pH 6,8), 20%v glycerolu, dodecylsíranu sodného ( $40 \text{ g.L}^{-1}$ ) a bromfenolové modři ( $200 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

### 3.4 Charakterizace enzymů

#### 3.4.1 Charakterizace komerčního preparátu lipasy

##### 3.4.1.1 Elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS

Pomocí komerční soupravy byl připraven polyakrylamidový gel [cca (80×60) mm, tloušťka 0,75 mm] s deseti vzorkovými jamkami skládající se z 5% zaostřovacího gelu a 15% separačního gelu [169].

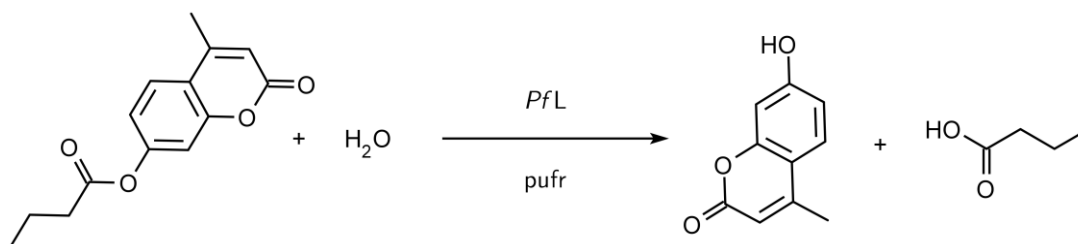
Lipasa *PfL* a hovězí sérový albumin byly rozpuštěny v 5mM fosfátovém pufru o pH 7,0. Roztoky pak byly vhodně ředěny stejným puftrem a v poměru 1:1 smíchány se vzorkovým puftrem/redukujícím vzorkovým puftrem. Do jamek gelu bylo aplikováno 15  $\mu\text{L}$  takto připravených roztoků *PfL* s různým množstvím proteinů a 5  $\mu\text{L}$  roztoku albuminu; polovina roztoků lipasy a roztok albuminu byly navíc před aplikací na gel 5 min inkubovány v lázni o teplotě 100 °C. Dále bylo do dvou jamek aplikováno 5  $\mu\text{L}$  roztoku proteinového standardu molekulových hmotností ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) v redukujícím vzorkovém pufru (před použitím inkubován 5 min v lázni o teplotě 100 °C a uchován při -20 °C). Do jedné jamky bylo aplikováno 15  $\mu\text{L}$  roztoku lipasy *PfL* ve směsi s 50%v glycerolem 1:1.

Elektroforetická separace probíhala vertikálně při 4 °C a napětí 200 V (maximální proud 45 mA) a byla ukončena, jakmile se indikátor bromfenolová modř blížil spodnímu konci gelu.

##### 3.4.1.2 Detekce esterasové aktivity na polyakrylamidovém gelu

Polyakrylamidový gel byl po proběhnutí elektroforézy třepán (180 RPM) 20 min v Petriho misce ve směsi voda/2-propanol 20:7 a poté ještě 2× 10 min ve vodě. Před aplikací fluorogenního substrátu byl gel přenesen do 5mM fosfátového pufru o pH 7,0.

K 5,0 mL 5mM fosfátového pufru o pH 7,0 bylo přidáno 500  $\mu$ L 1mM roztoku 4-methylumbelliferylbutyrátu v 2-methoxyethanolu. Tento inkubační roztok byl velmi opatrně promíchán.



Obr. 17: Hydrolyza 4-methylumbelliferylbutyrátu při detekci lipasy na gelu.

Gel osušený od pufru z promývací fáze byl umístěn na podložku do UV komory na transiluminátor a opatrně převrstven inkubačním roztokem. Následovala inkubace gelu po dobu 20 min (schéma reakce na obr. 17) se zářením o vlnové délce 365 nm. Poté byl gel fotografován; pozitivní esterasová aktivita se na gelu projeví jako proužky emitující sytě zelené záření díky uvolněnému 4-methylumbelliferonu.

#### 3.4.1.2 Detekce proteinů na polyakrylamidovém gelu

Gel, na kterém byla provedena detekce esterasové aktivity, byl vložen do barvicí lázně a třepán (180 RPM) 60 min.

Poté byl gel inkubován 3 $\times$  v odbarvovací lázni, doku nedošlo k vymytí nevázaného barviva z gelu. Následně byl gel fotografován.

#### 3.4.1.3 Stanovení obsahu rozpustných proteinů v preparátu

Navážka 1–100 mg preparátu lipasy *PfL* byla rozpuštěna/suspendována v 1000  $\mu$ L 50mM fosfátového pufru o pH 7,0 a po případném ředění byl ve směsi stanoven obsah proteinů (str. 48).

U získané závislosti koncentrace proteinů na navážce byl poté ze směrnice získán obsah rozpustných proteinů v komerčním preparátu lipasy.

#### 3.4.1.4 Stanovení hydrolytické aktivity v preparátu

Navážka 0,5–5 mg preparátu lipasy *PfL* byla rozpuštěna/suspendována v 1000  $\mu$ L 50mM fosfátového pufru o pH 7,0 a po případném ředění byla v tomto roztoku stanovena hydrolytická aktivita na substrátu 4-nitrofenyllaurátu (metoda A na str. 46).

U získané závislosti hydrolytické aktivity roztoku na navážce byla ze směrnice přímky získána hodnota specifické aktivity v komerčním preparátu lipasy.

#### 3.4.1.5 Studium pH stability lipasy

Do 2mL mikroskopické pipety bylo přidáno 1950  $\mu\text{L}$  20mM univerzálního pufru o daném pH a 50  $\mu\text{L}$  30mg.mL<sup>-1</sup> suspenze preparátu lipasy *PfL*. Směs byla prudce zamíchána (2500 RPM) a staticky inkubována v lázni o teplotě 25 °C po dobu 5 hod. Po první půlhodině a poté každou následující hodinu inkubace (celkem 5×) byla inkubační směs krátce promíchána (2500 RPM).

Po uběhnutí inkubační doby byla směs promíchána (2500 RPM) a ze směsi bylo vzato 10  $\mu\text{L}$  (na 100  $\mu\text{L}$  doplněno 50mM fosfátovým pufrům o pH 7,0) ke stanovení hydrolytické aktivity na substrátu 4-nitrofenyllaurátu (metoda A na str. 46).

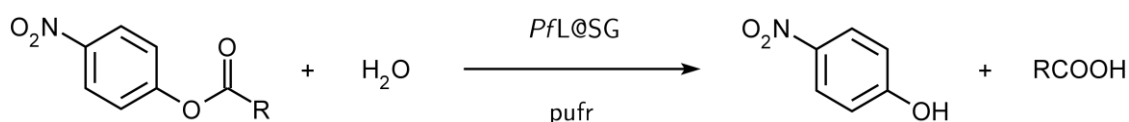
Stejný postup byl použit i při referenční inkubaci při pH 7,0; v tomto případě nebyla směs inkubována 5 hod, ale ihned po jejím připravení použita ke stanovení hydrolytické aktivity.

#### 3.4.1.6 Studium teplotní stability lipasy

Byl použit totožný postup jako při studiu teplotní stability u imobilizovaných lipas (metoda na str. 47) s tím rozdílem, že 0,5 mg enzymu *PfL* po inkubaci bylo před stanovením hydrolytické aktivity na substrátu 4-nitrofenyllaurátu (metoda A na str. 46) rozpuštěno v 1000  $\mu\text{L}$  50mM fosfátového pufru o pH 7,0 a ke stanovení bylo vzato 10  $\mu\text{L}$  tohoto roztoku (na 100  $\mu\text{L}$  doplněno 50mM fosfátovým pufrům o pH 7,0).

### 3.4.2 Studium enzymové kinetiky lipas

#### 3.4.2.1 Stanovení hydrolytické aktivity lipasy



Obr. 18: Enzymová hydrolyza 4-nitrofenylesteru.

Ke stanovení hydrolytické aktivity byly použity dvě spektrofotometrické metody na základě specifík stanovovaného enzymu/preparátu (tj. rozpustná nebo heterogenní forma); jako substráty byly použity chromogenní 4-nitrofenylestery (schéma na obr. 18). Enzymová aktivita získaná oběma metodami vyjadřuje počet  $\mu\text{mol}$  produktu 4-nitrofenolu uvolněných za minutu vztažený na objem či hmotnost vzorku. Pokud je známa rovněž koncentrace proteinů ve vzorku (str. 48), je aktivita vztažena i na tuto hodnotu.

Kalibrace metody byla provedena pro 4-nitrofenol v koncentračním rozsahu 3–125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

#### Metoda A: Hydrolyza 4-nitrofenylesteru v pufru – kinetické měření

Stanovení bylo prováděno pro vzorky tvořené pravými roztoky, ideálně pro roztoky mající lipasovou aktivitu vyšší než  $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Do kyvety (tloušťka 10,0 mm) bylo pipetováno 1000  $\mu\text{L}$  50mM fosfátového pufru o pH 7,0 a 50  $\mu\text{L}$  20mM roztoku 4-nitrofenylesteru v acetonu. Reakce byla zahájena přidáním 100  $\mu\text{L}$  roztoku vzorku a po rychlém promíchání (2200 RPM) byla umístěna do spektrofotometru. Jako slepý vzorek sloužila totožná směs, ve které byl roztok enzymu nahrazen pufrům.

Měření probíhalo v čase při vlnové délce 400 nm po dobu několika desítek sekund až několika minut; z počátečního lineárního úseku získané závislosti absorbance na čase byly odečteny hodnoty pro výpočet hydrolytické aktivity vzorku (rovnice 3).

$$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1} = \frac{A + 3,362\cdot 10^{-3}}{t} 1,453 \quad (3)$$

A ... nárůst absorbance,  $[A] = 0$ ;  $t$  ... čas reakce,  $[t] = \text{min}$ .

#### Metoda B: Hydrolyza 4-nitrofenylesteru v pufru – koncové měření

Stanovení bylo určeno pro imobilizované lipasy, které jsou nerozpustné a tvoří suspenze.

Do 4mL skleněné šroubovací lahvičky bylo k 0,5 mg imobilizované lipasy přidáno 3300  $\mu\text{L}$  50mM fosfátového pufru o pH 7,0 a směs byla 10 min preinkubována při teplotě 40 °C. Reakce byla následně zahájena přidávkem 150  $\mu\text{L}$  20mM roztoku 4-nitrofenylesteru v acetonu a probíhala na třepačce (lahvička v horizontální poloze, 200 RPM) při teplotě 40 °C po dobu desítek minut až několika hodin. Jako slepý vzorek sloužila totožná reakční směs, v níž nebyl žádný enzym.

$$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1} = \frac{A - A_0 + 3,362\cdot 10^{-3}}{mt} 435,9 \quad (4)$$

A ... absorbance vzorku,  $[A] = 0$ ;  $A_0$  ... absorbance slepého vzorku,  $[A_0] = 0$ ;  $m$  ... navážka enzymu,  $[m] = \text{mg}$ ;  $t$  ... čas reakce,  $[t] = \text{min}$ .

Po uběhnutí inkubační doby bylo z reakční směsi odebráno 1900  $\mu\text{L}$  suspenze a po centrifugaci (14000g, 1 min) bylo ze supernatantu pipetováno 750  $\mu\text{L}$  do kyvety (tloušťka 10,0 mm); poté byla na spektrofotometru odečtena absorbance při vlnové délce 400 nm proti slepému vzorku. Z hodnoty odečtené absorbance, údaje o času

reakce a navážce enzymu byla vypočtena hydrolytická aktivita vztažená na hmotnost enzymu (rovnice 4 na str. 46).

### **3.4.3 Charakterizace imobilizovaných enzymů**

#### **3.4.3.1 Studium pH stability imobilizovaných lipas**

Do 2mL mikrozkušavky bylo k 10 mg imobilizované lipasy přidáno 2000  $\mu$ L 20mM univerzálního pufru o daném pH. Směs byla prudce zamíchána (2500 RPM) a staticky inkubována v lázni o teplotě 25 °C po dobu 5 hod. Po první půlhodině a poté každou následující hodinu inkubace (celkem 5 $\times$ ) byla inkubační směs krátce promíchána (2500 RPM).

Po uběhnutí inkubační doby byla směs promíchána (2500 RPM) a centrifugována (14000g, 2 min). Supernatant byl opatrně odebrán a enzym byl postupně promyt vodou (3 $\times$  1000  $\mu$ L), acetonem (1 mL) a nakonec petroletherem (1 mL) – po každém přidavku vždy následovaly promíchání, centrifugace a odebrání supernatantu. Enzym se zbytky rozpouštědla byl ponechán 20 min na vzduchu a poté inkubován 20 hod v uzavřené nádobě s nasyceným roztokem chloridu hořečnatého ( $a_w \sim 0,33$ ). Následně byl enzym uchován při 4 °C před stanovením hydrolytické aktivity pomocí substrátu 4-nitrofenyllaurátu (metoda B na str. 46).

Stejný postup byl použit i při referenční inkubaci při pH 7,0; v tomto případě nebyla směs inkubována 5 hod, ale ihned po jejím připravení byla zpracována a enzym poté použit ke stanovení hydrolytické aktivity.

#### **3.4.3.2 Studium teplotní stability imobilizovaných lipas**

Do 2mL skleněné šroubovací lahvičky byl k 5 mg imobilizované lipasy přidán 1,00 mL isooktanu. Směs byla zamíchána (1800 RPM) a staticky inkubována při dané teplotě po dobu 5 hod. Po první půlhodině a poté každou následující hodinu inkubace (celkem 5 $\times$ ) byla inkubační směs krátce promíchána (1800 RPM).

Po uběhnutí inkubační doby byla směs promíchána (1800 RPM) a centrifugována (14000g, 2 min). Supernatant byl opatrně odebrán a enzym byl promyt petroletherem (0,5 mL) – po jeho přidavku následovalo promíchání, centrifugace a odebrání supernatantu. Enzym se zbytky rozpouštědla byl ponechán 20 min na vzduchu a poté inkubován 20 hod v uzavřené nádobě s nasyceným roztokem chloridu hořečnatého ( $a_w \sim 0,33$ ). Následně byl enzym uchován při 4 °C před stanovením hydrolytické aktivity pomocí substrátu 4-nitrofenyllaurátu (metoda B na str. 46).

Podobný postup byl použit také během referenční inkubace při teplotě 25 °C; směs nebyla při dané teplotě inkubována 5 hod, ale ihned po přípravě byla zpracována a enzym poté použit ke stanovení hydrolytické aktivity.

#### 3.4.3.3 Studium stability imobilizované lipasy v rozpouštědlech

Do 2mL skleněné šroubovací lahvičky byl k 5 mg imobilizované lipasy Pfl@propyl-SG přidán 1,00 mL příslušného rozpouštědla. Směs v lahvičce byla míchána v horizontální poloze (240 RPM) po dobu 20 hod.

Po uběhnutí inkubační doby byl enzym ve směsi ponechán sedimentovat (cca 30 min), supernatant byl odebrán a enzym nechán 5 hod schnout na vzduchu. Lipasa byla poté inkubována 20 hod v uzavřené nádobě v přítomnosti nasyceného roztoku chloridu hořečnatého ( $a_w \sim 0,33$ ) a před stanovením hydrolytické aktivity se substrátem 4-nitrofenylkaprinátem (metoda B na str. 46) byl enzym uchován při 4 °C.

Stejný postup byl použit při referenční inkubaci bez přídavku rozpouštědla; enzym byl po proběhnutí inkubační doby použit ke stanovení hydrolytické aktivity.

#### 3.4.4 Stanovení koncentrace rozpustných proteinů

Do plastové kyvety (tloušťka 10,0 mm) bylo pipetováno 1000  $\mu\text{L}$  činidla na stanovení proteinů [170] a 100  $\mu\text{L}$  roztoku vzorku, který byl v případě potřeby předem ředěn vodou či vhodným pufrem.

Po pěti minutách inkubace připravené směsi byla pomocí spektrofotometru změřena její absorbance při vlnové délce 595 nm proti roztoku slepého vzorku, v němž byl roztok vzorku nahrazen vodou či pufrem.

Kalibrace stanovení byla provedena pomocí proteinového standardu hovězího sérového albuminu, a to v koncentračním rozsahu 35–280  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  v roztoku vzorku. Rovnice 5 pro výpočet koncentrace proteinů ve vzorku platná pro tento rozsah má tvar,

$$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} = 692,76 (1,0666 - \sqrt{1,1260 - A}) \quad (5)$$

kde  $A$  ... absorbance při vlnové délce 595 nm,  $[A] = 0$ .



## 3.5 Imobilizace lipas

### 3.5.1 Imobilizace lipasy do hydrofobních sol-gelů

Při přípravě lipasy imobilizované v ormosilech se vycházelo z předchozích prací [117,133]. Navážka 150 mg preparátu lipasy *PfL* byla suspendována v 1,50 mL 50mM fosfátového pufru o pH 7,0. Do dvou plastových 5mL zkumavek bylo pipetováno 700  $\mu\text{L}$  suspenze lipasy, 250  $\mu\text{L}$  1%w roztoku polyvinylalkoholu a 125  $\mu\text{L}$  1M roztoku fluoridu draselného. Celkové množství vody ve směsi se pohybovalo kolem 1075  $\mu\text{L}$  (60 mmol) a bylo v molárním poměru 8:1 vůči použitým silanům.

Ke směsi byly přidány silany – 0,75 mmol alkyl/aryltrialkoxysilanu a 6,75 mmol tetraethoxysilanu (tab. 2) – a následně 250  $\mu\text{L}$  2-propanolu. Polymerační směs byla přibližně 30 s prudce míchána (2500 RPM) a poté umístěna k polymeraci na kývavou třepačku (20 RPM).

Tab. 2: Přídavek silanů při imobilizaci lipasy.

nosič	silany	
propyl-SG	trimethoxy(propyl)silan	tetraethoxysilan
	140 $\mu\text{L}$	1505 $\mu\text{L}$
oktyl-SG	triethoxy(oktyl)silan	tetraethoxysilan
	240 $\mu\text{L}$	1505 $\mu\text{L}$
fenyl-SG	fenyl(trimethoxy)silan	tetraethoxysilan
	185 $\mu\text{L}$	1505 $\mu\text{L}$

Po proběhnutí polymerace (cca 3 hod, projevilo se viditelnou změnou fáze) byl gel umístěn na 18 hod do 4 °C. Dále byl pak gel ze zkumavky převeden do kádinky (gely získané ze stejných prekurzorů byly spojeny), kde byl manuálně pomocí špachtle dispergován v 10 mL 50mM fosfátového pufru o pH 7,0. Ze směsi byl odebrán vzorek, u něhož byl po centrifugaci (14000g, 2 min) stanoven v supernatantu obsah zbytkových proteinů (odstavec na str. 48).

Gel byl kvantitativně převeden pomocí fosfátového pufru na fritu s filtračním papírem a za sníženého tlaku promyt postupně 100 mL vody, 50 mL acetonu a nakonec 50 mL petroletheru a poté byl ponechán doschnout. Větší úlomky byly opatrně rozetřeny v třecí misce a nosič ponechán rozprostřen 6 dní v uzavřené nádobě v přítomnosti nasyceného roztoku chloridu hořečnatého ( $a_w \sim 0,33$ ). Připravený nosič byl před použitím uchován při 4 °C v plastové mikrozkuhavce.

Referenční ormosily bez přidaného enzymu byly připraveny popsáním způsobem; suspenze lipasy zde byla nahrazena samotným pufrem a bylo použito pětina množství všech složek.

Připravené enzymy byly po přidání malého množství ethanolu pozorovány pomocí světelného mikroskopu (zvětšení 40×), pro srovnání byly také pozorovány silikagel 60 a křemelina.

### 3.5.2 Studium imobilizovaných lipas pomocí IČ spektroskopie

Ormosilové nosiče s lipasou i referenční nosiče bez enzymu a komerční lipasa *PfL* byly podrobeny technice infračervené spektroskopie zeslabeného úplného odrazu s Fourierovou transformací (ATR FTIR, *attenuated total reflectance*). Jako reference byl vybrán silikagel 60. Analýza byla provedena paní Mgr. Soňou Hermanovou, Ph.D., z Ústavu polymerů na VŠCHT Praha.

Vzorky byly nejprve sušeny 3 dny při teplotě 40 °C a poté byly měřeny v Centrálních laboratořích VŠCHT Praha na IČ spektrometru *Nicolet 6700* (*Thermo Fisher Scientific*, USA) vybaveném DTGS (deuterovaný triglycin-sulfát) KBr detektorem při rozlišení 4 cm<sup>-1</sup>.

## 3.6 Biotransformační reakce katalyzované připravenými lipasami

### 3.6.1 Analytické reakce

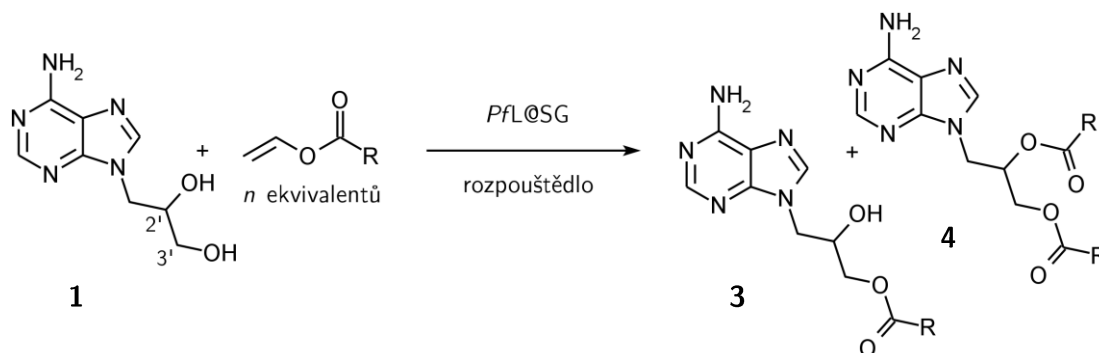
#### 3.6.1.1 Acetylace DHPA ve směsi acetonitril/dimethylformamid

Do 2mL skleněné šroubovací lahvičky byl k 37 mg lipasy *PfL@oktyl-SG* přidán 1,00 mL 1mM roztoku 9-(2',3'-dihydroxypropyl)adeninu **1** ve směsi acetonitril/dimethylformamid v příslušném poměru a 9,3 μL vinylacetát. Reakční směs byla míchána na valivé třepačce (20 RPM) a reakce (obr. 19 na str. 51) byla ukončena po 30 hod.

V určených časových intervalech byl z reakční směsi odebrán vzorek ke stanovení stupně konverze pomocí analytické TLC (str. 56; 5,6 cm, 20 μL, chloroform/methanol 4:1). Získaná časová závislost stupně konverze na čase pak byla proložena empirickou funkcí (% konverze) =  $A/(1 + Bt) + Ct$ , kde A, B, C jsou konstanty.

### 3.6.1.2 Acetylace DHPA v různých rozpouštědlech

K 5 mg lipasy *PfL@oktyl-SG* ve 3 mL konické reakční skleněné šroubovací lahvičce byl přidán diol **1** (0,5 mg, 2,4  $\mu$ mol) a 1,00 mL směsi rozpouštědlo/vinylacetát 45:1 (21,5  $\mu$ L, 0,24 mmol, 100 ekvivalentů). Reakce probíhala na magnetické míchačce (250 RPM) po dobu 24 hod.



Obr. 19: Enzymová acylace DHPA **1** pomocí vinylesterů.

Reakční směs byla pipetována do odpařovací zkumavky a reakční lahvička ještě promyta acetonem (3 $\times$  1 mL). Spojená směs byla odpařena za sníženého tlaku a k odparku bylo přidáno 1,20 mL methanolu. Suspenze byla prudce promíchána (2000 RPM, 20 s) a byl z ní ihned odebrán vzorek ke stanovení stupně konverze pomocí analytické TLC (str. 56; 5,6 cm, 10  $\mu$ L, chloroform/methanol 4:1).

### 3.6.1.3 Studium vlivu množství vinylacetátu při acetylaci DHPA

Do 2 mL skleněné šroubovací lahvičky bylo k 5 mg lipasy *PfL@oktyl-SG* přidáno 1,50 mL 0,9 mM roztoku DHPA **1** v acetonitrilu obsahujícího vinylacetát v daném molárním poměru vůči alkoholu. Směs byla míchána na valivé třepačce (20 RPM) po dobu 48 hod.

V časových intervalech byl z reakční směsi odebrán vzorek ke stanovení stupně konverze pomocí analytické TLC (str. 56; 5,6 cm, 20  $\mu$ L, chloroform/methanol 4:1).

### 3.6.1.4 Studium vlivu donoru acylu při acetylaci DHPA

K 2,5 mg lipasy *PfL@oktyl-SG* ve 2 mL skleněné šroubovací lahvičce bylo přidáno 1,50 mL 0,5 mM roztoku DHPA **1** s 25 mM donorem acylu (50 ekvivalentů) v acetonitrilu. Směs byla míchána na valivé třepačce (20 RPM).

Reakce byla ukončena po 30 hod a ve směsi byl stanoven stupeň konverze pomocí analytické TLC (str. 56; 5,6 cm, 40  $\mu$ L, chloroform/methanol 4:1).

V případě donorů acetanhydridu a kyseliny octové byla provedena také inkubace referenční směsi, v níž byl enzym nahrazen prostým nosičem oktyl-SG.

#### 3.6.1.5 Studium vlivu délky řetězce vinylesteru při esterifikaci DHPA

Do 2mL skleněné šroubovací lahvičky bylo naváženo 2,5 mg lipasy *PfL@oktyl-SG* a k této přidáno 1,50 mL 0,5mM roztoku DHPA **1** v acetonitrilu a 37,5  $\mu$ mol příslušného vinylesteru (50 ekvivalentů). Reakční směs byla míchána na valivé třepačce (20 RPM).

Reakce byla ukončena po 30 hod a ve směsi byl stanoven stupeň konverze pomocí analytické TLC (str. 56; 5,6 cm, 40  $\mu$ L, chloroform/methanol 6:1). V případě palmitoylace a stearylace byla reakční směs po aplikaci prvního vzorku na TLC ještě ředěna 1:1 dichlormethanem a poté z této provedena TLC (80  $\mu$ L).

#### 3.6.1.6 Studium vlivu nosiče lipasy při kaprinylyaci DHPA

Do 2mL skleněné šroubovací lahvičky bylo ke 2,5 mg lipasy přidáno 1,50 mL roztoku 0,5mM diolu **1** (0,75  $\mu$ mol) a 25mM vinylkaprinátu (37,5  $\mu$ mol, 50 ekvivalentů) v acetonitrilu.

Reakce probíhala 24 hod na valivé třepačce (20 RPM). Stupeň konverze pak byl stanoven pomocí TLC (metoda na str. 56, 5,6 cm, 40  $\mu$ L, chloroform/methanol 5:1).

### 3.6.2 **Semipreparativní reakce, charakterizace produktů**

Semipreparativní reakce byly prováděny za účelem přípravy sloučenin pro jejich následnou charakterizaci pomocí analytické TLC (str. 56), HPLC (na str. 58) nebo GC (vizte str. 59), NMR spektroskopie (str. 60) nebo polarimetrie (na str. 61) a rovněž k ověření katalytických schopností studovaných enzymů při práci ve větším měřítku.

Výsledky strukturní charakterizace připravených látek jsou podle zvyklostí uvedeny v této části.

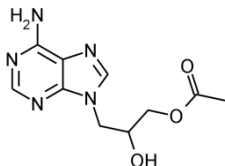
#### 3.6.2.1 Acetylace 9-(2',3'-dihydroxypropyl)adeninu

Do 100mL Erlenmeyerovy baňky byl k 9-(2',3'-dihydroxypropyl)adeninu **1** (25 mg, 120  $\mu$ mol) přidán vinylacetát (2,20 mL, 24 mmol, 200 ekvivalentů), lipasa *PfL@oktyl-SG* (20 mg) a toluen (20 mL).

Reakce probíhala při teplotě 60 °C na třepačce (150 RPM) a byla monitorována pomocí TLC (str. 56, chloroform/methanol 4:1). Jakmile byl poměr mezi produkty mono- **3a** a diacetátem **4a** zhruba 1:1, byla reakční směs filtrována a reakční baňka a enzym zadrženy na filtru promyty 3× 5 mL acetonu. Těkavý podíl z filtrátu byl

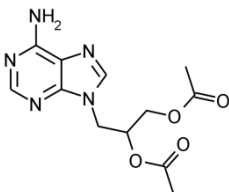
odpařen za sníženého tlaku a odparek 37 mg byl podroben semipreparativní TLC (metoda na str. 57, chloroform/methanol 4:1), která poskytla DHPA 3'-acetát **3a** (9,9 mg, 33 %) jako bílý prášek a DHPA 2',3'-diacetát **4a** (14 mg, 40 %) jako žlutobílý prášek.

### 9-(2'-hydroxy-3'-acetyloxypropyl)adenin **3a**



**3a** HPLC:  $t_R = 9,3$  min, >98 % (254 nm).  $^1\text{H}$  NMR (401 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 8,13$  (s, 1H, CH-2), 8,05 (s, 1H, CH-8), 7,19 (s široký, 1H, NH<sub>2</sub>), 5,52 (s široký, OH-2'), 4,24 (ABq, 1H, 1H,  $^2J = 16,8$  Hz,  $^3J = 7,3$  Hz, CH<sub>2</sub>-1A'), 4,10–4,14 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-1B' a CH-2'), 3,94 (2× ABq, 2H,  $^2J = 11,4$  Hz,  $^3J = 4,4$  a 5,4 Hz, CH<sub>2</sub>-3'), 2,00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 170,2$  (CO), 155,9 (C-6), 152,3 (CH-2), 149,7 (C-4), 141,5 (CH-8), 118,6 (C-5), 66,5 (CH-2'), 65,6 (CH<sub>2</sub>-3'), 46,1 (CH<sub>2</sub>-1'), 20,7 (CH<sub>3</sub>) ppm.

### 9-(2',3'-diacetyloxypropyl)adenin **4a**

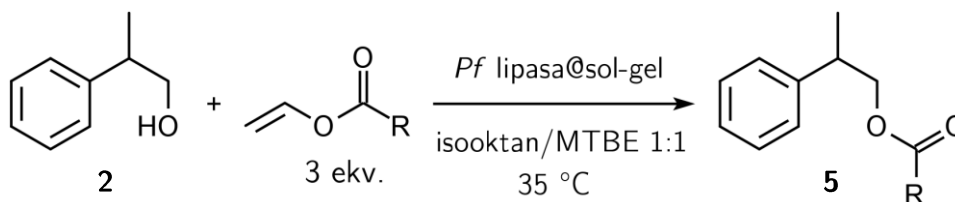


**4a** HPLC:  $t_R = 11,1$  min, >97 % (254 nm).  $^1\text{H}$  NMR (401 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 8,14$  (s, 1H, CH-2), 8,10 (s, 1H, CH-8), 7,22 (s široký, 1H, NH<sub>2</sub>), 5,33–5,39 (m, 1H, CH-2'), 4,42 (2× ABq, 2H, 1H,  $^2J = 14,7$  Hz,  $^3J = 4,2$  a 7,0 Hz, CH<sub>2</sub>-1'), 4,26 (ABq, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $^3J = 3,7$  Hz, CH<sub>2</sub>-3A'), 4,06 (ABq, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $^3J = 6,1$  Hz, CH<sub>2</sub>-3B'), 2,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3'2), 1,92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-2'2) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 170,1$  (CO-3'1), 169,5 (CO-2'1), 156,0 (C-6), 152,6 (CH-2), 149,8 (C-4), 141,1 (CH-8), 118,5 (C-5), 69,3 (CH-2'), 62,5 (CH<sub>2</sub>-3'), 43,0 (CH<sub>2</sub>-1'), 20,6 (CH<sub>3</sub>-2'2), 20,5 (CH<sub>3</sub>-3'2) ppm.

**1** HPLC:  $t_R = 3,2$  min.  $^1\text{H}$  NMR (401 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 8,13$  (s, 1H, CH-2), 8,03 (s, 1H, CH-8), 7,17 (s široký, 2H, NH<sub>2</sub>), 5,09 (d, 1H,  $^3J = 5,4$  Hz, OH-2'), 4,83 (t, 1H,  $^3J = 5,7$  Hz, OH-3'), 4,29 (ABq, 1H,  $^2J = 14$  Hz,  $^3J = 3,6$  Hz, CH<sub>2</sub>-1A'), 4,00 (ABq, 1H,  $^2J = 14$  Hz,  $^3J = 8,1$  Hz, CH<sub>2</sub>-1B'), 3,79–3,86 (m, 1H, CH-2'), 3,36–3,42 (m, 1H, CH-3A'), 3,27–3,33 (m, 1H, CH-3B') ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 155,8$

(C-6), 152,1 (CH-2), 149,5 (C-4), 141,5 (CH-8), 118,5 (C-5), 69,6 (CH-2'), 63,4 (CH<sub>2</sub>-3'), 46,3 (CH<sub>2</sub>-1') ppm.

### 3.6.2.2 Acylace 2-fenylpropanolu



Obr. 20: Enzymová acylace 2-fenylpropanolu **2** pomocí vinylesterů.

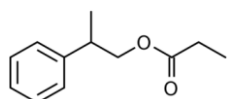
*Obecný postup (obr. 20):*

Do 3mL konické reakční skleněné šroubovací lahvičky byl přidán alkohol **2** (68 mg, 0,50 mmol), vinylester (1,50 mmol, 3 ekvivalenty) a 2,00 mL směsi isooktan/*tert*-butylmethylether 1:1.

Reakce byla zahájena přidávkem lipasy (10 mg, enzym *PfL*@oktyl-SG) a probíhala několik dní při teplotě 35 °C na magnetické míchačce (250 RPM). Průběh acylace byl kvalitativně monitorován pomocí analytické TLC (str. 56, 5,6 cm, 5 μL, petrolether/dichlormethan 1:1). Stupeň konverze byl stanoven na konci reakční doby pomocí HPLC (metoda na str. 59), v případě benzoylace pomocí GC (str. 59).

Reakční směs byla filtrována přes papír, reakční lahvička a enzym zadržovaný na filtru byly promyty dichlormethanem (3× 2 mL) a spojené filtráty byly šetrně odpařeny za sníženého tlaku a uchovány při –20 °C. Produkty reakcí byly purifikovány pomocí chromatografie na sloupci silikagelu (str. 57).

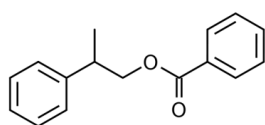
### 2-fenylpropylpropionát **5b**



Reakce **2** s vinylpropionátem (167 μL, 1,5 mmol) po 50 hod poskytla 0,13 g odparku. Během následné sloupcové chromatografie (10 g silikagelu, petrolether/dichlormethan 4:1) byl získán propionát **5b** (59 mg, 62 %) jako čirá kapalina příjemného zápachu.

**5b** HPLC:  $t_R = 7,1$  min, 97 % (258 nm). <sup>1</sup>H NMR (401 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,29–7,33 (m, 2H, CH-*m*), 7,21–7,24 (m, 3H, CH ar.), 4,17 (2× ABq, 2H, <sup>2</sup>*J* = 10,7 Hz, <sup>3</sup>*J* = 6,9 a 7,3 Hz, CH<sub>2</sub>-1), 3,10 (sextet, 1H, <sup>3</sup>*J* = 7,0 Hz, CH), 2,29 (q, 2H, <sup>3</sup>*J* = 7,6 Hz, CH<sub>2</sub>-2'), 1,30 (d, 3H, <sup>3</sup>*J* = 7,0 Hz, CH<sub>3</sub>-3), 1,09 (t, 3H, <sup>3</sup>*J* = 7,6 Hz, CH<sub>3</sub>-3') ppm. <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 174,4 (CO), 143,2 (C ar.), 128,5 (CH-*m*), 127,3 (CH-*o*), 126,7 (CH-*p*), 69,2 (CH<sub>2</sub>-1), 39,0 (CH), 27,6 (CH<sub>2</sub>-2'), 18,0 (CH<sub>3</sub>-3), 9,1 (CH<sub>3</sub>-3') ppm.

## 2-fenylpropylbenzoát 5k



Reakce sloučeniny **2** s vinylbenzoátem (210  $\mu\text{L}$ , 1,5 mmol) po 500 hod poskytla 0,26 g odparku. Během sloupcové chromatografie (15 g silikagelu, petrolether a poté petrolether/dichlormethan 5:1) byly izolovány benzoylester **5k** (26 mg, 22 %) a výchozí látka **2** (35 mg, 51 %) jako čiré kapaliny.

**5k** HPLC:  $t_R = 10,7$  min, >99 % (258 nm).  $^1\text{H}$  NMR (401 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,97\text{--}8,00$  (m, 2H, CH-*o'*), 7,52–7,55 (m, 1H, CH-*p'*), 7,39–7,43 (m, 2H, CH-*m'*), 7,29–7,35 (m, 4H, CH ar.), 7,22–7,25 (m, 1H, CH ar.), 4,41 (2 $\times$  ABq, 2H,  $^2J = 10,7$  Hz,  $^3J = 6,9$  a 7,2 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,25 (sextet, 1H,  $^3J = 7,0$  Hz, CH), 1,40 (d, 3H,  $^3J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 166,5$  (CO), 143,2 (C ar.), 132,9 (CH-*p'*), 130,3 (C' ar.), 129,5 (CH-*o'*), 128,5 (CH-*m*), 128,3 (CH-*m'*), 127,3 (CH-*o*), 126,7 (CH-*p*), 69,9 ( $\text{CH}_2$ ), 39,1 (CH), 18,0 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.  $[\alpha] = -11,3^\circ$  (0,26 g.(100 mL) $^{-1}$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**2** HPLC:  $t_R = 2,8$  min.  $^1\text{H}$  NMR (401 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,32\text{--}7,36$  (m, 2H, CH-*m*), 7,22–7,26 (m, 3H, CH ar.), 3,71 (d, 2H,  $^3J = 6,9$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2,96 (sextet, 1H,  $^3J = 6,9$  Hz, CH), 1,49 (s široký, OH), 1,40 (d, 3H,  $^3J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 146,3$  (CO), 128,7 (CH-*m*), 127,5 (CH-*o*), 126,7 (CH-*p*), 68,7 ( $\text{CH}_2$ ), 42,5 (CH), 17,6 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.  $[\alpha] = +2,2^\circ$  (0,80 g.(100 mL) $^{-1}$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

## 3.7 Analýza složek reakčních směsí

K analýze produktů reakcí a jejich izolaci byly použity metody kapalinové tenkovrstvé a kolonové chromatografie a plynové chromatografie.

Stupeň konverze při reakcích byl vypočítán z chromatografických dat podle vztahu 6,

$$C = 1 - \frac{a(S)}{\Sigma a_{SP}} \quad (6)$$

kde  $C$  .. stupeň konverze,  $[C] = 0$ ;  $a(S)$  ... plocha (píku) náležící substrátu,  $[a] = \text{variab.}$ ;  $\Sigma a_{SP}$  ... součet ploch substrátu a všech produktů.

### 3.7.1 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie byla použita dvěma způsoby – jako analytická metoda při studiu složek reakčních směsí a také jako metoda izolační. Separace byla prováděna v normálním módu.

TLC desky určené pro kvantitativní analytickou nebo pro semipreparativní TLC byly minimálně 6 hod před použitím vyvinuty v mobilní fázi s vyšší eluční silou (chloroform/methanol 1:1).

#### 3.7.1.1 Analytická tenkovrstvá chromatografie

Analytická TLC sloužila k identifikaci složek reakčních směsí a k monitorování průběhu reakcí.

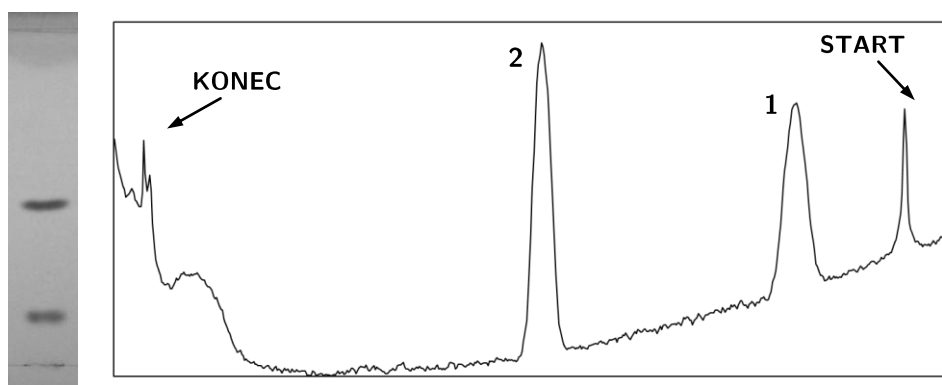
Separace probíhaly ve skleněné TLC vaně bez saturace. Látky byly detekovány pod UV lampou při vlnové délce 254 nm.

#### *Kvalitativní analytická TLC*

Při prvotních pokusech s novým substrátem/v nových podmínkách byla používána kvalitativní TLC, při níž byl vzorek na start TLC desky nanášen ve formě tečky pomocí skleněné kapiláry, a to většinou bez znalosti naneseného množství.

Rozměry TLC desky byly variabilní, stejně tak vzdálenost vzorků od sebe apod.

#### *Kvantitativní analytická TLC*



Obr. 21: Příklad denzitogramu získaného po separaci složek reakční směsi pomocí TLC.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> 1 DHPA 1. 2 DHPA 3'-kaprinát. Vlevo fotografie analyzované separační dráhy na TLC desce.

Při studiu kvantitativního relativního zastoupení jednotlivých složek reakční směsi, např. v rámci stanovení stupně konverze, nebo během určování přibližných retenčních faktorů produktů reakcí bylo využito separace na deskách o určité separační dráze (cm)



vymezené mezi startem (6 mm od spodního okraje) a koncem (4 mm od horního okraje).

Na desku byly vzorky aplikovány stříkačkou v přesném množství ( $\mu\text{L}$ ), a to ve formě přibližně 6 mm dlouhého pásu, alespoň 5 mm od sebe a látky následně byly eluovány mobilní fází o přesném složení. Po vyvinutí desky a jejím řádném usušení byla tato fotografována pro účel denzitometrické analýzy (obr. 21 na str. 56).

V metodách jsou podmínky kvantitativní TLC separace uváděny ve formátu:  
(separační dráha, objem vzorku, mobilní fáze).

Pro látku DHPA **1** a její estery bylo jako optimální nanesené množství stanoveno cca 20 nmol. U 2-fenylpropanolu **2** a jeho esterů bylo pro podobnou odezvu nanášeno mnohem větší množství (absorbuje UV záření na  $\sim 100\times$  nižší úrovni než DHPA **1**), avšak z těchto separací nebyla následně prováděna denzitometrická analýza.

#### 3.7.1.2 Semipreparativní tenkovrstvá chromatografie

Semipreparativní TLC byla využita při izolaci netěkavých látek (estery DHPA **1**) v hmotnosti do 20 mg.

Separovaná směs (max. 10 mg na desku) byla nejprve rozpuštěna v minimálním množství rozpouštědla (methanol) a vzniklý roztok byl nasát do aplikační stříkačky (100  $\mu\text{L}$ ). Na TLC desku (20 $\times$ 10) cm byl následně pomocí automatického dávkovače nanesen rychlostí 100  $\text{nL}\cdot\text{s}^{-1}$  (sušení zabezpečeno dusíkem o tlaku 4 bar) vzorek do podoby 18 cm dlouhého pásu 10 mm od spodního okraje.

Separace probíhala v 30 min předem saturované TLC vaně s dostatečným množstvím mobilní fáze. Po vyvinutí byla deska vložena pod UV lampu (vlnová délka 254 nm) a pásy, kde byl pozitivní výskyt žádané látky, byly obkresleny tužkou a následně opatrně rozstříhány na cca 5 mm dlouhé úseky. Tyto poté byly vloženy do baňky a třepány 3 $\times$  30 min s 25 mL silného elučního rozpouštědla (kombinace dichlormethan/methanol). Spojené extrakty byly sušeny pomocí bezvodého síranu sodného a po filtraci bylo rozpouštědlo odpařeno za sníženého tlaku.

#### **3.7.2 Sloupcová chromatografie na silikagelu**

Chromatografie na sloupci silikagelu v normálním módu byla použita při izolaci látek ze směsi v množství  $>20$  mg.

Stacionární fáze silikagelu (cca 10–30násobek hmotnosti separované směsi) byla postupně sypána do skleněné kolony (průměr 10 mm), jež byla naplněna od vzdušným ethylacetátem nad cca 5mm vrstvou křemeliny. Po sedimentaci sloupce ( $>1$  den) byla

kolona ekvilibrována minimálně 50 mL mobilní fáze použité při následné separaci látek.

Na kolonu byl nanesen vzorek rozpuštěný v minimálním množství slabého eluentu (např. isooktanu) a po vsáknutí do silikagelu byla na kolonu opatrně nanášena mobilní fáze. Eluce byla provedena izokraticky, příp. skokovým gradientem, rychlostí cca  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Pomocí automatického sběrače frakcí byl eluát jímán po 2 mL do zkumavek. Přítomnost látek (a nečistot) byla ve frakcích sledována pomocí analytické TLC (vizte str. 56), případně pomocí HPLC. Frakce obsahující danou látku v dostatečném množství byly spojeny, sušeny nad bezvodým síranem sodným a po filtraci bylo rozpouštědlo odpařeno za sníženého tlaku.

### 3.8.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Analýza pomocí HPLC byla využívána v případě prvotní detekce nově vznikajících produktů při biotransformačních reakcích a také při pozdějším stanovování stupně konverze.

K analýze byl použit systém sestávající se z kvartérního čerpadla (nízkotlaký gradient), řídicí jednotky, manuálního dávkovače vzorků s  $25 \mu\text{L}$  smyčkou, analytické kolony a UV/VIS detektoru. Separace látek byla ve všech případech provedena na koloně silikagelu (částice s pevným jádrem) s vázanou fází C18 v reverzním módu pomocí dvousložkové mobilní fáze ultračistá voda/acetónitril.

Mobilní fáze byla před použitím odvzdušněna pomocí vodní vývěvy a probublávána heliem (přetlak  $\sim 25\text{--}200 \text{ mbar}$ ).

#### 3.7.3.1 HPLC separace DHPA a jeho esterů

Tato metoda byla použita při separaci a identifikaci esterů DHPA **1** po acylačních reakcích.

Z reakční směsi byly do HPLC systému aplikovány 1–2  $\mu\text{L}$ . Analýza směsi probíhala s gradientovou elucí

čas	cílový podíl acetónitrilu	gradient
min	%	$\% \cdot \text{min}^{-1}$
0	5	0
20	90	4,25
30	90	0
32	5	42,5

ekvilibrace >10 min

čas analýzy: ~42 min

při průtoku mobilní fáze 1 mL.min<sup>-1</sup> a detekcí při vlnové délce 260 nm.

### 3.7.3.2 HPLC separace 2-fenylpropanolu a jeho esterů

Metoda byla použita při stanovení stupně konverze po ukončení reakce.

Po sedimentaci enzymu (>10 min) bylo z reakční směsi odebráno 0,5–1 µL a nastříknuto do systému; analýza probíhala s využitím lineárního gradientového elučního programu

čas	cílový podíl acetonitrilu	gradient
min	%	%.min <sup>-1</sup>
0	55	0
3	55	0
7,5	100	10
27,5	100	0
28,5	55	45

ekvilibrace >10 min

čas analýzy: ~38 min

při průtoku mobilní fáze 1 mL.min<sup>-1</sup>. Detekce byla uskutečněna při vlnové délce 258 nm.

Stupeň konverze byl následně vypočítán podle vztahu 6 na str. 55 s využitím hodnot ploch píků výchozí látky a produktu (v mV.s).

### 3.7.4 Chirální kapilární plynová chromatografie

Pro analýzu zastoupení enantiomerů látky v průběhu enzymové reakce byl použit plynový chromatograf vybavený chirální analytickou kolonou (polysiloxany s permethylovaným β-cyklodextrinem) a plamenoionizačním detektorem (FID).

#### 3.7.4.1 GC separace 2-fenylpropanolu a jeho benzoátu

Automatickým dávkovačem bylo do předního inletu (230 °C, tlak 0,688 bar, splitovací poměr 50:1, nosným plynem vodík, celkový průtok 82,5 mL.min<sup>-1</sup>) dávkován 1 µL vzorku reakční směsi ředěné v poměru 33:1 *tert*-butylmethyletherem.

Pro analýzu byl v kolonovém prostoru použit následující teplotní program

gradient	cílová teplota	rampa
°C.min <sup>-1</sup>	°C	min
0	80	0,5
0,90	115	0
20	200	12
—	80	∞

čas analýzy: 55,64 min

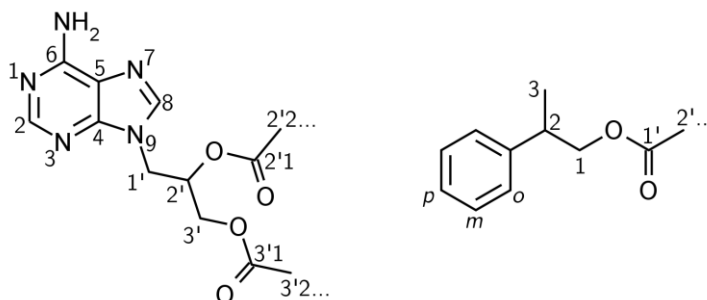
s průtokem mobilní fáze (vodík) 1,5 mL.min<sup>-1</sup> (~44 cm.s<sup>-1</sup>). Analyty eluující z kolony byly detekovány spálením v detektoru (220 °C, průtok vodíku 30 mL.min<sup>-1</sup>, průtok vzduchu 350 mL.min<sup>-1</sup>, průtok dusíku (*make-up*) 20 mL.min<sup>-1</sup>).

Vyhodnocení chromatogramu bylo provedeno na základě ploch píků jednotlivých látek (v pA.s). K výpočtu stupně konverze (*C*), enantiomerního přebytku (*ee*) a enantioselektivity (*E*) byly použity rovnice 6 na str. 55 a 1 a 2 na str. 16, přičemž celkový enantiomerní poměr reakce je průměr ze tří analýz provedených v průběhu reakční doby.

### 3.7.5 Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie

Měření na NMR spektrometru *Bruker Avance III HD 400 MHz* vybaveném kryosondou *Prodigy*, automatickým měničem vzorků *SampleXpress* a PC rozhraním *Topspin 3.2* probíhalo na oddělení NMR a molekulové spektroskopie na ÚOCHB.

Vzorek v množství několika desítek μmol byl nejprve rozpuštěn ve skleněné šroubovací lahvičce pomocí 0,50 mL deuterovaného rozpouštědla, a bylo přidáno minimální množství referenční látky tetramethylsilanu (<1 μL, v některých případech byly jako reference použity reziduální protony v rozpouštědle). Roztok vzorku byl promíchán a pipetován do NMR kyvety (180×4 mm) – její otvor byl následně před umístěním do měniče vzorků utěsněn teflonovou páskou a opatřen víčkem.



Obr. 22: Označení atomů uhlíku u použitých látek pro potřeby NMR.

U všech vzorků byla měřena jednorozměrná spektra protonová ( $^1\text{H}$ ) a uhlíková ( $^{13}\text{C}$ , s  $^1\text{H}$  dekaplingem) a dále pak spektra dvourozměrná homonukleární  $^1\text{H}$  COSY (korelace protonů, jež mají přímou spinovou interakci) a heteronukleární  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (korelace protonů a uhlíků, které jsou k sobě přímo vázány) a  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (korelace protonů a uhlíků, které dělí 2–4 vazby). Dvourozměrná spektra byla použita jako podpůrný materiál při přiřazování jednotlivých signálů k atomům v molekule. Pro identifikaci uhlíků bylo rovněž měřeno dekaplované spektrum  $^{13}\text{C}$  s testem vázaných protonů (APT) – signál uhlíku skupin CH a  $\text{CH}_3$  je pozitivní, signál pro kvartérní C a  $\text{CH}_2$  negativní.

Pro každou izolovanou sloučeninu byly vypsány hodnoty chemických posunů ( $\delta$ ), multiplicita signálů (s ... singlet, d ... dublet, t ... triplet, q ... kvartet, m ... multiplet) a případně hodnoty geminálních a vicinálních  $J$ -vazeb. Obecné číslování atomů u sloučenin DHPA **1** a 2-fenylpropanolu **2** je uvedeno na obrázku 22 na str. 60.

### 3.7.6 Polarimetrie

Měření optické otáčivosti bylo po předání látky (cca 5–10 mg) provedeno paní Ing. Lucií Holasovou z Analytické laboratoře na ÚOCHB.

Rozpouštědlem byl chloroform a měření probíhalo v cele o objemu 1,5 mL a optické dráze 20 cm v polarimetru *Autopol IV* (Rudolph Research Analytical, USA) při vlnové délce 589 nm a teplotě 20 °C.

## 3.8 Statistická analýza, využití výpočetních technologií

### 3.8.1 Statistické vyhodnocení dat

Použité statistické metody byly převzaty z literatury [171,172] a výpočty provedeny v programu *MS Office Excel 2007* (Windows, USA).

Ze získaných souborů  $N$  hodnot (pro  $N > 3$ ) byly nejprve podle Deanova-Dixonova testu vyloučeny odlehle hodnoty. Pro soubory hodnot byla vypočítána střední hodnota (pro  $N < 4$  aritmetický průměr a pro  $N > 3$  medián) a následně směrodatná odchylka. Pokud byl experiment proveden více než jednou, je ve výsledcích uveden počet hodnot ( $N$ ), ze kterých jsou udávána střední hodnota a směrodatné odchylky (chybové úsečky) spočteny.

Pearsonovy korelační koeficienty ( $r$ ) jsou po provedení Studentova  $t$ -testu opatřeny  $p$ -hodnotou pravděpodobnosti ( $p$ ).

### 3.8.2 Ostatní výpočetní technologie

Grafy byly tvořeny v *MS Office Excel 2007*.

Chromatogramy z vysokoúčinné kapalinové chromatografie byly zpracovány v programu *Clarity 5.0 (DataApex, ČR)*, chromatogramy z plynové chromatografie pak v programu *ChemStation (Agilent Technologies, USA)*, a exportovány do *MS Excel*.

Denzitometrické zpracování po chromatografii na tenké vrstvě bylo provedeno po pořízení fotografie TLC desky v programu *Corel Paint Shop Pro Photo X2 (Corel, Kanada)* – funkce korekce perspektivy a oříznutí – a následně v *ImageJ 1.48 (National Institute of Health, USA)* – funkce sloužící k denzitometrické analýze elektroforetických gelů a manuální integraci plochy pod křivkou.

Spektra z nukleární magnetické rezonance byla získána v programu *SpinWorks 4 (Kirk Marat)*. U signálu *free-induction decay* ze spektrometru byla provedena Fourierova transformace a spektrum bylo manuálně fázováno. Následně byly hodnoty chemického posunu vztaženy k referenci (tetramethylsilan), byly označeny jednotlivé signály a tyto integrovány. Podobně se postupovalo i při generování 2D NMR spekter.

Pro nelineární regresní analýzu kinetických křivek byl použit program *gnuplot 4.6 (Thomas Williams et al.)*.

Chemické vzorce byly kresleny v programu *BKChem 0.13 (Beda Kosata)* a schémata v programech *Inkscape 0.48 (Free Software Foundation, USA)* nebo *Corel Paint Shop Pro Photo X2*.

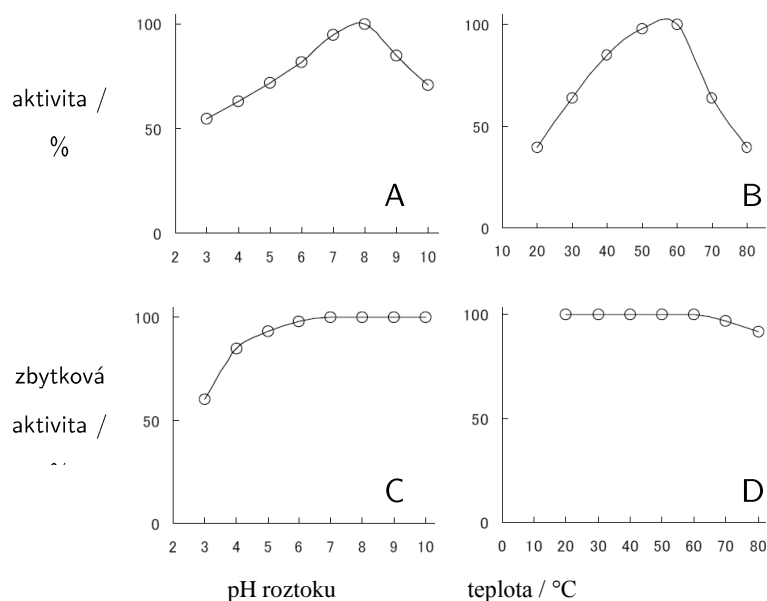
## 4 Výsledky

### 4.1 Výsledky imobilizace a charakterizace enzymů

V následující části jsou řazeny výsledky týkající se částečné charakterizace komerčního enzymového preparátu lipasy z *Pseudomonas fluorescens* a dále imobilizace této do hydrofobního křemičitého sol-gelu včetně charakterizace získaných imobilizovaných forem.

#### 4.1.1 Charakterizace komerčního preparátu lipasy Pfl

Preparát lipasy pod názvem *Lipase AK (Amano Enzyme, Japonsko)* je podle dostupných informací vyráběn submerzní kultivací vybraného kmene bakterie *Pseudomonas fluorescens* následovanou ultrafiltrací média, srážením proteinů a sušením/lyofilizací [173,174]. V průběhu procesu jsou přidávána aditiva (jmenovitě dextrin) a obsah vody se může pohybovat kolem 10 %.



Obr. 23: Charakteristiky volné lipasy Pfl (převzato z [173], upraveno).

A: pH optimum.

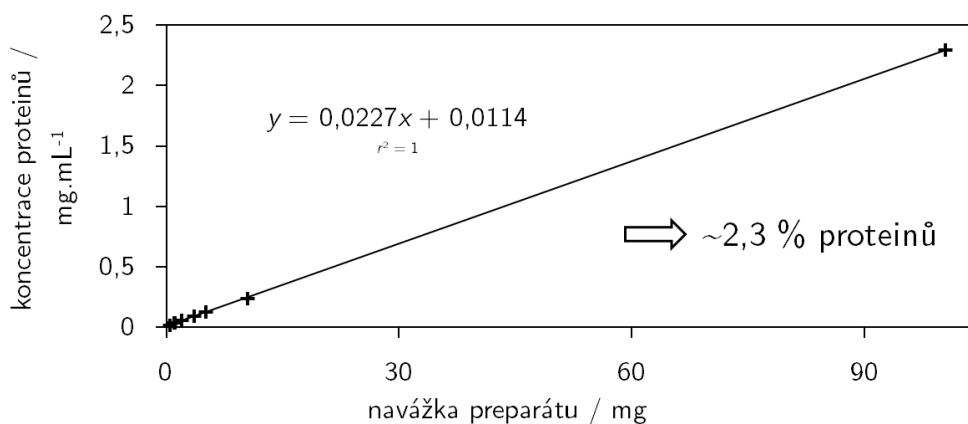
B: Teplotní optimum.

C: pH stabilita lipasy.

D: Teplotní stabilita.

Výrobce deklaruje lipasovou aktivitu >20000 enzymových jednotek na gram preparátu [173], přičemž se jedná o hodnotu získanou mezinárodní standardizovanou metodou pro stanovení aktivit enzymů ve farmaceutických směsích (titrimetrické stanovení kyselin uvolněných z oleje); enzymová jednotka odpovídá počtu  $\mu\text{mol}$  mastných kyselin uvolněných z emulze olivového oleje za minutu při pH 8 a teplotě

55 °C. Enzym má podle výrobce nejvyšší hydrolytickou aktivitu kolem pH 8 a teploty 60 °C a v pufru je stabilní po 60 min v širokém rozmezí pH (5–10) a teplot (<80 °C) (obr. 23 na str. 63).



Obr. 24: Stanovení obsahu rozpustných proteinů v komerčním preparátu lipasy z *Pseudomonas fluorescens*.

*Podmínky* (str. 44): Na základě stanovení proteinů po rozpuštění preparátu v pufru.

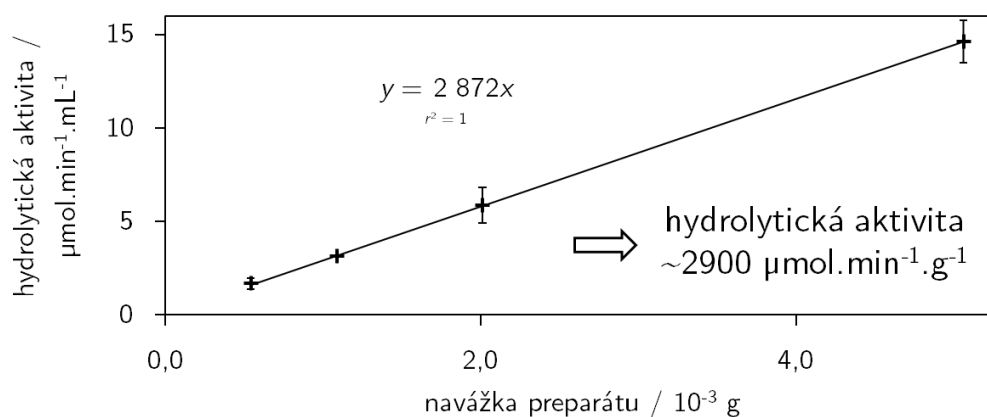
Z vlastních pozorování je možné uvést, že enzymový preparát je ve formě prášku béžové barvy a jeho částice vykazují mikrokrytalický charakter. Je dobře rozpustný ve vodě (minimálně do koncentrace 10 mg.mL<sup>-1</sup>). V preparátu byly nejprve stanoveny rozpustné proteiny v koncentraci přibližně 2,3 % (23 mg.g<sup>-1</sup>, odstavec na str. 44, obr. 24).

Následovalo stanovení hydrolytické lipasové aktivity kolorimetrickou metodou, která využívá absorpčních vlastností 4-nitrofenolu jako produktu enzymové hydrolyzy 4-nitrofenylesteru (obr. 18 na str. 45). Jako základní substrát byl vybrán 4-nitrofenyllaurát (C12) jakožto zástupce esterů se středně dlouhým acylovým řetězcem. Zjištěná aktivita činí 2900 μmol.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> (str. 44, obr. 25 na str. 65), což po vztažení na obsah proteinů dává hodnotu specifické aktivity 130 μmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>; hodnota aktivity je tedy minimálně 7× nižší, než poskytuje výše zmíněná metoda titrimetrická.

Proteiny obsažené v preparátu byly také podrobeny separaci pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírany sodného, aby se potvrdila homogenita lipasy a vyloučila nutnost dalšího purifikačního kroku. Při elektroforéze byly v koncentrační řadě (2,5, 10 a 20 μg proteinů) separovány vzorky preparátu, které prošly denaturací zvýšenou teplotou v redukujícím prostředí, i vzorky nativní



(bez denaturace) – toto bylo zejména důležité pro detekci aktivity nativního enzymu na gelu.

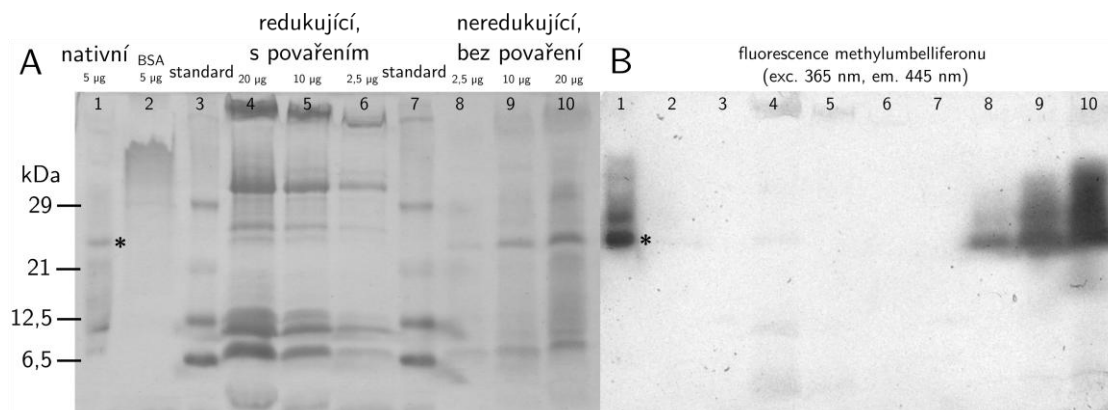


Obr. 25: Stanovení hydrolytické aktivity lipasy z *Pseudomonas fluorescens* v komerčním preparátu.

*Podmínky* (na str. 44): Výsledek stanovení hydrolytické aktivity (4-nitrofenyllaurát) po rozpuštění preparátu v pufru.  $N = 4$ .

Po elektroforéze bylo na gelu detekováno větší množství proteinů (odstavec na str. 44, obr. 26A na str. 66), přičemž proužky odpovídající lipase se nacházely v oblasti relativních molekulových hmotností ~26000 pro nativní formu (dráhy 1 a 8–10) a přibližně 35000 pro denaturovaný enzym (dráhy 4–6). V literatuře je pro lipasu z *Pseudomonas fluorescens* uváděna hodnota 33000 [23,175].

Detekce esterasové aktivity na gelu (zymografická analýza, metoda na str. 43, obr. 26B na str. 66) byla provedena po odstranění dodecylsíranu s využitím fluorogenního substrátu 4-methylumbelliferylbutyrátu, jež je za přítomnosti lipas/esteras hydrolyzován na UV zářením excitovatelný 4-methylumbelliferon (obr. 17 na str. 44). Pozitivní esterasová aktivita se objevila pouze u vzorků (dráhy 1 a 8–10), jež neprošly úplnou předseparační denaturací a redukcí. Jako optimální koncentrace, při níž jsou nejvíce zastoupené proteiny ještě viditelné a oblast esterasové aktivity není příliš difuzní, se jeví nejnižší aplikované množství, tj. 2,5 μg proteinů na separační dráhu. Poněkud vyšší citlivosti pro aktivitu bylo dosaženo při rozpuštění roztoku enzymu pouze v pufru a glycerolem (dráha 1).



Obr. 26: Separace proteinů komerčního preparátu lipasy pomocí elektroforézy a specifická detekce enzymu.<sup>a</sup>

A: Polyakrylamidový gel po barvení pomocí modři *Coomassie Brilliant R-250*.

B: Tentýž gel během detekce esterasové aktivity (negativní obraz).<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Zleva: **1** Roztok lipasy (5 µg)/50% v glycerol 1:1. **2** Roztok hovězího sérového albuminu (BSA) (5 µg)/redukující vzorkový pufr 1:1, denaturace varem. **3** Proteinový standard. **4–6** Roztok lipasy (2,5–20 µg)/redukující vzorkový pufr 1:1, denaturace varem. **7** Vizte **3**. **8–10** Roztok lipasy (2,5–20 µg)/vzorkový pufr 1:1. Hvězdička označuje polohu nativní lipasy *PfL* na gelu. <sup>b</sup> Hydrolýza fluorigenního substrátu 4-methylumbelliferylbutyátu.

#### 4.1.2 Imobilizace lipasy do ormosilů

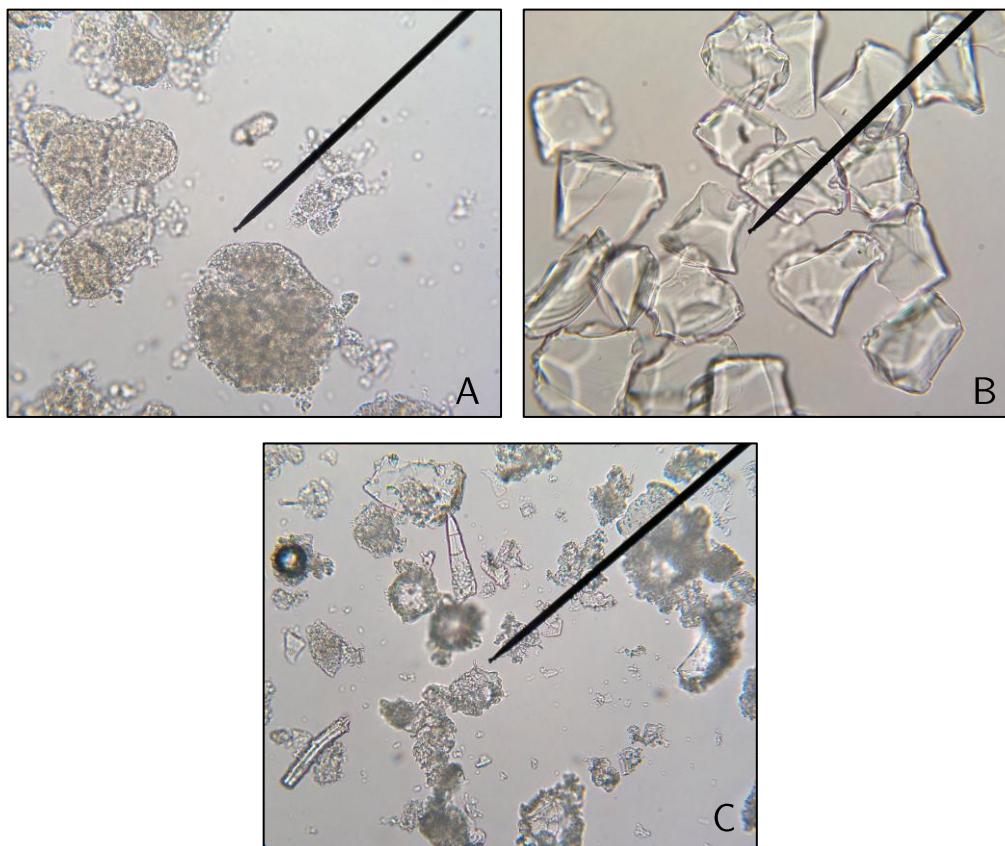
Tab. 3: Výsledky imobilizace lipasy *PfL* do ormosilů a hydrolytická aktivita enzymů.

nosič	izolovaná	obsah proteinů	specifická	
	hmotnost	(účinnost)	hydrolytická aktivita <sup>a</sup>	
	mg	mg.g <sup>-1</sup>	µmol.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup>	µmol.min <sup>-1</sup> .(mg prot.) <sup>-1</sup>
propyl-SG	990	3,1 (95 %)	1,4 ± 0,2	0,46 ± 0,06
oktyl-SG	830	3,6 (94 %)	10	2,9 ± 0,1
fenyl-SG	920	2,5 (71 %)	2,5 ± 0,1	1,0
komerční preparát	—	23 (—)	2900 ± 200	130 ± 10

*Podmínky* (str. 46): Hydrolýza 4-nitrofenyllaurátu v pufru byla katalyzována imobilizovanou/volnou lipasou *PfL*. <sup>a</sup> Hodnoty vyjadřují počet µmol 4-nitrofenolu, jež bylo lipasou uvolněno ze 4-nitrofenyllaurátu, vztažený na hmotnost nosiče a na množství proteinů v nosiči. *N* = 4.

Při imobilizaci 140 mg lipasy *PfL* bylo využito základního způsobu sol-gelové polymerace (metoda na str. 49) s přidavkem polyvinylalkoholu (relativní molekulová hmotnost ~72000) v poměru proteiny/polyvinylalkohol 1:1,6. Jako katalyzátor sol-gelového procesu byl použit fluorid draselný v poměru 1:60 vůči silanům

a polymerace probíhala za míchání kvůli udržení emulzního systému. Molární poměr tetraalkoxysilanu vůči alkyl/aryltrialkoxysilanu byl 9:1; pokusy o zvýšení podílu alkyl/aryltrialkoxysilanu či zvýšení množství lipasy během polymerace nebyly úspěšné – polymerace pak, zvláště v případě fenyl- a oktyltrialkoxysilanu, neprobíhala do úplnosti.



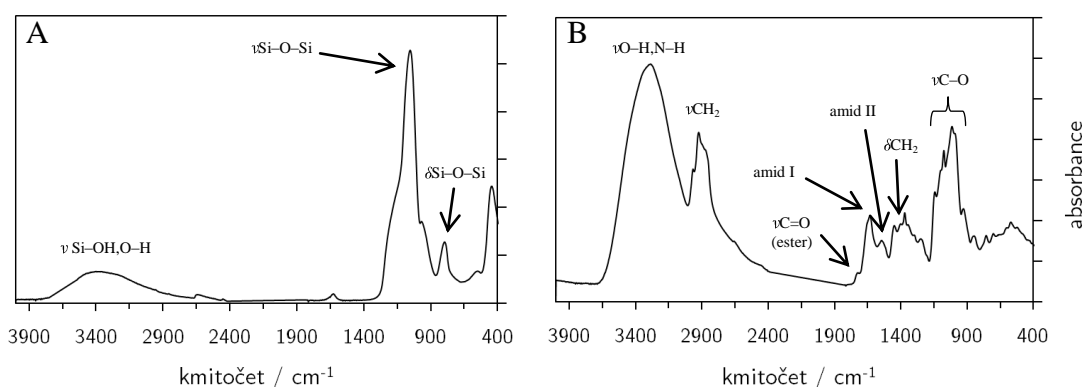
Obr. 27: Mikrofotografie připraveného oktyl-sol-gelu ve srovnání s běžnými adsorbenty (zvětšení 40x).

- A: Enzym *Pfl*@oktyl-SG.
- B: Silikagel 60 (průměr částic cca 0,05 mm).
- C: Křemelina *Celite*® 545.

Enzymy na sol-gelu byly po odpaření rozpouštědla inkubovány v přítomnosti nasyceného roztoku chloridu hořečnatého, čímž získaly konstantní aktivitu vody ~0,33. Při použití 15 mmol silanů v polymerační směsi byl průměrná hmotnost izolovaného imobilizovaného enzymu kolem 900 mg. Z výchozího lyofilizovaného enzymu a silanů se v průběhu procesu získal ve všech případech bílý práškovitý materiál, který vykazoval velmi nízkou hustotu (přesné stanovení nebylo provedeno), zvláště v případě nosiče s oktylovými skupinami. Mikrofotografie enzymu *Pfl*@oktyl-SG získané pod světelným mikroskopem je uvedena na obrázku 27 na str. 67. Je zde patrná velice

jemná a různorodá vnější struktura částic, které mají vesměs podobný průměr jako částice silikagelu 60 (desítky  $\mu\text{m}$ ) a strukturou se podobají spíše částicím křemeliny (tvořená převážně křemičitými schránkami rozsivek), jež byly vzaty jako reference. Zbylé dva nosiče s propylovým a fenylovým substituentem vykazovaly pod mikroskopem podobné charakteristiky.

Souhrnné výsledky z imobilizace lipasy *PfL* pomocí třech různých alkyl/aryltrialkoxysilanů včetně srovnání s volnou lipasou jsou uvedeny v tabulce 3 na str. 66. Imobilizační účinnost, tj. poměr imobilizovaných proteinů ku proteinům vzatým k imobilizaci, byl 71 % v případě propyl-SG a nad 90 % v případě nosičů oktyl- a fenyl-SG. U připravených enzymů byla dále stanovena hydrolytická aktivita (vizte str. 46), která byla nejvyšší v případě *PfL*@oktyl-SG –  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  –, u enzymu *PfL*@fenyl-SG byla stanovena hodnota  $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  a nejnižší aktivitu  $1,4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  vykazala lipasa na nosiči propyl-SG. Aktivity přepočtené na množství proteinů pak vykazovaly podobný trend: nejvyšší aktivita  $2,9 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg proteinů})^{-1}$  byla stanovena u *PfL*@oktyl-SG, o něco nižší  $1,0 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg proteinů})^{-1}$  u *PfL*@fenyl-SG a nejnižší aktivita  $0,46 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg proteinů})^{-1}$  pak u *PfL*@propyl-SG.



Obr. 28: Výsledky analýzy komerčního preparátu lipasy *PfL* a silikagelu 60 pomocí infračervené spektroskopie.<sup>a</sup>

A: IČ spektrum částic silikagelu 60.

B: Spektrum komerčního preparátu *PfL*.

<sup>a</sup> Metoda je uvedena na str. 50.

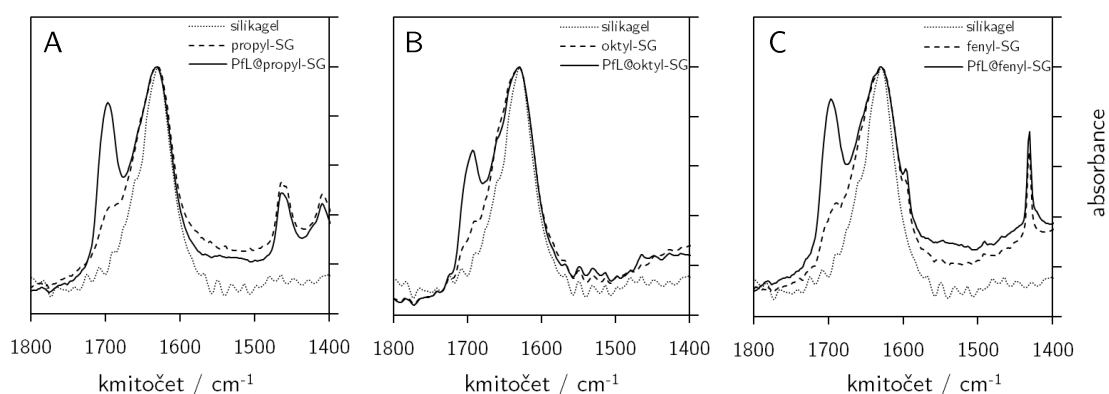
Při porovnání hydrolytických aktivit imobilizátů s hodnotami výchozí lipasy z komerčního preparátu je patrné, že aktivita imobilizovaných enzymů ztlačila zhruba  $300\text{--}2000\times$  vztaženo na hmotnost pevných podílů a cca  $45\text{--}290\times$  vztaženo na množství proteinů.

Připravené ormosilové nosiče byly analyzovány pomocí infračervené spektroskopie (metoda na str. 50) za účelem zjistit, zda se nějakým způsobem odlišují.

Na obrázku 28 na str. 68 jsou uvedena referenční spektra: vlevo jsou data pro silikagel 60 (tedy materiálu strukturně podobného ormosilům) a vpravo pak spektrum získané analýzou prášku komerčního lyofilizátu lipasy *PfL*, který sloužil jako výchozí zdroj enzymu pro imobilizace.

U silikagelu je patrný pás při  $1056\text{ cm}^{-1}$  typický pro valenční vibrace můstkových vazeb Si–O–Si a dále pásy v oblasti  $1000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$  odpovídající deformačním a valenčním vibracím těže vazby. Dále se ve spektru objevuje signál pro adsorbovanou vodu ( $1630\text{ cm}^{-1}$ ) a široký pás kolem  $3400\text{ cm}^{-1}$  příslušející vazbám O–H či Si–OH.

Ve spektru enzymového preparátu je přítomno v oblasti  $1900\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$  několik pásů typických pro peptidovou vazbu, jmenovitě se jedná o pásy amid I při  $1633\text{ cm}^{-1}$  a amid II při  $1547\text{ cm}^{-1}$ , jež odpovídají valenční vibraci vazby C=O a deformační vibraci vazby N–H s příspěvkem valenční vibrace vazby C–N. Pásy v oblasti  $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$  odpovídají vazbě C–O–C. Dále se ve spektru objevuje široký pás kolem  $3286\text{ cm}^{-1}$  překrývající se s pásy odpovídajícími alifatickým skupinám  $\text{CH}_2$  a  $\text{CH}_3$ ; tento pás je typický pro valenční vibrace vazeb O–H a N–H.



Obr. 29: Výsledky analýzy imobilizovaných enzymů pomocí infračervené spektroskopie.<sup>a</sup>

A: Nosič s propylovým zbytkem (propyl-SG, *PfL*@propyl-SG).

B: Oktylem modifikovaný sol-gel (oktyl-SG, *PfL*@oktyl-SG).

C: Nosič s fenylovým substituentem (fenyl-SG, *PfL*@fenyl-SG).

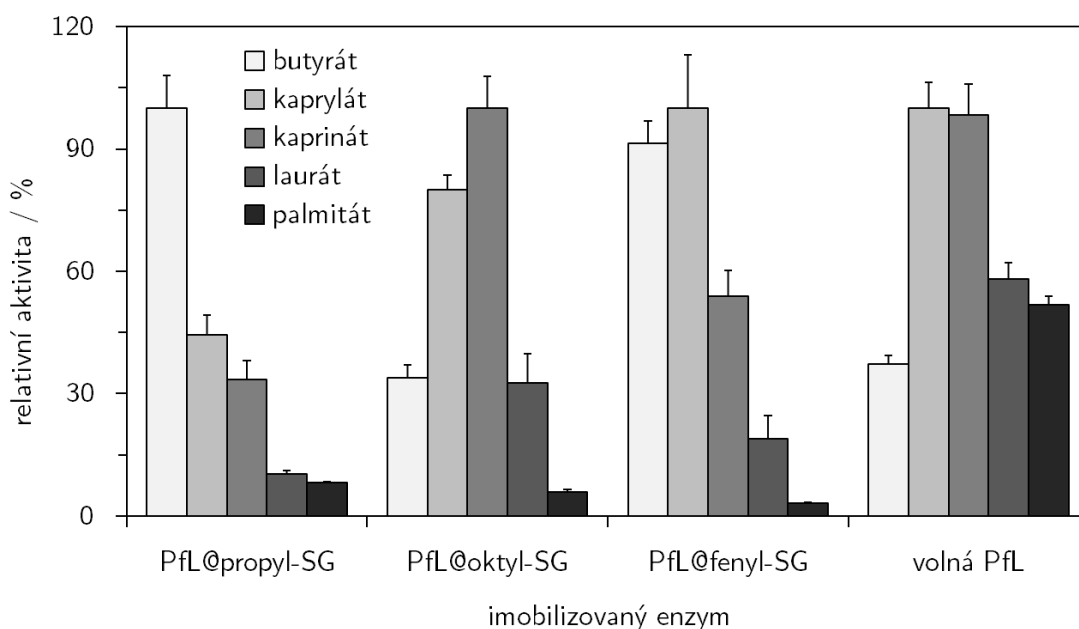
<sup>a</sup> Metoda na str. 50. Jako reference byl použit silikagel 60.

V případě imobilizovaných enzymů (obr. 29 na str. 69) se projevuje pás při  $1697\text{ cm}^{-1}$  (*PfL* na propyl-SG a fenyl-SG) nebo  $1692\text{ cm}^{-1}$  (*PfL*@oktyl-SG) příslušející peptidové vazbě potvrzující přítomnost proteinu v nosiči, jelikož se u referenčních ormosilů bez enzymu nevyskytuje. Mírný posun kmitočtu může být např.

způsobený konformační změnou lipasy v průběhu imobilizace. Ve spektru se oproti silikagelu vyskytují i další pásy, jejich povaha však určena nebyla; zřejmě odpovídají organickým skupinám ormosilu.

### 4.1.3 Charakterizace imobilizovaných enzymů

U připravených enzymů stejně tak jako u volné lipasy Pfl byly stanoveny hydrolytické aktivity na esterech 4-nitrofenolu s různě dlouhým řetězcem (metody na str. 46), konkrétně se jednalo o butyrát (C4), kaprylát (C8), kaprinát (C10), již dříve zmíněný laurát (C12) a palmitát (C16). Kromě 4-nitrofenylbutyrátu jsou všechny ostatní použité substráty málo rozpustné až nerozpustné ve vodě, a tudíž se během hydrolytické reakce nacházely ve formě emulze či suspenze.



Obr. 30: Hydrolytické aktivity imobilizované a volné lipasy Pfl stanovené pro různé 4-nitrofenylestery.<sup>a</sup>

*Podminky* (str. 46): Hydrolýza příslušného 4-nitrofenylesteru byla katalyzována v pufru imobilizovanou/volnou lipasou Pfl. <sup>a</sup> Hodnoty relativní hydrolytické aktivity jsou vztaženy k nejvyšší hodnotě aktivity pro daný enzym v rámci všech použitých 4-nitrofenylesterů (= 100 %). *N* = 4.

Výsledky stanovení aktivit jsou uvedeny na obrázku 30 na str. 70; nejvyšší hodnotě aktivity pro daný enzym bylo přiřazeno 100 % a ostatní pak byly vztaženy na tuto. Z obrázku vyplývá, že nejvíce se volnému enzymu profilem aktivit podobá lipasa Pfl@oktyl-SG – oba vykazují preferenci pro středně dlouhé acyly C8 a C10, přičemž kratší a delší substráty jsou hydrolyzovány pomaleji. Pro enzym Pfl@propyl-SG byl

jako nejrychleji hydrolyzovaný substrát zjištěn nejkratší 4-nitrofenylbutyrát; u tohoto enzymu je navíc nápadný strmý pokles aktivity s rostoucí délkou řetězce acylu. V případě *PfL*@fenyl-SG byly podobně rychle hydrolyzovány 4-nitrofenylbutyrát i -kaprylát a teprve poté následoval s delšími acyly pokles aktivity.

Pro všechny tři imobilizované enzymy platí, že hodnoty aktivit při hydrolyze 4-nitrofenyllaurátu a zvláště pak 4-nitrofenylpalmitátu jsou znatelně nižší než je tomu u volné lipasy.

Při dalším studiu vlastností imobilizované lipasy byla pozornost zaměřena na její stabilitu v závislosti na pH (odstavce na str. 44 a 47). Jako modelový systém byla vybrána inkubace v tříložkovém univerzálním pufru v rozmezí pH 3–11 po dobu 5 hod spojená s převodem enzymu do původního suchého stavu a následným stanovením hydrolytické aktivity. V případě volné lipasy tento převod nebyl možný, proto byla aktivita stanovena již z inkubačního roztoku. U referenčních inkubací 0 hod se sledoval vliv sušicího kroku, resp. složek pufru, na hydrolytickou aktivitu enzymu.

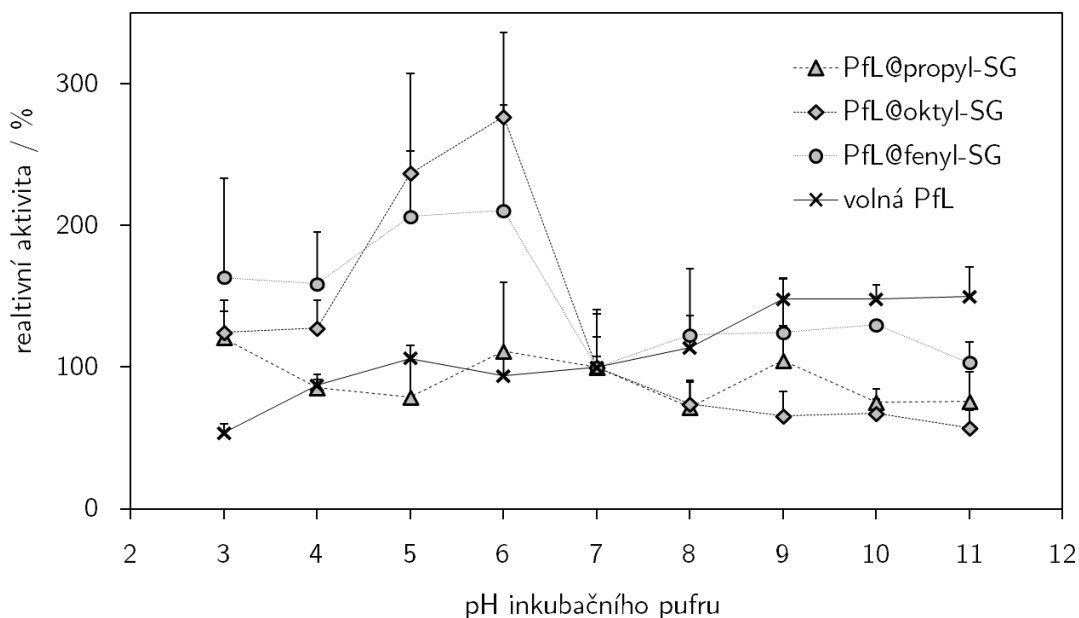
Tab. 4: Stabilita imobilizované a volné lipasy po inkubaci v pufru o pH 7.

nosič	specifická hydrolytická aktivita		podíl <sup>a</sup>
	μmol.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup>		
	0 hod	5 hod	%
propyl-SG	0,81 ± 0,24	1,2 ± 0,5	150
oktyl-SG	3,0 ± 0,7	2,4 ± 0,9	81
fenyl-SG	0,41 ± 0,09	0,47 ± 0,10	120
komerční preparát	4590 ± 320	3490 ± 270	76

*Podmínky* (metoda na str. 44 a 47): Lipasa byla inkubována v pufru o daném pH po dobu 0 a 5 hod; bylo provedeno stanovení hydrolytické aktivity (4-nitrofenyllaurát). <sup>a</sup> Hodnoty vyjadřují podíl hydrolytické aktivity daného enzymu po 5hod inkubaci vůči referenční hodnotě (inkubace 0 hod) při pH 7 (= 100 %). *N* = 4.

Výsledky v tabulce 4 na str. 71 ukazují, že v případě enzymů *PfL*@propyl-SG a *PfL*@fenyl-SG měla 5hod inkubace v pufru spíše pozitivní vliv (hodnoty stouply na 150 a 120 %), u lipasy *PfL*@oktyl-SG naopak došlo k mírnému poklesu na 81 %. Hydrolytická aktivita volné lipasy poklesla během pětihodinové inkubace v neutrálním pufru o 24 % na hodnotu 3490 μmol.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>. Tato aktivita je však stále vyšší než aktivita preparátu stanovená ve fosfátovém pufru (ta činí 2900 μmol.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>).

Na obrázku 31 je zachycen průběh stability imobilizované lipasy a volné lipasy *PfL* při inkubaci v pufrách o různém pH. Hodnotám hydrolytické aktivity získaným po inkubaci enzymů při pH 7 (tab. 4 na str. 71) bylo přiděleno 100 %, hodnoty ostatních inkubací jsou potom vztaheny právě na ně.



Obr. 31: Stabilita imobilizované a volné lipasy *PfL* po 5hod inkubaci v pufru o různém pH.<sup>a</sup>

*Podmínky* (odstavce na str. 44 a 47): Vizte u tab. 4. <sup>a</sup> Hodnoty relativní aktivity jsou uvedeny procentuálně vztahením k aktivitě daného enzymu po 5hod inkubaci při pH 7 (= 100 %). *N* = 4.

Z obrázku je patrné, že lipasa *PfL* imobilizovaná do sol-gelu pomocí třech různých monomerů má trochu pozměněné vlastnosti. Hydrolytická aktivita enzymů *PfL*@propyl-SG a volné lipasy nevykázaly žádné výrazné maximum, u volné lipasy se s rostoucím pH hodnoty pozvolna zvyšovaly – nejnižší aktivita 54 % byla po inkubaci při pH 3 a nejvyšší aktivita 150 % po inkubaci při pH 11. U enzymu *PfL*@propyl-SG se neprojevil stoupající ani klesající trend; nejnižší aktivity byly zjištěny po inkubaci při pH 8 a 11, a to 71 % a 76 %, a nejvyšší hodnota 120 % potom po inkubaci při pH 3 – tedy je tomu naopak než u volné lipasy. Enzymy *PfL*@oktyl-SG a *PfL*@fenyl-SG naproti tomu projevily mnohem vyšší nárůst aktivity po inkubaci při pH 5 a 6, konkrétně 240 a 280 % pro *PfL*@oktyl-SG a 210 % pro enzym *PfL*@fenyl-SG, a v zásadité oblasti měly spíše stagnující trend. U obou zmíněných enzymů byla nejnižší aktivita stanovena po inkubaci při pH 11, a to 57 % pro enzym *PfL*@oktyl-SG a 100 % pro *PfL*@fenyl-SG.



Při porovnání dat z tabulky 4 na str. 71 a grafu z obr. 31 na str. 72 je možné konstatovat, že oproti referenční inkubaci 0 hod došlo v případě lipasy *PfL@oktyl-SG* po inkubaci při pH 5 a 6 k aktivaci na přibližně dvojnásobné hodnoty hydrolytické aktivity; v zásadité oblasti pak byly aktivity nižší než u reference. Lipasa *PfL@fenyl-SG* také zvýšila aktivitu po inkubaci při pH 5 a 6 na hodnotu cca 2,5× vyšší než u reference, přičemž průběh hydrolytické aktivity v zásadité oblasti byl jen mírně vyšší, než tomu bylo u referenční inkubace. Pro lipasu *PfL@propyl-SG* nebyl pozorován žádný výrazný trend. U volné *PfL* došlo v zásadité oblasti k mírné aktivaci – ostatní hodnoty jsou nižší než u reference.

Tab. 5: Stabilita imobilizované a volné lipasy po inkubaci v isooktanu při teplotě 25 °C.

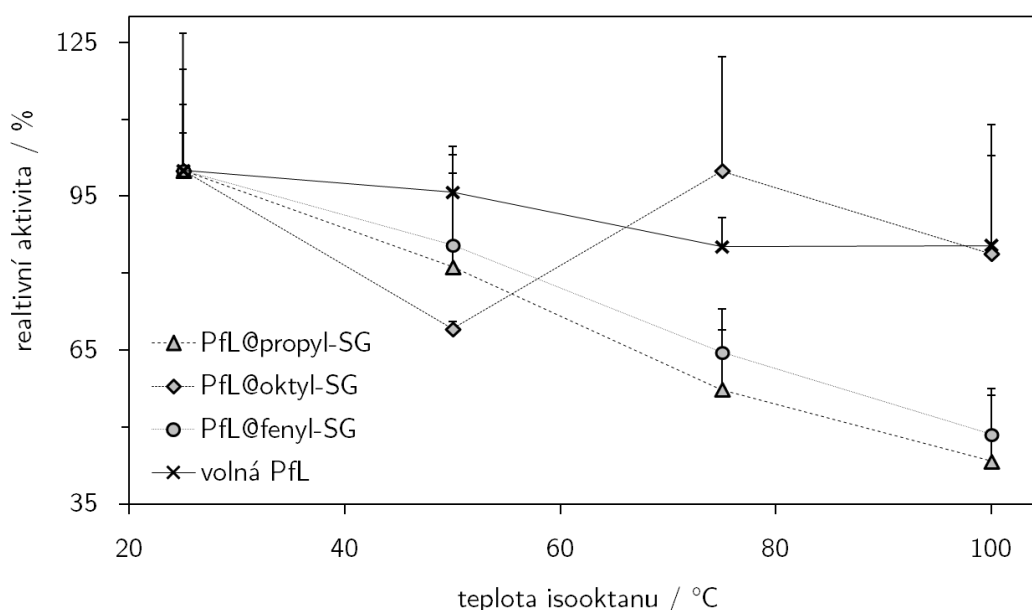
nosič	specifická hydrolytická aktivita		podíl <sup>a</sup>
	μmol.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup>		%
	0 hod	5 hod	
propyl-SG	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,4	160
oktyl-SG	11 ± 3	15 ± 3	140
fenyl-SG	2,7 ± 0,4	2,5 ± 0,3	93
komerční preparát	3210 ± 190	3290 ± 240	100

*Podmínky* (str. 45 a 47): Lipasa byla inkubována v isooktanu při dané teplotě po dobu 0 a 5 hod; pak bylo provedeno stanovení hydrolytické aktivity na substrát 4-nitrofenyllaurát. <sup>a</sup> Hodnoty odpovídají podílu hydrolytické aktivity daného enzymu po 5hod inkubaci vůči referenční hodnotě (0 hod) při teplotě 25 °C (= 100 %). *N* = 4.

Dále byla studována stabilita lipas v závislosti na teplotě (metody na str. 45 a 47). Pro tento účel byla vybrána inkubace enzymu při teplotách 25, 50, 75 a 100 °C 5 hod v prostředí isooktanu, opět s převedením do suchého stavu (tentokrát proveditelné i u volné lipasy *PfL*). Inkubací v aprotickém isooktanu se při značných změnách teploty eliminoval vliv změny pH ve vodném inkubačním médiu. U referenčních inkubací 0 hod se zkoumal vliv isooktanu a samotného sušicího kroku na hydrolytickou aktivitu enzymu.

Výsledky uvedené v tabulce 5 na str. 73 ukazují, že oproti referenci se aktivity v případě lipas *PfL@propyl-SG* a *PfL@oktyl-SG* mírně zvýšily po inkubaci při teplotě 25 °C na hodnoty 160 a 140 %. Enzym *PfL@fenyl-SG* vykázal nepatrný pokles hodnoty aktivity (93 %). Hydrolytická aktivita volné lipasy se během 5hod inkubace v isooktanu téměř nezměnila; její hodnota je stejně jako v případě inkubace v pufru

o pH 7 o něco vyšší než hodnota stanovená u výchozího komerčního preparátu ( $\sim 3250$  versus  $2900 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ).



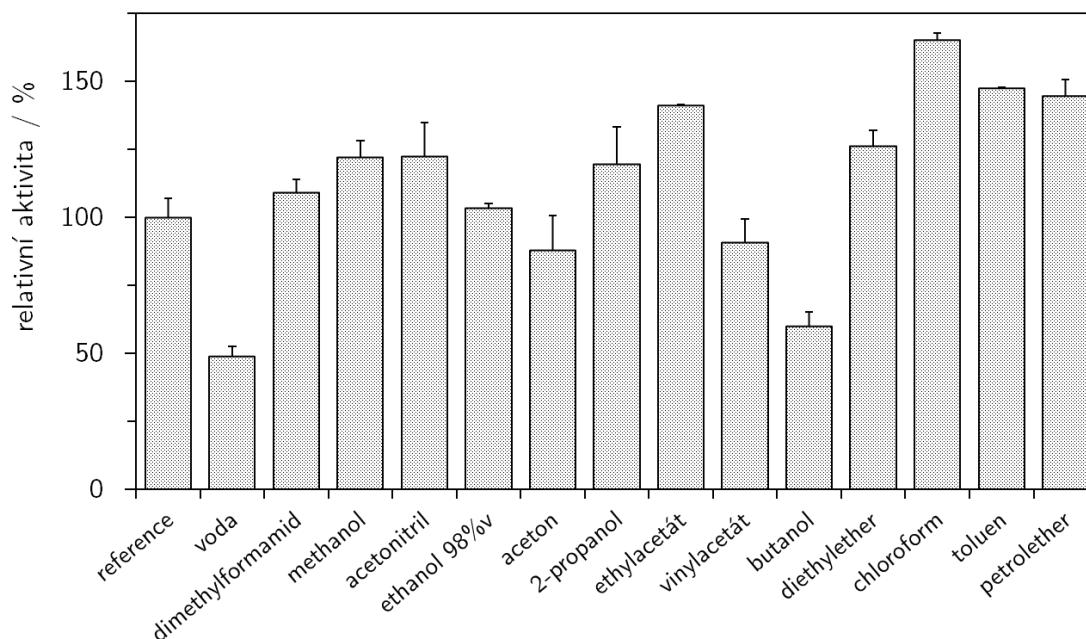
Obr. 32: Stabilita imobilizované a volné lipasy *Pfl* po 5hod inkubaci v isooktanu při různé teplotě.<sup>a</sup>

*Podmínky* (na str. 45 a 47): Vizte u tab. 5. <sup>a</sup> Hodnoty relativní aktivity jsou vyjádřeny procentuálně vztahením k aktivitě daného enzymu po 5hod inkubaci při teplotě 25 °C (= 100 %).  $N = 4$ .

Obrázek 32 ukazuje na průběh stability studovaných enzymů během inkubace v isooktanu při různé teplotě. Hodnoty hydrolytické aktivity stanovené po inkubaci enzymů v isooktanu při teplotě 25 °C (tab. 5 na str. 73) byly definovány jako 100 % a hodnoty získané při inkubacích za vyšších teplot jsou vztaheny na tyto.

Na obrázku je viditelný téměř lineární pokles aktivit se zvyšující se teplotou pro enzymy *Pfl*@propyl-SG a *Pfl*@fenyl-SG až na hodnoty 43 a 49 % oproti hodnotě po inkubaci při teplotě 25 °C. Naproti tomu volná lipasa *Pfl* vykázala pozvolnější pokles aktivity na stabilní hodnotu 85 % při teplotě 75 a 100 °C. Trochu odlišnější průběh je patrný u lipasy *Pfl*@oktyl-SG, u níž po poklesu aktivity po inkubaci při teplotě 50 °C na hodnotu 69 % následoval znovu její nárůst až na hodnoty kolem 85–100 % při teplotě 75 a 100 °C.

Porovnáním hodnot z tabulky 5 na str. 73 a grafu z obr. 32 na str. 74 je možné dojít k závěru, že s výjimkou enzymu *Pfl*@oktyl-SG při teplotách 75 a 100 °C došlo po 5hod inkubaci u všech ostatních enzymů se zvyšující se teplotou postupně k poklesu aktivity na hodnoty nižší než u referenční inkubace 0 hod při teplotě 25 °C.



Obr. 33: Stabilita lipasy *Pfl*@propyl-SG v různých rozpouštědlech. <sup>a</sup>

*Podmínky* (vizte str. 48): Lipasa *Pfl*@propyl-SG byla inkubována 20 hod v příslušném rozpouštědle. Poté byla stanovena hydrolytická aktivita (4-nitrofenylkaprinát). <sup>a</sup> Hodnoty relativní aktivity jsou vztaženy k hodnotě pro referenční enzym inkubovaný bez přítomnosti rozpouštědla (= 100 %). Rozpouštědla jsou řazena podle hodnoty rozdělovacího koeficientu  $\log P$ .  $N = 3$ .

V poslední části charakterizace enzymů byla zkoumána stabilita ve čtrnácti rozpouštědlech, a to s enzymem *Pfl*@propyl-SG (metoda na str. 48). Řečená lipasa byla inkubována za míchání po dobu 20 hod v příslušném rozpouštědle (*polární protická*: aceton, butanol, ethanol 98%v, methanol, 2-propanol, voda, *polární aprotická*: acetonitril, dimethylformamid, ethylacetát, vinylacetát, diethylether, *nepolární*: chloroform, petrolether, toluen), poté byla převedena do suchého stavu a následně stanovena její hydrolytická aktivita. Jako reference sloužil enzym inkubovaný bez rozpouštědla, jehož aktivitě bylo přiřazeno 100 %.

Výsledky shrnuté na obr. 33 na str. 75 ukazují, že ve většině případů došlo ke zvýšení hydrolytické aktivity enzymu oproti referenci, pouze ve 4 případech ze 14 došlo k jejímu snížení. Rozpouštědly působícími snížení aktivity po inkubaci v nich byla voda, butanol, aceton a vinylacetát s příslušnými relativními hodnotami 49, 60, 88 a 91 %. Vysoká aktivita odpovídající 170 % byla zjištěna u lipasy inkubované v chloroformu, podobně tomu bylo také po inkubaci v toluenu, petroletheru a ethylacetátu s hodnotami 150, 150 a 140 %. Inkubace v ethanolu 98%v příliš hydrolytickou aktivitu nepozměnila (hodnota 100 %).

Na základě provedených inkubačních pokusů lze říct, že inkubace lipasy v polárních protických rozpouštědlech má slabě pozitivní nebo negativní efekt na její hydrolytickou aktivitu. Naopak rozpouštědla polární aprotická a nepolární s vyšší hodnotou rozdělovacího koeficientu (tab. 1 na str. 15) působí na enzym spíše aktivačně.

Co se týče dlouhodobé stability imobilizovaných enzymů, v průběhu 10 měsíčního skladování při 4 °C nebyl zjištěn žádný signifikantní úbytek hydrolytické aktivity. Stejně tak si svoji počáteční aktivitu ponechala i lipasa v komerčním preparátu.

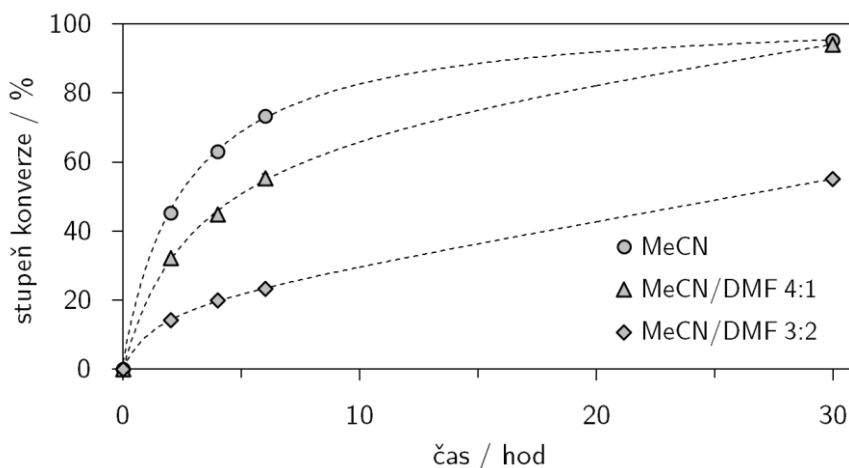
## 4.2 Výsledky biotransformačních reakcí

V následující kapitole jsou uvedeny výsledky týkající se charakterizace katalytických vlastností připravených imobilizovaných lipas v organickém prostředí, které by měly doplnit předcházející výsledky získané pomocí studia hydrolytických reakcí v prostředí vodném. Esterifikační experimenty byly soustředěny na dva modelové vlastnostmi značně odlišné alkoholové substráty: velmi polární diol 9-(2',3'-dihydroxypropyl)adenin **1** (DHPA) a nepolární jednosytný alkohol 2-fenylpropanol **2** (triviálně zvaný hydratropylalkohol). Oba alkoholy ve své struktuře nesou jedno centrum chiraloty, jedním z cílů práce bylo tedy také pomocí lipasové katalýzy obohatit produkt o jeden z enantiomerů.

Jako enzym, se kterým byla prováděna většina pokusů, byl vybrán *PfL@oktyl-SG* pro svou vyšší aktivitu v rámci hydrolytických reakcí.

### 4.2.1 Acylace 9-(2',3'-dihydroxypropyl)adeninu

V jednom z prvních pokusů bylo provedeno kinetické měření acetylace DHPA **1** pomocí enzymu *PfL@oktyl-SG* (metoda na str. 50); výsledky jsou uvedeny na obr. 34 na str. 77 v podobě závislosti stupně konverze na čase. Cílem pokusu bylo zjistit, jak ovlivňuje přítomnost dimethylformamidu, který byl dosud pro tyto reakce hlavním používaným rozpouštědlem, esterifikační aktivitu lipasy. Jako „inertní“ rozpouštědlo byl vybrán acetonitril, protože je v něm výchozí látka **1** rozpustná, i když na mnohem nižší úrovni než je tomu u dimethylformamidu (<1mM), a je tedy možné přímé dávkování na TLC. Pro účely experimentu byl použit čistý acetonitril a dvě směsi acetonitril/dimethylformamid 4:1 a 3:2; stupeň konverze byl sledován průběžně pomocí TLC až do 30 hod od zahájení reakce.

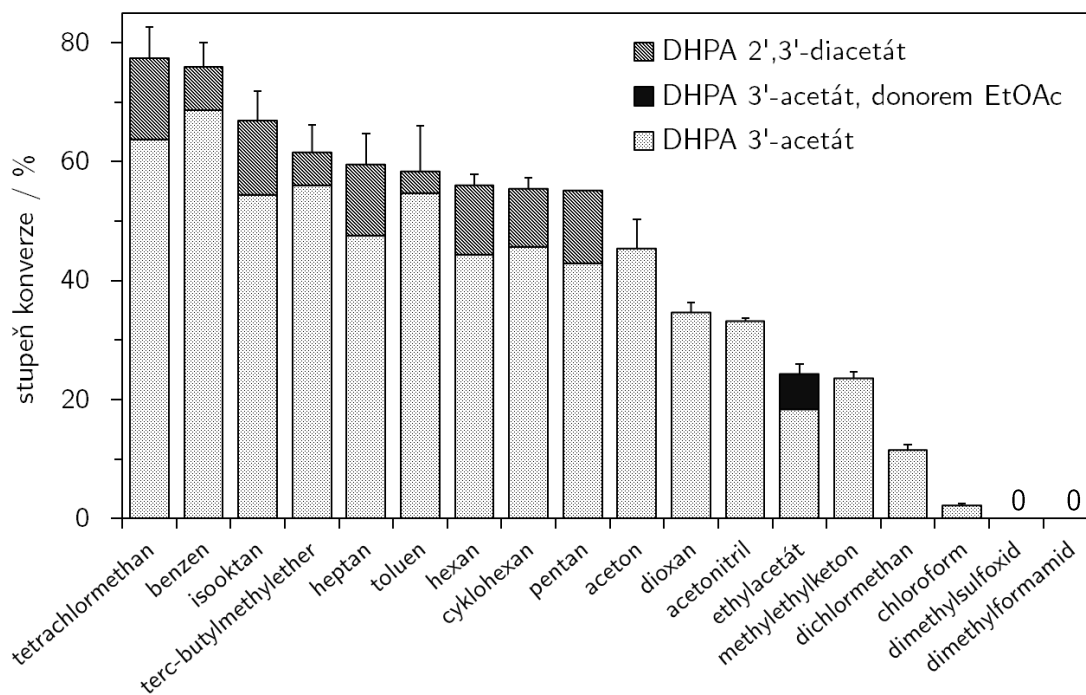


Obr. 34: Kinetický průběh acetylace DHPA **1** ve směsi acetonitrilu a dimethylformamidu. <sup>a</sup>

*Podmínky* (str. 50): Reakce DHPA **1** s vinylacetátem ve směsi MeCN/DMF v příslušném poměru byla katalyzovaná lipasou *PfL*@oktyl-SG; stupeň konverze byl stanoven v časových intervalech pomocí TLC. <sup>a</sup> Hodnoty stupně konverze vyjadřují procento výchozí látky, jež bylo lipasou přeměněno na její 3'-acetát **3a**.  $N = 2$ .

Jak je z grafického znázornění patrné, se zvyšujícím se podílem dimethylformamidu v reakční směsi se počáteční rychlost reakce oproti čistému acetonitrilu snižovala, konkrétně klesla o 36 % v případě poměru MeCN/DMF 4:1 a následně o dalších 25 % při dalším zdvojnásobení koncentrace dimethylformamidu na poměr 3:2. Po 30 hod se stupeň konverze reakce v acetonitrilu a ve směsi acetonitril/dimethylformamid 4:1 blížil 96 %, zatímco reakce ve směsi acetonitril/dimethylformamid 3:2 by zřejmě vyžadovala delší čas (stupeň konverze 55 %). Na obr. 35 na str. 78 je pak potvrzeno, že v čistém dimethylformamidu reakce za použitých podmínek neprobíhá.

Následně byl s diolem **1** proveden screening (popis na str. 51) za cílem zjistit, zda existují kromě acetonitrilu, který se v předchozím případě ukázal být mnohem vhodnější alternativou k dimethylformamidu, i jiná rozpouštědla, v nichž reakce probíhá rychleji.



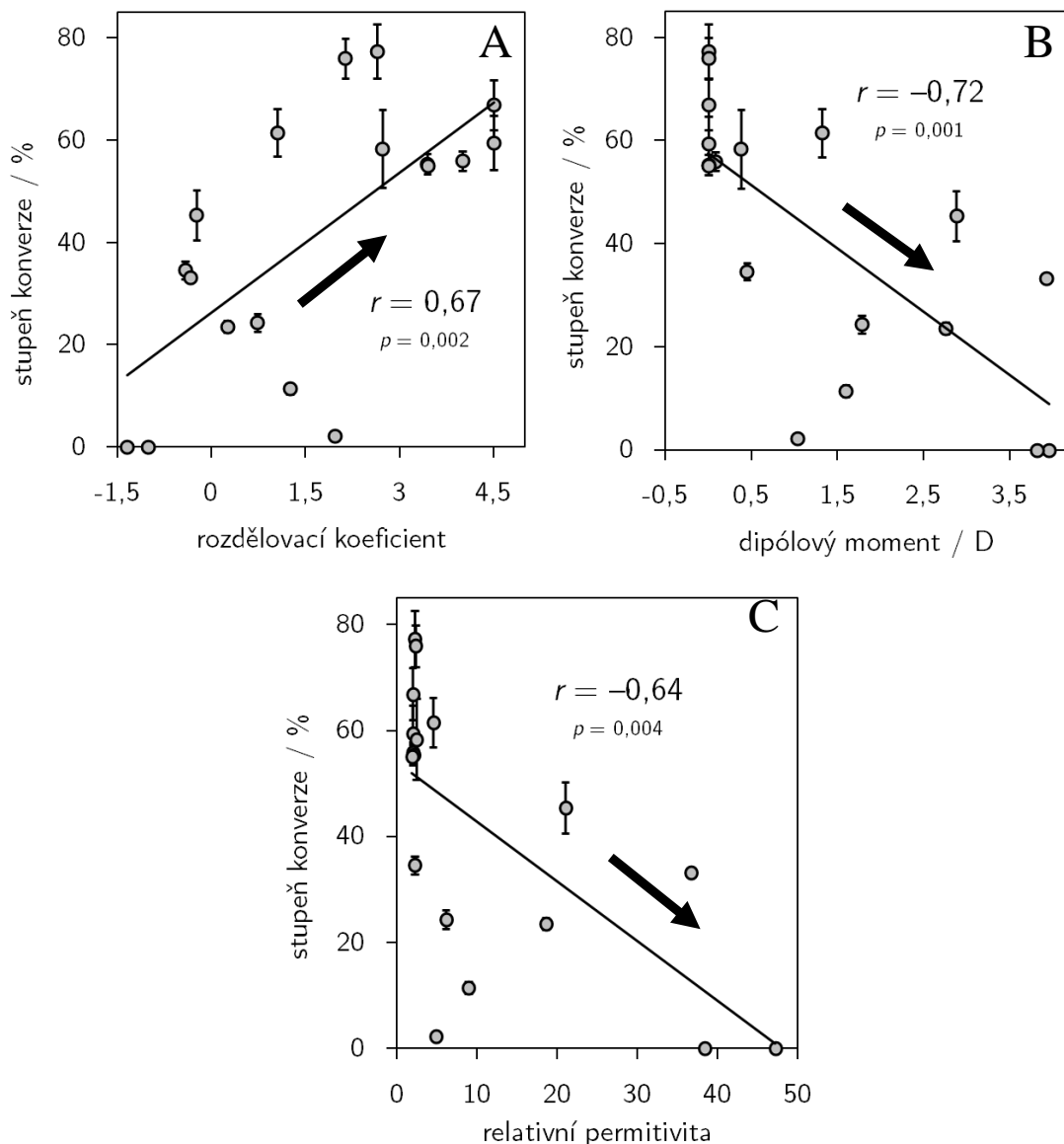
Obr. 35: Acetylace DHPA **1** v různých organických rozpouštědlech. <sup>a</sup>

*Podmínky* (na str. 51): Reakce diolu **1** s vinylacetátem v příslušném rozpouštědle byla katalyzovaná lipasou *PfL@oktyl-SG*; stupeň konverze byl stanovena po 24 hod pomocí TLC. <sup>a</sup> Hodnoty stupně konverze vyjadřují procento výchozí látky, jež bylo lipasou přeměněno na 3'-acetát **3a** a 2',3'-diacetát **4a**. U rozpouštědel DMF a DMSO nebyly produkty pozorovány. *N* = 3.

Pro hodnocení vlivu jednotlivých rozpouštědel byla znovu vybrána acetylační reakce. Bylo vyzkoušeno celkem 18 rozpouštědel pokrývajících svými vlastnostmi široké rozmezí funkčních skupin a hodnot relativních permitivit, dipólových momentů a rozdělovacích koeficientů (tab. 1 na str. 15); jednalo se o tyto látky: aceton, acetonitril, benzen, cyklohexan, dichlormethan, dimethylformamid, dimethylsulfoxid, dioxan, ethylacetát, heptan, hexan, chloroform, isooktan, methylethylketon, pentan, *terc*-butylmethylether, tetrachlormethan a toluen.

Výsledky hledání vhodných rozpouštědel pro esterifikaci DHPA **1** jsou na obr. 35. Graf obsahuje informaci o stupni konverze výchozí látky v závislosti na použitém rozpouštědle. Během reakcí byl pozorován jako hlavní produkt příslušný 3'-acetát **3a**, při vyšších stupních konverze (>50 %) se ve všech případech objevil i 2',3'-diester **4a**.

U velmi polárních rozpouštědel dimethylformamidu a dimethylsulfoxidu nebyly detekovány žádné esterifikační produkty. Stupeň konverze byl také poměrně nízký v případě halogenovaných rozpouštědel chloroformu a dichlormethanu (2 a 11 %),



Obr. 36: Stupeň konverze DHPA **1** při acetylaci v závislosti na vlastnostech rozpouštědla. <sup>a</sup>

A: Výnos stupně konverze proti dipólovému momentu ( $\mu$ ) rozpouštědla.

B: Výnos stupně konverze proti relativní permitivitě ( $\epsilon_r$ ) rozpouštědla.

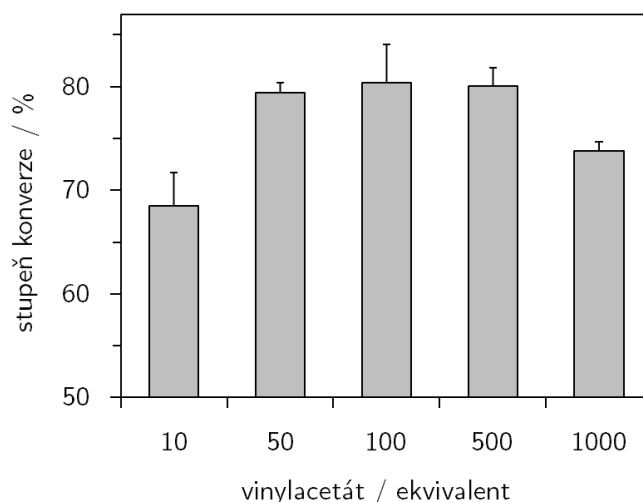
C: Výnos stupně konverze proti rozdělovacímu koeficientu ( $\log P$ ) rozpouštědla.

<sup>a</sup> Data rozpouštědel z tab. 1 na str. 15. Hodnoty stupně konverze vyjadřují procento výchozí látky, jež bylo lipasou přeměněno na 3'-acetát **3a** a 2',3'-diacetát **4a**.  $N = 3$ .

naproti tomu u jím příbuzného tetrachlormethanu byl zaznamenán stupeň konverze vůbec nejvyšší – 77 %. Při použití ketonů proběhla konverze téměř dvakrát rychleji v acetonu (45 %) než v ethylmethylketonu (24 %). Aceton byl také rozpouštědlem, při jehož použití bylo získáno nejvyšší množství jediného produktu, tj. 3'-acetátu DHPA **3a**.

Z aromatických rozpouštědel se ukázal jako vhodnější benzen, v němž byl dosažen stupeň konverze 76 %; u toluenu pak byla tato hodnota 58 %. Pro acetonitril a dioxan bylo získáno přibližně stejné množství produktu (35 %), další etherové rozpouštědlo *tert*-butylmethylether umožnilo konverzi až do stupně 62 %. V uhlovodících (pentan, hexan, cyklohexan, heptan) bylo převedeno na produkty shodně 55–60 % výchozí látky, jen v případě isooktanu byl stupeň konverze o něco vyšší (67 %).

Pro ethylacetát, jenž je sám potenciálním donorem acylu pro esterifikaci, byla během referenční enzymové reakce provedené bez přítomnosti vinylacetátu zjištěna konverze na 3'-acetát **3a** na úrovni 6 %. S vinylacetátem tato hodnota stoupla na 24 %.



Obr. 37: Vliv množství vinylacetátu na stupeň konverze při acetylaci diolu **1**.<sup>a</sup>

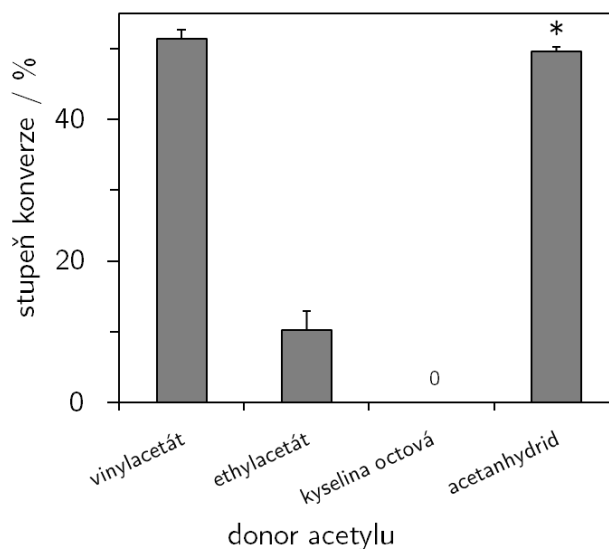
*Podmínky* (na str. 51): Reakce DHPA **1** s vinylacetátem v různém poměru byla katalyzovaná v acetonitrilu lipasou *PfL*@oktyl-SG; stupeň konverze byl stanoven po 55 hod pomocí TLC. <sup>a</sup> Hodnoty stupně konverze vyjadřují procento výchozí látky, jež bylo lipasou přeměněno na 3'-acetát **3a**. *N* = 3.

Obecně lze říci, že nepolární rozpouštědla podpořila acetylaci DHPA, která v nich probíhala v menší míře až do druhého stupně. V polárnějších rozpouštědlech byly dosažené hodnoty stupně konverze nižší bez přítomnosti diesterového produktu. Toto pozorování je podpořeno na obr. 36 na str. 79 výnosy stupně konverze v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech daného rozpouštědla, konkrétně byly studovány veličiny dipólový moment, relativní permitivita a rozdělovací koeficient oktanol/voda. Pro dipólový moment a relativní permitivitu byl zjištěn záporný trend ( $r = -0,72$  a  $-0,64$ ), naopak hodnoty stupně konverze byly ve většině případů vyšší při použití rozpouštědel s vyšší hodnotou rozdělovacího koeficientu ( $r = 0,67$ ; ve všech předchozích případech  $p < 0,005$ ).



Následně byl studován vliv poměru výchozí látka/vinylester při acetylaci DHPA **1** (metoda na str. 51); výsledky jsou uvedeny na obr. 37 na str. 80. Cílem bylo zjistit optimální množství vinylesteru pro danou acylaci tak, aby reakce probíhala ještě dostatečně rychle, ale zároveň se příliš nezvyšovala spotřeba materiálu ze strany donoru acylu. Pro experiment byly vybrány hodnoty 10, 50, 100, 500 a 1000 molárních ekvivalentů vinylacetátu vůči výchozí látce. Reakce probíhala v acetonitrilu za míchání po dobu 55 hod a stupeň konverze byl stanoven pomocí TLC.

Graf ukazuje, že stupeň konverze se zvýšil z hodnoty 69 % při použití 10 ekvivalentů vinylacetátu na přibližně konstantní úroveň 80 % pro 50, 100 a 500 ekvivalentů vinylacetátu. Teprve při použití 1000 ekvivalentů vinylesteru došlo k poklesu stupně konverze na hodnotu 74 %.



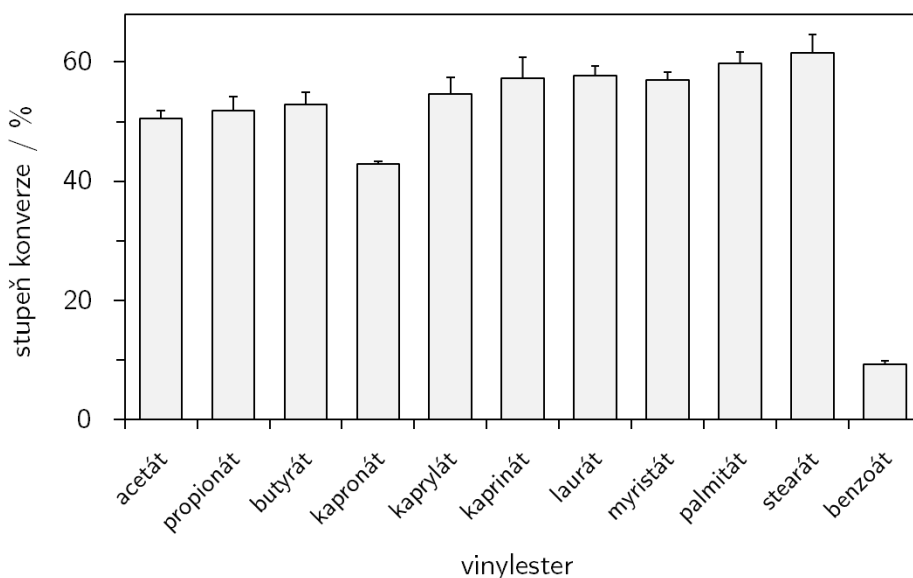
Obr. 38: Vliv donoru acylu na stupeň konverze při acetylaci DHPA **1**.<sup>a</sup>

*Podmínky* (vizte str. 51): Diol **1** reagoval s příslušným donorem acetylu v acetonitrilu za katalýzy lipasou Pfl@oktyl-SG. Stupeň konverze stanoven po 30 hod pomocí TLC. <sup>a</sup> Hodnoty vyjadřují procento výchozí látky, jež bylo lipasou přeměněno na produkty. V případě vinylacetátu byl deteková pouze 3'-acetát **3a**, v případě ethylacetátu a acetanhydridu byl detekován i 2',3'-diacetát **4a** a u acetanhydridu také možný N-acetyl DHPA (látka odpovídající polaritou při TLC). \* Acetylační produkty (19 %) detekovány i v nepřítomnosti enzymu. *N* = 3.

V předchozích případech byl jako acylační činidlo vždy použit vinylacetát. Byly však také provedeny pokusy o acylaci DHPA **1** méně či více reaktivními acetylačními činidly (metoda na str. 51). Pro tento pokus byly vybrány kyselina octová (karboxylová kyselina), acetanhydrid (anhydrid), ethylacetát a vinylacetát (estery) v 50násobném

molárním nadbytku oproti diolu **1**. Acetylace byly provedeny acetonitrilu za míchání a po 30 hod byl v reakčních směsích stanoven stupeň konverze pomocí TLC.

Výsledky jsou uvedeny v grafu na obr. 38 na str. 81 a zachycují stupeň konverze výchozí látky v závislosti na použitém acetylačním činidle. V případě kyseliny octové nebyl na TLC desce detekován žádný produkt. V případě vinylacetátu činil stupeň konverze 51 % a představoval jeden produkt 3'-acetát **3a**. Ethylacetát poskytl stupeň konverze pouze 10 % s malým množstvím 2',3'-diacetátu **4a**; u acetanhydridu bylo konvertováno celkem 50 % diolu za vzniku 3'-acetátu **3a** s nepatrným množstvím 2',3'-diacetátu **4a** a stopami potenciálního *N*-acetyl derivátu (odpovídající polarita látky při TLC). V případě acetanhydridu byl acetylační produkt **3a** rovněž detekován v rámci referenční reakce bez enzymu, a to na úrovni 19 %.

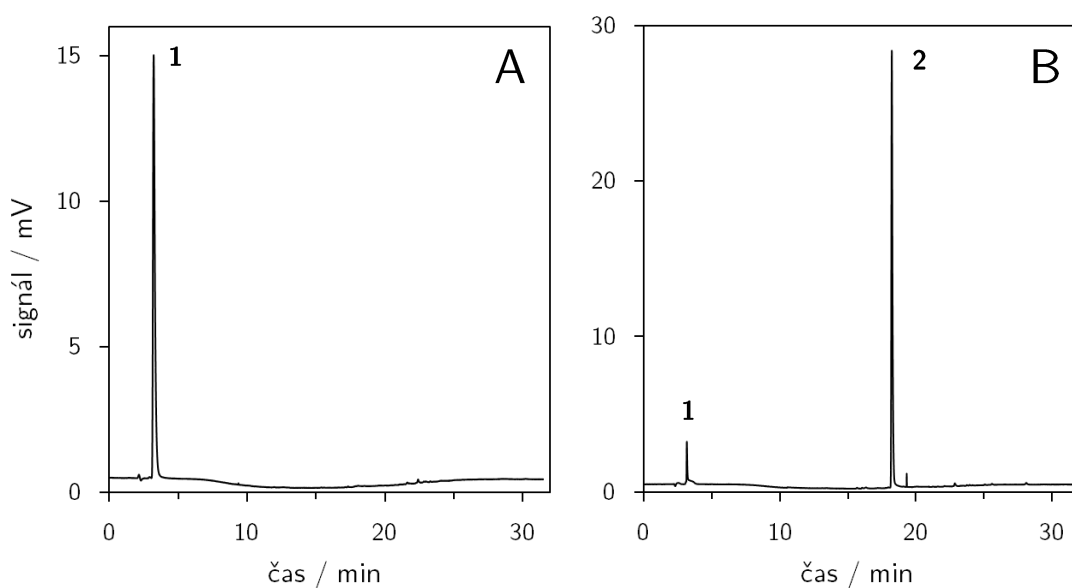


Obr. 39: Vliv délky řetězce vinylesteru na stupeň konverze při acylaci DHPA **1**.<sup>a</sup>

*Podmínky* (str. 52): Reakce diolu DHPA **1** s příslušným vinylesterem v acetonitrilu byla katalyzována lipasou *PfL*@oktyl-SG; stupeň konverze byl ve směsi stanoven po 30 hod pomocí TLC. <sup>a</sup> Hodnoty stupně konverze vyjadřují procento výchozí látky, jež bylo lipasou přeměněno na příslušný 3'-ester. *N* = 3.

Další experiment byl zaměřen na zjištění, zda imobilizovaná lipasa *PfL* má podobně jako v případě hydrolytické reakce (obr. 30 na str. 70) při esterifikační reakci rozdílnou preferenci pro různě dlouhé vinylestery. Jako substráty pro reakci v acetonitrilu byly vybrány lineární estery vinylacetát (C2), -propionát, -butyrát, -kapronát, -kaprylát, -kaprinát, -laurát, -myristát, -palmitát a -stearát (C18) a jediný aromatický zástupce vinylbenzoát (popis metody na str. 52).

Výsledky tohoto šetření jsou znázorněny na obr. 39 na str. 82. Hodnoty udávají stupeň konverze výchozí látky DHPA **1** na příslušný 3'-ester za dobu 30 hod. V homologické řadě nevětvených vinylesterů acetát až stearát je patrný mírný lineární nárůst stupně konverze od hodnoty 51 % pro acetylaci k hodnotě 62 % pro stearoylaci; výjimkou je reakce látky **1** s vinylkapronátem, která poskytla produkt na úrovni 43 % (může být způsobeno chybou ve výpočtu během přípravy reakční směsi). Vůbec nejnižší hodnota stupně konverze byla pozorována během benzoylační reakce, stejně jako tomu bylo v případě acylací 2-fenylpropanolu **2** (vizte dále).



Obr. 40: Příklad separace složek reakční směsi pomocí HPLC během acylace DHPA **1**.<sup>a</sup>

A: Standard DHPA **1**.

B: Odběr reakční směsi s vinylkaprinátem po 30 hod.

*Podmínky* (str. 52 a 58): Vizte pod obr. 39 na str. 82. <sup>a</sup> **1** DHPA **1**. **2** DHPA 3'-kaprinát.

V rámci tohoto pokusu bylo zjištěno, že v případě některých esterů DHPA **1** nelze v použitém rozpouštědle zároveň zajistit rozpustnost výchozí látky a produktů; sama výchozí látka má přitom ve většině organických rozpouštědel rozpustnost zanedbatelnou. Produkty palmitoylace a stearylace DHPA **1** se v průběhu reakce vysrážely na hladině acetonitrilu (při nižší teplotě by k tomuto nejspíše došlo i v případě myristátu). Z toho důvodu bylo nutné příslušné reakční směsi nejprve ředit vhodným rozpouštědlem, v tomto případě dichlormethanem, aby bylo možné s rozpuštěným produktem provést TLC analýzu. Tento jev ukazuje na značnou rozdílnost polarity výchozího diolu **1** a nově vznikajícího monoesteru, která by zřejmě byla zvýrazněna přítomností dalšího acylu, pokud by reakce probíhala až k diesteru.

Reakční směsi z acylačního experimentu s různými vinylestery byly podrobeny analýze s cílem alespoň nepřímo potvrdit identitu vznikajících esterů DHPA **1** na základě jejich chromatografické podobnosti se strukturně charakterizovaným acetátem **3a**. Na obr. 40 na str. 83 jsou pro názornost vyobrazeny dva chromatogramy z gradientové metody HPLC (str. 58); v tom nalevo byl analyzován standard výchozí látky a napravo je pak uveden chromatogram reakční směsi obsahující vinylkaprinát jako donor acylu s viditelným produktem DHPA 3'-kaprinátem.

Retenční časy vznikajících esterů získané prostřednictvím HPLC analýz (str. 58) jsou uvedeny v tabulce 6. Se vzrůstající délkou řetězce acylu v souladu s předpokladem stoupá hydrofobicita látky a tím se mění její retenční vlastnosti. Prodloužení retenčního času je zvláště patrné u esterů látky **1** s dlouhými mastnými kyselinami, např. kyselinou palmitovou či stearovou, – k jejich eluci z analytické kolony bylo nutno použít 90% acetonitrilu; výchozí diol **1** naproti tomu eluuje s minimální retencí už v mobilní fázi s cca 5 % acetonitrilu.

Tab. 6: Chromatografické vlastnosti DHPA **1** a jeho esterů.

látka	retenční čas <sup>a</sup> min	látka	retenční čas <sup>a</sup> min
DHPA <b>1</b>	3,2	DHPA 3'-kaprinát	18,2
" 3'-acetát <b>3a</b>	9,3	" 3'-laurát	20,5
" 2',3'-diacetát <b>4a</b>	11,1	" 3'-myristát	22,9
" 3'-propionát	10,3	" 3'-palmitát	25,7
" 3'-butyrát	11,0	" 3'-stearát	28,9
" 3'-kapronát	13,1	" 3'-benzoát	12,6
" 3'-kaprylát	16,0		

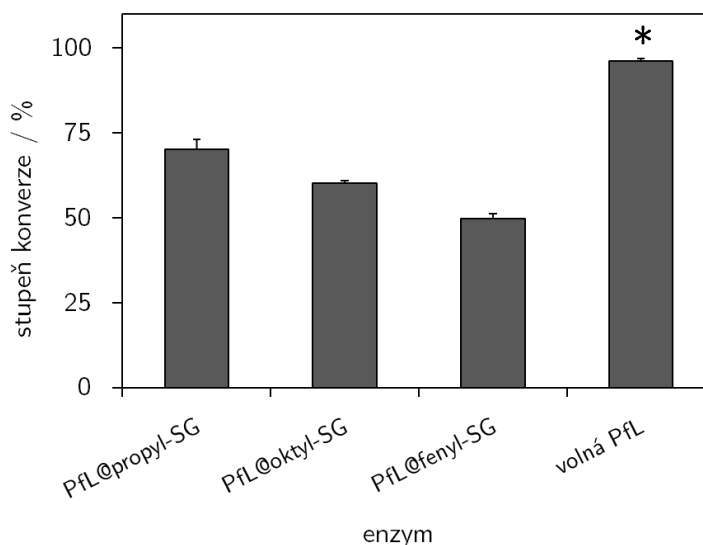
<sup>a</sup> Metoda na str. 58.  $N > 1$ .

Dále je na obrázku 43A na str. 87 uveden výnos retenčních časů příslušných pozorovaných monoesterů DHPA **1** proti počtu uhlíků v řetězci acylu, který nepřímo dokazuje strukturní příbuznost jednotlivých sloučenin. Jelikož byl při HPLC analýze využit lineární gradient, má vyobrazená závislost téměř lineární průběh. V obrázku nejsou uvažována data pro 3'-benzoát ani 3'-diacetát **4a**, jelikož se z chromatografického hlediska jedná o poněkud odlišné látky (diester a aromatický ester).

Jak bylo uvedeno v předcházející části, dva produkty esterifikace 9-(2',3'-dihydroxypropyl)adeninu **1** byly strukturně charakterizovány pomocí nukleární

magnetické rezonance – jednalo se o jeho 3'-acetát **3a** a 2',3'-diacetát **4a**. K tomuto účelu byla využita semipreparativní reakce s množstvím 25 mg (0,12 mmol) výchozí látky (popis na str. 52). Reakce byla probíhala v toluenu při teplotě 60 °C a po následném provedení semipreparativní TLC bylo izolováno 9,9 mg 3'-acetátu **3a** (výtěžek 33 %) a 14 mg 2',3'-diacetátu **4a** (výtěžek 40 %); u obou produktů byla posléze měřena NMR spektra (str. 60). Hodnoty chemických posunů pro jednotlivé signály v  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  spektru výchozí látky a řečených produktů jsou vypsány na str. 53.

Pro ilustraci jsou v Příloze na str. 108 uvedena všechna NMR spektra získaná pro sloučeninu 3'-acetát **3a** ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  APT, COSY, HMBC, HSQC).



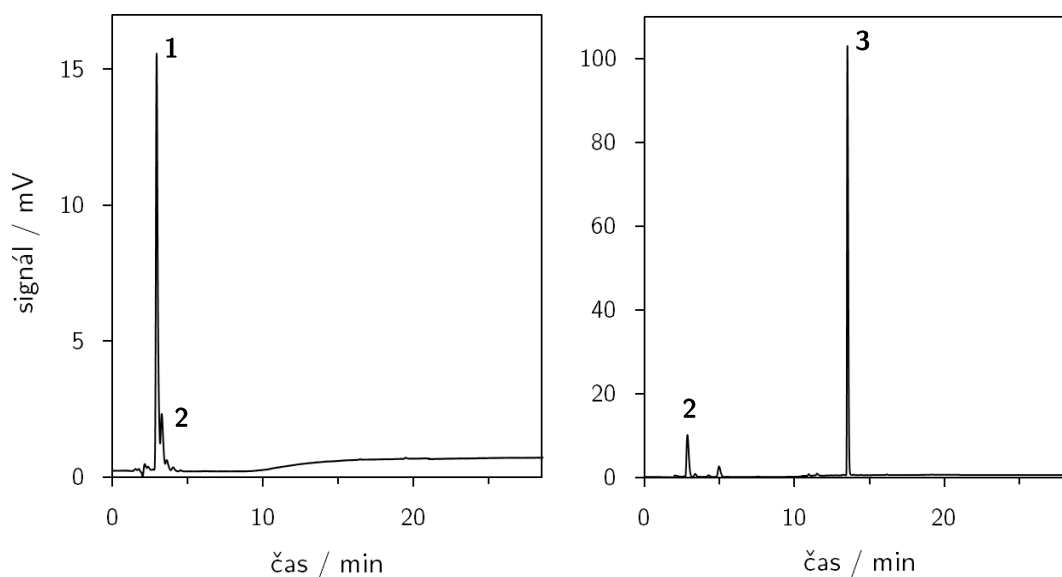
Obr. 41: Vliv způsobu imobilizace lipasy na stupeň konverze při kaprinylnaci DHPA **1**.<sup>a</sup>

*Podmínky* (metoda na str. 52): DHPA **1** byl esterifikován vinylkaprinátem v acetonitrilu pomocí příslušné lipasy; stupeň konverze byl stanovena po 24 hod pomocí TLC. <sup>a</sup> Hodnoty stupně konverze vyjadřují procento výchozí látky, jež bylo lipasou přeměněno na produkt(y). \* Jako druhý produkt pozorován i možný 2',3'-dikaprinát (4 %).  $N = 3$ .

Jako poslední byly u sloučeniny DHPA **1** v rámci acylace testovány tři připravené ormosilové biokatalyzátory *Pfl*@propyl-SG, *Pfl*@oktyl-SG a *Pfl*@fenyl-SG ve srovnání s volnou lipasou ve formě komerčního lyofilizátu (metoda str. 52). Enzymy byly v reakci použity ve stejném hmotnostním množství (2,5 mg). Cílem pokusu bylo zjistit, jak se liší katalytická schopnost lipasy *Pfl* imobilizované na různých nosičích a jak se tyto odlišují od volné lipasy. Jako donor acylu byl vybrán středně dlouhý vinylkaprinát, reakce probíhala v acetonitrilu za míchání po dobu 24 hod. Stupeň konverze výchozí látky na produkt 3'-kaprinát byl určen pomocí TLC. Výsledky jsou uvedeny na obr. 41 na str. 85.

Reakce proběhla ve všech případech do stupně konverze >20 %, z tohoto důvodu nelze příliš porovnávat esterifikační aktivity jednotlivých enzymů. Do reakce také nebylo dáno stejné množství celkových proteinů nebo enzymové aktivity. Nejvíce produktu bylo zjištěno v případě volné lipasy – 96 % –, z čehož cca 4 % bylo tvořeno předpokládaným 2',3'-esterem. U imobilizovaných enzymů se stupeň konverze snižoval v pořadí *PfL*@propyl-SG, *PfL*@oktyl-SG a *PfL*@fenyl-SG: 70, 60 a 50 %.

#### 4.2.2 Acylace 2-fenylpropanolu



Obr. 42: Chromatogramy z HPLC analýzy reakční směsi po acylaci 2-fenylpropanolu **2**.<sup>a</sup>

A) Standard 2-fenylpropanolu **2**.

B) Odběr z reakční směsi s vinylkaprylátém v čase 24 hod.

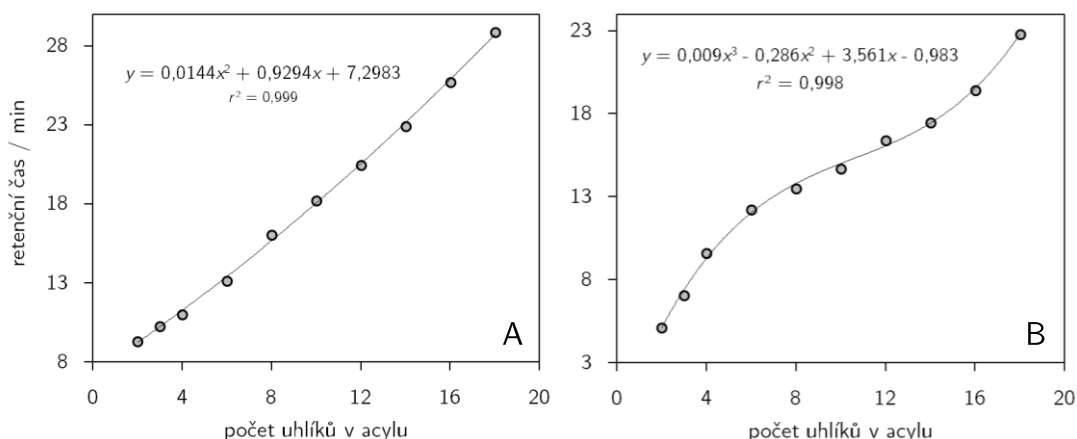
*Podmínky* (vizte str. 54 a 59): Vizte pod tab. 7. <sup>a</sup> **1** 2-fenylpropanol **2**. **2** komerční nečistota. **3** 2-fenylpropylkaprylát.

Látka 2-fenylpropanol **2** má oproti DHPA **1** jednu značnou výhodu, a to že je plně rozpustná (resp. mísitelná, jedná se o kapalinu) ve všech běžných organických rozpouštědlech. Při reakcích je tedy možné používat řádově vyšší koncentrace této výchozí látky a hlavní limitací reakce se pak stává difuze.

Nevýhodou tohoto aromatického alkoholu byla jeho poměrně nízká absorpce v UV oblasti elektromagnetického záření (na spektrofotometru byl získaný absorpční koeficient zhruba 100× nižší než u 9-(2',3'-dihydroxypropyl)adenin), což znamenalo další důvod používat při reakcích mnohem vyšší látková množství, než tomu bylo

v případě DHPA **1**. Pro možnost analýzy složek reakčních směsí byla zvažována plynová chromatografie vynikající vyšší citlivostí, nakonec však byla využita HPLC.

Na obr. 42 na str. 86 jsou pro ilustraci uvedeny chromatogramy ze separace složek reakční směsi při acylaci 2-fenylpropanolu **2** pomocí gradientové HPLC metody (str. 59). Na prvním chromatogramu byl analyzován roztok výchozí látky, na druhém je pak záznam získaný po proběhnutí kaprylační reakce – je zde viditelný produkt 2-fenylpropylkaprylát. V komerční výchozí látce byla zjištěna nečistota, UV záření absorbující látka, která při HPLC eluuje krátce za alkoholem **2**. Tato látka má zřejmě mnohem vyšší absorpční koeficient ve srovnání s 2-fenylpropanolem **2**, což má za následek, že při UV detekci zaujímá signál nečistoty cca 17 % celkového signálu, přestože jí v komerčním produktu může být maximálně 2–3 % (výrobce deklaruje čistotu >97 %). Povaha, resp. struktura, této nečistoty zatím nebyla objasněna; nebyl však zjištěn žádný vliv na studované acylační reakce, takže purifikace komerční látky nebyla nutná.



Obr. 43: Separace homologické řady esterů DHPA **1** a 2-fenylpropanolu **2** při HPLC.

A: Výnos retenčního času 3'-esteru DHPA **1** proti počtu uhlíků v acylu.

B: Výnos retenčního času esteru 2-fenylpropanolu **2** proti počtu uhlíků v acylu.

Po prvotním screeningu rozpouštědel (výsledky neuvedeny) se jako vhodná rozpouštědla ukázaly vesměs stejné látky jako v případě DHPA (obr. 35 na str. 78). Pro další pokusy byla vybrána směs isooktanu s *tert*-butylmethyletherem; isooktan měl s bodem varu 99 °C zaručit nižší odpar rozpouštědla během dlouhých reakčních časů.

Byly provedeny acylace 2-fenylpropanolu **2** ve směsi isooktan/*tert*-butylmethylether 1:1 s využitím 68 mg (0,5 mmol) výchozí látky (metoda na str. 54). Reakce neprobíhaly po stejnou dobu, byly přerušeny po dosažení přijatelného stupně konverze (většinou >97 %). Výjimkou byla benzoylace, která byla ukončena na stupni konverze 42 % po 21 dnech od počátku reakce. U této byl také

využit jiný postup analýzy (GC, str. 59), jelikož se vzhledem ke sterické náročnosti fenylového kruhu očekávala zvýšená acylační preference lipasy *PfL* vůči jednomu z enantiomerů.

Tab. 7: Výsledky esterifikace 2-fenylpropanolu **2** v semipreparativním měřítku.

produkt	čas reakce	stupeň konverze <sup>a</sup>
	hod	%
acetát	265	97
propionát <b>5b</b>	50	99
butyrát	170	99
kapronát	96	99
kaprylát	24	>99
kaprinát	24	>99
laurát	40	97
myristát	24	97
palmitát	24	98
stearát	24	97
benzoát <b>5k</b>	500	42

*Podmínky* (odstavec na str. 54): Lipasa, 2-fenylpropanol **2** a vinylester byly míchány ve směsi isooktan/MTBE několik desítek hodin až dnů. <sup>a</sup> Stanoven pomocí HPLC a v případě **5k** pomocí chirální GC. Vyjadřuje množství výchozí látky, jež bylo enzymem přeměněno na její ester.

Výsledky ze semipreparativních acylací alkoholu **2** jsou uvedeny v tabulce 7. Rychlosti dosažení stupně konverze nad 97 % se poměrně lišily. Nejrychleji probíhaly acylace při použití vinylkaprylátu a -kaprinátu a delších esterů vinylmyristátu, -palmitátu a -stearátu, všechny zmíněné trvaly shodně méně než jeden den. Déle probíhala lauroylace, propionylace a kapronylace 2-fenylpropanolu **2**, přibližně 40, 50 a 96 hod. Za reakce trvající výrazně déle než v předchozích případech je možné označit ty s použitím vinylbutyrátu (170 hod), vinylacetátu (265 hod) a vinylbenzoátu (>>500 hod) jako donorů acylu.

Dva produkty reakcí, 2-fenylpropylpropionát **5b** (59 mg, výtěžek 62 %) a -benzoát **5k** (26 mg, výtěžek 22 %), byly izolovány prostřednictvím sloupcové chromatografie (str. 57) a strukturně charakterizovány pomocí NMR (str. 60) a v případě benzoátu **5k** také pomocí polarimetrického měření (str. 61). Hodnoty chemických posunů pro jednotlivé signály v <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C spektru jsou vypsány na str. 54.

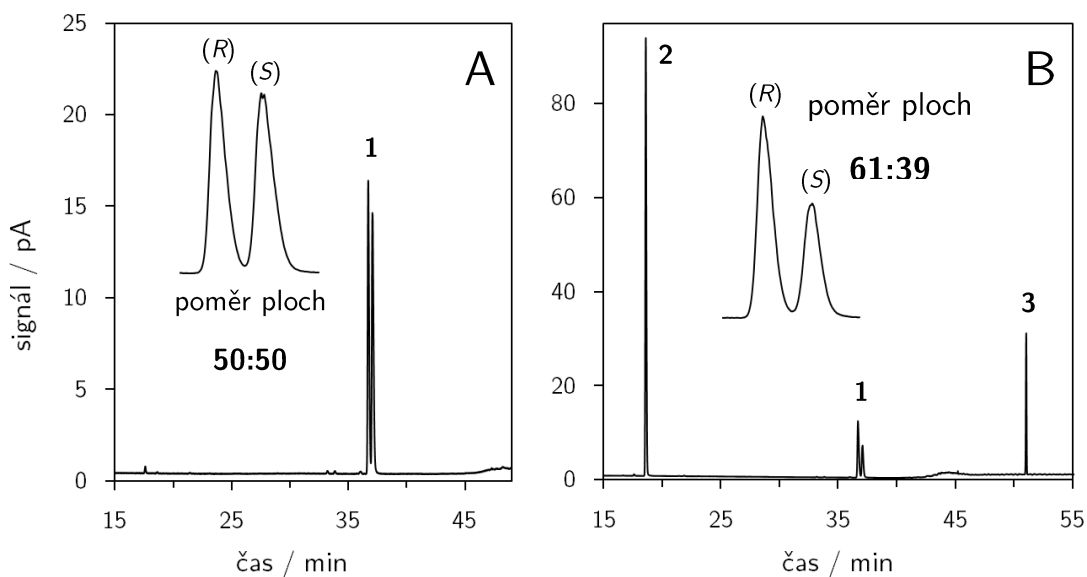


Tab. 8: Výsledky z analýzy složek reakční směsi po benzoylaci 2-fenylpropanolu **2**.

látka	enantiomerní přebytek %	optická otáčivost <sup>a</sup> °	převládající enantiomer
2-fenylpropanol <b>2</b>	23	+2,2	<i>R</i>
2-fenylpropylbenzoát <b>5k</b>	31	-11,3	<i>S</i>

*Podmínky* (na str. 54): Vizte legenda u tabulky 7. <sup>a</sup> Měřeno v chloroformu při vlnové délce 589 nm.

Případu benzoylace 2-fenylpropanolu **2** byla věnována větší pozornost. V časových intervalech bylo složení reakční směsi monitorováno pomocí plynové chromatografie. Na obr. 44 na str. 90 jsou zobrazeny dva chromatogramy z chirální plynově-chromatografické analýzy enantiomerního zastoupení ve výchozí látce v průběhu benzoylační reakce. Na prvním chromatogramu je uvedena separace výchozího alkoholu **2**, který je ve formě racemátu ( $[\alpha] = 0^\circ$ ). Píky obou jeho enantiomerů mají téměř stejnou plochu, tedy v poměru 1:1. Na druhém chromatogramu je pak zobrazena separace složek reakční směsi po 21 dnech reakce, kdy je patrný úbytek později eluujícího enantiomeru na poměr 1:0,64, což při hodnotě stupně konverze 42 % odpovídá enantiomernímu přebytku 23 % ve výchozí látce. Byly provedeny také pokusy o separaci enantiomerů u produktu, avšak všechny byly neúspěšné, resp. objevily se pouze náznaky přítomnosti dvou koeluujících píků, – látka má mnohem vyšší bod varu a úspěšná separace by vyžadovala nepoměrně více času. Z dat, která jsou graficky zpracována na obr. 45 na str. 90, získaných během monitorování benzoylační reakce byla spočtena hodnota enantioselektivity 2,3 a předpokládaný enantiomerní přebytek v produktu činí 31 %. V grafu je patrný nárůst enantiomerního přebytku u produktu i výchozí látky v souvislosti se zvyšujícím se stupněm konverze; v případě enantiomerního přebytku v produktu se hodnota v pozdějších fázích reakce mění jen minimálně.

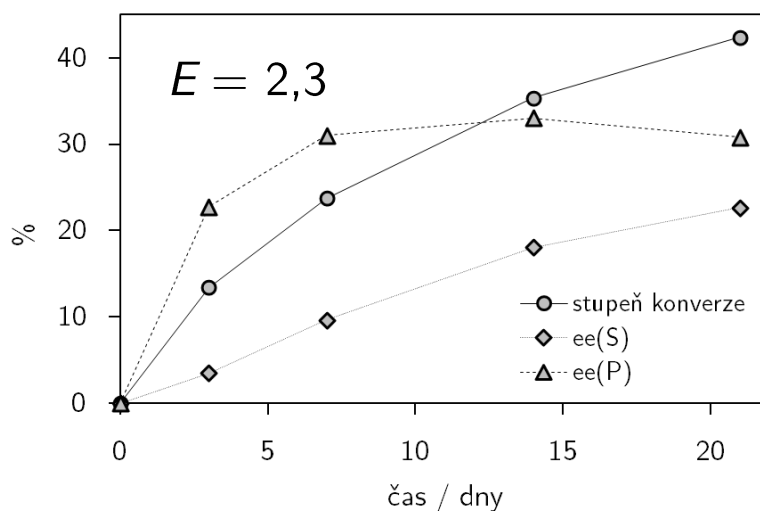


Obr. 44: Příklad separace enantiomerů při sledování průběhu enzymové benzoylace 2-fenylpropanolu **2** pomocí chirální GC.<sup>a</sup>

A) Standard 2-fenylpropanolu **2**.

B) Odběr z reakční směsi v čase 21 dnů.

Podmínky (na str. 54 a 59): Vizte pod tabulkou 7.<sup>a</sup> **1** 2-fenylpropanol **2**, **2** vinylbenzoát, **3** 2-fenylpropylbenzoát **5k**.



Obr. 45: Průběh benzoylace alkoholu **2** v semipreparativním měřítku.<sup>a</sup>

Podmínky (str. 54): Vizte legenda u tabulky 7.<sup>a</sup> Stupeň konverze vyjadřuje množství výchozí látky, které bylo enzymově převedeno na její benzoát **5k**. Enantiomerní přebytek u produktu je vypočten z hodnot  $ee_S$  a C. Enantiomerní poměr je průměrem z hodnot ze 7., 14. a 21. dne reakce.

Výsledky získané v rámci benzoylační reakce jsou shrnuty v tabulce 8 na str. 89. Přímá strukturní identifikace enantiomerů ve směsi pomocí NMR nebyla provedena, protože nebyly k dispozici enantiomerně čisté standardy látek, avšak na základě nepřímého porovnání polarimetrických dat výchozí látky a produktu s údaji publikovanými v literatuře pro enantiomery 2-fenylpropanolu **2** a jeho acetátu [176,177] bylo určeno, že ve výchozí látce převládá enantiomer *R* ( $[\alpha] = +2,2^\circ$ ) a v produktu benzoátu **5k** pak *S* ( $[\alpha] = -11,3^\circ$ ).

Podobně jako v případě acylací DHPA **1** byla i pro produkty odvozené od 2-fenylpropanolu **2**, které byly během biotransformačních reakcí pozorovány, provedena srovnávací analýza pomocí HPLC (metoda na str. 59). Retenční časy pozorovaných esterů jsou shrnuty v tabulce 9. Estery alkoholu **2** vůči výchozí látce vykazují podobné vlastnosti jako je tomu u DHPA **1** a jeho esterů.

S rostoucí délkou acylu estery zvyšují svoji retenci na HPLC koloně. Na obrázku 43B na str. 87 vyobrazen výnos retenčních časů příslušných esterů 2-fenylpropanolu **2** proti počtu uhlíků v řetězci acylu. Daná závislost má průběh mírně odlišný od toho v případě esterů DHPA uvedeném na vedlejším obrázku, jelikož rychlejší lineární gradient byl v použitém elučním programu obklopen dvěma izokratickými fázemi na začátku a na konci, – to mělo za následek viditelné „zploštění“ křivky u kratších a také u delších esterů.

Tab. 9: Chromatografické charakteristiky 2-fenylpropanolu **2** a jeho esterů.

látka	retenční čas <sup>a</sup> min	látka	retenční čas <sup>a</sup> min
2-fenylpropanol <b>2</b>	2,8	2-fenylpropylkaprinát	14,7
2-fenylpropylacetát	5,1	" laurát	16,4
" propionát <b>5b</b>	7,1	" myristát	17,5
" butyrát	9,6	" palmitát	19,4
" kapronát	12,3	" stearát	22,8
" kaprylát	13,5	" benzoát <b>5k</b>	10,7

<sup>a</sup> Metoda na str. 59.  $N \geq 1$ .

## 5 Diskuze

### 5.1 Imobilizace a charakterizace enzymů

Lipasa z *Pseudomonas fluorescens* byla pro studium vybrána z důvodu vysokého výtěžku reakce, který vykazala během předchozí práce se sloučeninou 9-(2',3'-dihydroxypropyl)adeninem **1** (DHPA) při její acylaci [77]; reakce v semipreparativním měřítku byly tehdy prováděny v dimethylformamidu, který jako rozpouštědlo pro acylaci DHPA není vhodný (vizte dále, rovněž obr. 35 na str. 78). Byla vybrána lyofilizovaná forma lipasy vyráběná společností *Amano*; enzymy od této japonské firmy, včetně lipasy *PfL*, jsou v literatuře široce zastoupeny [např. 72, 113,118,126].

Při hledání možného způsobu imobilizace lipasy se ukázal sol-gelový proces jako nepříliš probádaná – možno dokonce říct pozapomenutá – technika, jež by mohla nakonec vést k zajímavým výsledkům, hlavně co se týče enantioselektivity studované reakce, již se nepodařilo dosáhnout v předcházejících pokusech s žádným z použitých enzymů. Jako hlavní výhoda sol-gelového procesu se nabízela možnost podrobné optimalizace imobilizačního procesu, včetně studia možných aditiv apod., aby byl pokud možno plně využit katalytický potenciál lipasy *PfL*, – od této strategie se však později upustilo a přednost byla dána studiu aplikační oblasti již imobilizovaného enzymu.

Enzym byl tedy od počátku imobilizován částečně optimalizovaným způsobem přejatým z literatury [117,133], tj. s využitím fluoridového iontu jako katalyzátoru, poměru voda/silany 8:1, s přidavkem polyvinylalkoholu. Jako substituenty zvyšující hydrofobicitu vznikajícího nosiče byly vybrány propyl, oktyl a fenyl. Oktylový a fenyllový zbytek jsou obecně využívány při adsorpčních imobilizacích lipas nebo např. při přípravě stacionárních fází pro hydrofobně-interakční chromatografii proteinů.

Velkým rozdílem oproti většině publikovaných prací bylo použití tetraethoxysilanu namísto hojně užívaného tetramethoxysilanu (výjimkou např. [113,126]) jako hlavního sol-gelového monomeru (původně neplánováno, jednalo se o důsledek chyby v objednávce). Jak bylo řečeno v úvodu práce, je tetramethoxysilan několikanásobně reaktivnější než jeho vyšší homology včetně tetraethoxysilanu; to byl také možná důvod, proč jednotlivé polymerace trvaly mnohem delší dobu a polymerační směsi nebylo nutné chladit (nezahřívaly se jako při použití tetramethoxysilanu), jak je běžně popisováno v literatuře [113,117,118]. Polymerace také nejspíše z tohoto důvodu neproběhly úplně při použití většího poměru alkylsilan/alkoxysilan než 1:9; tento jev je

popsán i pro případy velmi nízkých poměrů alkylsilan/alkoxysilan u methoxysilanových prekurzorů.

V rámci imobilizace bylo dosaženo poměrně dobré účinnosti, tj. poměru imobilizovaných proteinů ku proteinům na počátku vzatým k imobilizaci, na úrovni popisované v literatuře [66,110]. Co se týče aktivity připravených enzymů, tyto byly ve srovnání s volným enzymem velmi nízké v řádu procent až desetin procenta (tabulka 3 na str. 66). Jak bylo uvedeno v úvodu práce, při imobilizacích pomocí klecového efektu není možné se úplně vyhnout nepříznivým vlivům jednotlivých složek imobilizační směsi na strukturu a aktivitu daného enzymu. Je tedy pravděpodobné, že ač bylo do ormosilového nosiče imobilizováno přes 90 % proteinů, většina úplně pozbyla své aktivity nebo sice zůstala aktivní, ale nacházela se v obtížně přístupných mikropórech gelu. Relativní srovnání vlivu propylového, oktylového a fenylového zbytku v ormosilu na aktivitu lipasy z *Pseudomonas fluorescens* je srovnatelný s údaji v literatuře [133].

Při takovémto srovnávání aktivity volného a imobilizovaného enzymu je nutné mít stále na paměti, že se jedná o molekuly enzymu ve, z hlediska reakce, velmi rozdílném stavu. V případě imobilizované formy je enzym součástí pevné fáze (heterogenní katalyzátor), všechny reakce jsou tedy primárně limitované difuzí reaktantů k enzymu a produktů od enzymu. Rozpustná forma lipasy se ve vodném prostředí pohybuje volně bez restrikcí. Je tedy možné předpokládat, že reakce lipasy v pevném stavu se substrátem, jenž je rovněž převážně v pevném stavu (např. 4-nitrofenyllaurát), nebude probíhat příliš rychle, alespoň ne tak rychle, jako když se volná lipasa v roztoku adsorbuje na částici substrátu a zahájí jeho nelimitovanou hydrolýzu. Toto tvrzení podporují výsledky ze studia hydrolýzy různých 4-nitrofenylesterů (obr. 30 na str. 70), kdy byly delší substráty hydrolyzovány imobilizovanými lipasami méně ochotně.

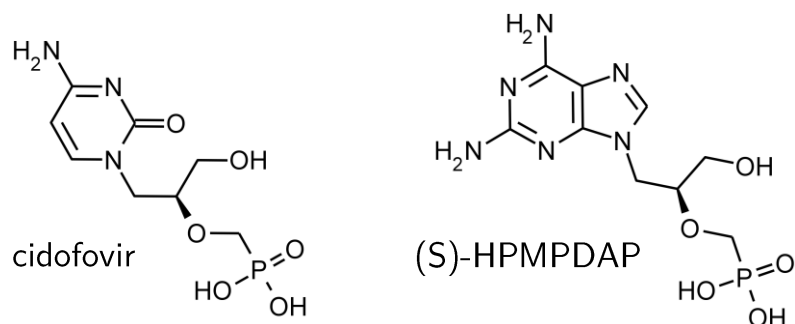
Při přípravě prvních imobilizátů bylo zjištěno, že enzymy ve formě hydrogelu, tj. ve stavu po proběhnutí polymerace a před odstraněním vody a dalších složek polymerační směsi, vykazovaly vyšší hydrolytické aktivity (cca 5×) než příslušné sušené formy. Jelikož by však voda přítomná v gelu mohla interferovat s použitím těchto enzymů při syntetických reakcích v organickém prostředí, byl zvolen alespoň mírnější postup sušení hydrogelů pomocí substituce rozpouštědla. Výsledné materiály by se tedy nejspíše daly zařadit do skupiny ambigelů spojující některé vlastnosti xerogelů a aerogelů.

Během měsíčního pobytu na *Instituto de Catálisis y Petroleoquímica* v Madridu v laboratoři doc. Josého M. Palomo byly imobilizovány lipasa *CaLB* a *PfL* pomocí tří imobilizačních technik: chemického síťování pomocí glutaraldehydu, adsorpce

na kuličky z butyl-methakrylátové pryskyřice (*Sepabeads FP-BU*) a sol-gelového procesu s oktyltriethoxysilanem. Pro zachování jednotnosti, tj. zaměření práce na lipasu *PfL* a sol-gelový proces, zde nejsou tyto výsledky zahrnuty. Na základě provedených kinetických experimentů (substrát DHPA a vinylacetát) je možné konstatovat, že esterifikační aktivita lipas imobilizovaných chemickým síťováním vztažená na hmotnost celého nosiče je vyšší než u lipas připravených adsorpční imobilizací a ta je vyšší než u lipas připravených pomocí sol-gelového procesu. Dále bylo zjištěno, že u enzymů vzniklých imobilizací stejným způsobem lipasa *CaLB* vykazuje obecně vyšší aktivity než lipasa *PfL*.

## 5.2 Biotransformační reakce katalyzované lipasami

V rámci řešené práce byly podrobeny zkoumání nejprve analogy nukleotidů, jež obsahují na alifatickém řetězci fosfonovou kyselinu, – jedná se o sloučeninu (*S*)-9-(2'-fosfonylmetoxy-3'-hydroxypropyl)diaminopurin [(*S*)-HPMPDAP] a cidofovir (obr. 46). Obě sloučeniny mají na základě zkušeností velmi nízkou až nulovou rozpustnost v organických rozpouštědlech typu aceton, acetonitril nebo toluen; o něco lépe se přitom rozpouští diaminopurinový derivát. Naproti tomuto jsou obě látky stejně jako DHPA **1** velmi dobře rozpustné ve vodě.



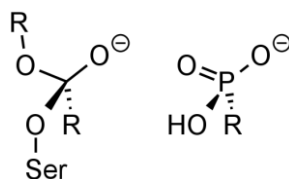
Obr. 46: Substráty patřící do třídy acyklických analogů nukleosidů.

(*S*)-HPMPDAP = (*S*)-9-(2'-fosfonylmetoxy-3'-hydroxypropyl)diaminopurin.

Byly provedeny pokusy o esterifikaci (acetylaci vinylacetátem) hydroxylové skupiny na uhlíku 3' propylu, a to v rozpouštědlech dimethylformamidu, ethylacetátu, toluenu, ve směsích dimethylformamid/hexan 4:1, acetonitril/dimethylformamid 4:1 a také v iontové kapalině 1-butyl-3-methylimidazolium-methylsulfátu. Byly využity enzymy komerční (lipasa B z *Pseudozyma antarctica* volná a imobilizovaná na *Immobead 150*, lipasa *Lipopan 50-BG* z *Thermomyces lanuginosus*, lipasy *Lipolase 100T* a *Lipozyme* z *Rhizomucor miehei*, lipasa z *Pseudomonas fluorescens*) i imobilizované enzymy vlastní přípravy (lipasy *PfL* a *CaLB* v oktyl-sol-gelu

a na butyl-methakrylátové pryskyřici). V žádném ze zmiňovaných případů se nepodařilo pomocí TLC (hydrofilně-interakční mód separace) identifikovat produkt reakce, tj. 3'-acetát cidofoviru ani (*S*)-HPMDAP, a to ani po několikadenním průběhu reakcí.

Přestože je řečená hydroxyskupina primární, a tedy by její esterifikace měla být lipasou preferována, je možné, že fosfonová funkce v těsné blízkosti je natolik polární/iontového charakteru, že zamezuje vazbě substrátu do aktivního místa enzymu anebo se naopak váže velmi pevně a brání průběhu reakce. Fosfonátová skupina je strukturně značně podobná intermediátu, jež vzniká v průběhu reakce lipasy s esterem (obr. 47). V literatuře se vyskytují příklady organofosfátových či fosfonátových esterů jako velmi potentních inhibitorů lipas a esteras působících kovalentní modifikaci nukleofilních aminokyselin v aktivním centru enzymu [134,178–180], některé z nich jsou dokonce využitelné při kvantitativním stanovení lipas [181], – zda je tento mechanismus platný i pro volné fosfonové kyseliny, je možné pouze spekulovat. Přímý inhibiční vliv (*S*)-HPMPDAP a cidofoviru na studovaný enzym z *Pseudomonas fluorescens* při koinkubaci se nepodařilo prokázat v případě hydrolytické reakce na substrátu 4-nitrofenyllaurátu ani v případě esterifikační reakce při acetylaci DHPA **1**.



Obr. 47: Strukturní podobnost tetraedrického acyl-enzymového intermediátu (vlevo) a fosfonátové funkce.

Také je třeba vzít v úvahu, že reakce byly zkušeny pouze s enantiomerně čistými látkami (oba deriváty měly konfiguraci *S*), a pro lipasovou reakci by mohl být použitý enantiomer tím méně preferovaným.

Dalším možným vysvětlením pro neúspěch esterifikace derivátů fosfonových kyselin je již zmíněná extrémně nízká rozpustnost těchto substrátů v organickém prostředí, avšak toto je spíše v rozporu s poznatky týkajícími se příbuzné polární sloučeniny DHPA **1**. Ta je také nerozpustná v nepolárních rozpouštědlech, ale i v těchto reakce vedoucí k jejím esterům probíhají, dokonce s vyššími stupni konverze než v rozpouštědlech polárních (vizte obr. 35 na str. 78). Dále byla většina reakcí s těmito fosfonovými substráty zkušena v dimethylformamidu, resp. ve směsích s ním, což nebylo vhodné řešení (vizte níže).

Po počátečním neúspěchu byla pozornost zaměřena na o něco jednodušší acyklonukleosidový analog 9-(2',3'-dihydroxypropyl)adenin **1**, u kterého už acylační

reakce byly s úspěchem provedeny [77], za cílem podrobnějšího studia tohoto případu. Sloučenina obsahuje tři potenciální nukleofilní skupiny, na nichž může dojít k acylaci; jedná se o vicinální diolové uspořádání na postranním alkylovém řetězci a aminoskupinu vázanou na purinovém jádře. Během lipasou katalyzované reakce by nemělo docházet k acylaci aminoskupiny na aromatickém systému, proto připadají v úvahu celkem tři možné produkty enzymové reakce: primární 3'-monoester, sekundární 2'-monoester a také 2',3'-diester.

V rámci reakcí katalyzovaných lipasou z *Pseudomonas fluorescens* byl skutečně pozorován jako první produkt 3'-ester, což odpovídá obecné preferenci lipas pro primární (tedy méně stericky náročné) alkoholy/estery. Při delších reakčních časech či při použití většího množství acylačního činidla se objevoval i druhý produkt, 2',3'-diester. V několika případech při acetylační reakci byla při TLC analýze pozorována látka odpovídající svou polaritou 2'-acetátu; tato však vznikala v tak malém množství, že nemohla být strukturně potvrzena. Prvotní nejistota ohledně struktury vznikajících produktů byla hlavním důvodem, proč byly dva z nich izolovány a jejich struktura potvrzena pomocí NMR (str. 53), zvláště důležitý k odlišení 2'- a 3'-monoesteru zde byl experiment s korelacemi přes více vazeb (HMBC).

Od původně používaného dimethylformamidu jako základního rozpouštědla pro provádění esterifikací DHPA **1** bylo ustoupeno poté, co bylo zjištěno, že acetylační reakce v něm probíhá do určité míry i při použití referenčního ormosilu bez přítomnosti enzymu (podmínkou je vysoký nadbytek vinyllesteru). Bylo testováno několik šarží rozpouštědla lišících se svým stářím a výrobcem a produkt byl detekován ve všech, dokonce i v rozpouštědle zakoupeném nedlouho před experimentem, což vylučuje vliv potenciálních degradačních produktů, jež mohou vznikat při dlouhodobém skladování rozpouštědla. Dimethylformamid má také velmi vysoký bod varu (tab. 1 na str. 15), což představuje nevýhodu během zpracování reakční směsi, kdy je potřeba rozpouštědlo odpařit; rovněž je mísitelný s vodou.

Během screeningu rozpouštědel pro esterifikaci DHPA **1** bylo zjištěno, že velmi polární rozpouštědla dimethylformamid a dimethylsulfoxid mají na reakci negativní vliv (obr. 35 na str. 78, obr. 34 na str. 77). Kromě těchto bylo zkoušeno velké množství nepolárních rozpouštědel; další velmi polární rozpouštědla jsou často alkoholy (methanol, ethanol, ...), tyto však vzhledem k povaze reakce nemohly být použity, a proto jsou získané korelační závislosti (obrázek 36 na str. 79) zatíženy převážně vlivem nepolárních rozpouštědel. V literatuře je např. popsán negativní vliv dimethylformamidu na enzymovou levulinylnaci 2'-deoxynukleosidů [182] a také na esterifikaci 2-hexanolu (katalyzováno *PfL*) [133].



Poměrně překvapujícím zjištěním bylo, že acylace DHPA **1** nejlépe probíhaly v rozpouštědlech (např. toluen), v nichž je rozpustnost této látky mizivá až žádná. Možným vysvětlením pro toto pozorování by mohla být adsorpce výchozí látky na silně polární silanolové skupiny ormosilu (nosič obsahuje alkylové řetězce, ale zároveň se stále ještě jedná o derivát silikagelu). Během analýzy reakčních směsí pomocí TLC byly vzorky eluovány poměrně silnou mobilní fází chloroform/methanol 4:1, protože např. při použití mobilní fáze tvořené petroletherem by výchozí látka měla maximální retenci, tj. zůstala by adsorbovaná na místě aplikace vzorku. V literatuře je například popsán pozitivní vliv silikagelu na esterifikaci glycerolu v nepolárním rozpouštědle [183]. Pokud by se tento „adsorpčně-reakční“ mechanismus uplatňoval, adsorbovaná molekula DHPA **1** by se prostřednictvím sekvence desorpce a adsorpce mohla postupně dostat až do vnitřních částí materiálu, kde se nacházejí molekuly imobilizovaného enzymu. To, že v nepolárních rozpouštědlech byly oproti těm polárnějším pozorovány i 2',3'-diestery by mohlo být podpořeno vyšší rozpustností monoesterů v organickém prostředí. V úvahu např. přichází vznik malého množství sekundárního 2'-esteru DHPA **1** (ať už enzymově nebo samovolně), který by byl ihned acylován na poloze 3' za vzniku pozorovaného 2',3'-diesteru.

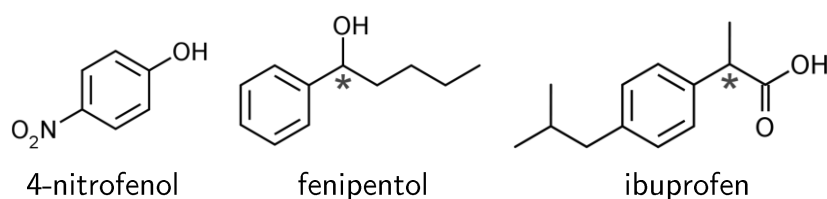
Bylo zvažováno použití tzv. bezrozpouštědlových (*solvent-free*) podmínek, tj. že by roli rozpouštědla nahradil substrát vinylester, alespoň jeho nižší deriváty (vinylpalmitát a -stearát jsou totiž za běžných teplot v pevném skupenství). Po provedení reakcí s různým množstvím vinylacetátu v acetonitrilu však výsledky naznačovaly, že se vzrůstající koncentrací vinylesteru se rychlost reakce snižuje (vizte obr. 37 na str. 80), pravděpodobně v důsledku negativního vlivu vinylesteru na enzym, a proto nakonec bezrozpouštědlové acylace provedeny nebyly.

V rámci testování alternativních donorů acylu pro acetylaci DHPA **1** se nakonec vinylester ukázal jako nejvýhodnější varianta (obr. 38 na str. 81). Např. použití acetanhydridu, resp. obecně anhydridů, má nevýhodu v podobě vedlejšího produktu reakce, kdy se uvolňuje druhá polovina molekuly anhydridu ve formě karboxylové kyseliny. Tato část je zejména u delších acylů, třeba u palmitanhydridu, zodpovědná za nízkou uhlíkovou účinnost (poměr uhlíku zabudovaného v produktu vůči uhlíku v reaktantech) takové reakce. V případě anhydridů je také možná acylace aminoskupiny, což může být nežádoucí. Kyselé a zásadité látky jsou známé tím, že se mnohem silněji adsorbují na polární materiály typu silikagelu; to může být vysvětlením, proč nebyl při použití kyseliny octové pozorován žádný acetylační produkt; dalším možným vysvětlením je negativní vliv kyseliny na enzym. Ze dvou esterových substrátů

zkoušených během tohoto pokusu se projevila vysoká reaktivita oxyvinylového uspořádání, po jehož alkoholýze/hydrolýze vzniká snadno odpařitelný produkt vinylalkohol/acetaldehyd se zanedbatelnou nukleofilitou. Ethanol, resp. ethoxid, je naproti tomu jako odstupující skupina zřejmě méně preferovaný, z toho důvodu bylo při použití ethylacetátu pozorováno minimální množství produktu.

V průběhu studia imobilizovaných lipas se objevila potřeba znát kromě stanovené hydrolytické aktivity také jejich (trans)esterifikační aktivitu, která by lépe odpovídala aplikaci v organickém prostředí. Pro tento účel bylo provedeno testování několika potenciálních substrátů (tři z nich jsou na obr. 48). Substráty byly vybrány tak, aby byly co nejdostupnější a nejjednodušší a obsahovaly chromofor pro detekci v UV oblasti.

Pro 4-nitrofenol se předpokládala opačná reakce k té používané při stanovení hydrolytické aktivity. Ukázalo se, že fenolický hydroxyl je pro lipasu *PfL* velmi obtížným substrátem a acetylační i lauroylační reakce probíhaly jen velmi pomalu. Dalším potenciálním substrátem byl sekundární alkohol fenipentol, který byl izolován ve velké čistotě z léčivého přípravku choleretika *Febichol*<sup>®</sup> (*Noventis*, ČR). Jak bylo zmíněno výše, sekundární alkoholy jsou pro většinu lipas obtížnějšími substráty než alkoholy primární, ale např. 1-fenylethanol je velmi často používán při studiu enantioselektivity lipas [66,70,126]. V případě fenipentolu však enzymová reakce neprobíhala, resp. probíhala opět velmi pomalu (stopy produktu se objevily v řádu několika dnů), což mohlo být způsobeno mimo jiné i poměrně dlouhým butylovým řetězcem v blízkosti hydroxylové skupiny, jež u zmíněného substrátu 1-fenylethanolu chybí.



Obr. 48: Sloučeniny testované jako substráty pro stanovení esterifikační aktivity lipasy.

Dále byly zkoušeny esterifikace kyselinového substrátu ibuprofenu, který byl izolován z léčivého přípravku *APO-IBUPROFEN*<sup>®</sup> (*Apotex*, ČR), pomocí různých alkoholů (např. methanol, butanol). Ani v tomto případě lipasa kýženou esterifikační reakci nekatalyzovala; nebyl detekován vůbec žádný produkt.

Poslední zkoušený substrát 2-fenylpropanol **2** byl z komerčních katalogů dostupných chemických sloučenin vybrán tak, aby v sobě nenesl nevýhody předchozích neúspěšných substrátů, tj. jedná se o primární alkohol, jehož hydroxyskupina je

dostatečně daleko od stericky náročného fenylového jádra, a zároveň aby obsahoval chirální uhlík pro případnou možnost preference lipasy vůči jednomu s enantiomerů.

Acylace tohoto alkoholu byly velmi úspěšné, enzymové reakce probíhaly mnohem rychleji než analogické reakce se substrátem DHPA **1**, což může být způsobeno dokonalou mísitelností 2-fenylpropanolu s organickými rozpouštědly a tedy možností pracovat na koncentracích v řádu stovek milimolů na litr. Nejvyšší reakční rychlosti byly dosaženy u delších vinylesterů, což je ve shodě se zjištěním pro acylaci DHPA **1** (na obr. 39 na str. 82), a reakce se všemi dostupnými vinylestery byly provedeny v semipreparativním měřítku. Dva produkty byly izolovány a charakterizovány pomocí nukleární magnetické rezonance (str. 54). Jednalo se o propionát **5b**, který byl zamýšlen jako produkt při stanovení esterifikační aktivity enzymů, a benzoát **5k**, u něhož jako u jediného produktu byla pozorována určitá enantiopreference.

Pro stanovení esterifikační aktivity připravených enzymů na substrátu 2-fenylpropanolu **2** byla vyvinuta izokratická HPLC metoda (čas analýzy cca 8 min), avšak stanovení nakonec z časových důvodů nebyla provedena (budou dodatečně provedena v rámci přípravy publikace).

V případě benzoylační reakce byla zjištěna enantioselektivita 2,3, což je z hlediska enantioselektivní syntézy nepřilíš dobrý výsledek; jako přijatelné lze označit hodnoty enantioselektivity kolem 20 a výše (např. hodnota *E* 50 při 50% stupni konverze poskytne produkt tvořený z 90 % jedním z enantiomerů) [184], zcela enantioselektivní reakce pak dosahují hodnot >200. I v literatuře jsou pro lipasu *PfL* udávány velice rozdílné enantioselektivní v závislosti na konkrétních substrátech a podmínkách reakce [126,133,177]. Důvod „úspěchu“ u benzoylační reakce tkví zřejmě ve velké sterické náročnosti benzoylevé skupiny, která v aktivním místě lipasy vynutila přítomnost hlavně jednoho z enantiomerů alkoholu [45]. Podobný výsledek je očekáván i při benzoylaci DHPA **1**, která v analytickém měřítku probíhala rovněž mnohem pomaleji než reakce lineárních vinylesterů. Tato však nejprve bude muset být provedena v semipreparativním měřítku, aby se podařilo izolovat produkt a stanovit jeho optickou otáčivost.

Na základě provedených experimentů je možné říci, že imobilizací lipas pomocí sol-gelového procesu se získají modifikované biokatalyzátory schopné urychlovat reakce za velmi mírných podmínek bez vedlejších produktů. Aktivitu lipasy je možné ovlivnit na základě výběru složek polymerační směsi. V rámci studia této problematiky zůstává ještě velké množství otázek, hlavně těch týkajících se mechanistických procesů, nezodpovězeno.

## 6 Shrnutí

- V rámci předložené práce byl zpracován přehled literatury týkající se využití lipas v biotechnologii a imobilizace enzymů.
- Bakteriální lipasa z *Pseudomonas fluorescens* byla imobilizována prostřednictvím sol-gelového procesu do třech různých ormosilů – s propylovým, oktylovým a fenylovým substituentem. U imobilizovaných enzymů byly studovány jimi katalyzované hydrolytické reakce, dále byla studována jejich pH a teplotní stabilita a stabilita v rozpouštědlech.
- Na modelových sloučeninách 9-(2',3'-dihydroxypropyl)adeninu a 2-fenylpropanolu byla úspěšně ilustrována možnost využití imobilizovaných enzymů při esterifikacích alkoholů v organickém prostředí. Byly optimalizovány podmínky acylačních reakcí a čtyři produkty byly dále izolovány a strukturně charakterizovány pomocí NMR.
- Pokusy o enantioselektivní acylaci 9-(2',3'-dihydroxypropyl)adeninu nebyly úspěšné, v případě 2-fenylpropanolu byla zjištěna pouze minimální enantiopreference.
- Acyklické analogy cidofovir ani (*S*)-9-(2'-fosfonylmethoxy-3'-hydroxypropyl)diaminopurin se nepodařilo enzymově esterifikovat.
- Pro účely práce byly vyvinuty rutinní analytické metody (HPLC, GC, TLC) použitelné při studiu enzymových acylací strukturně podobných substrátů.

Část výsledků této diplomové práce byla prezentována formou posteru na konferenci *BioTech 2014 and 6<sup>th</sup> Czech-Swiss Symposium with Exhibition* (11.–14. června 2014, Praha), vizte abstrakt ze sborníku na str. 114. Výsledky z diplomové práce budou v dohledné době použity při přípravě publikace pro časopis věnovaný řešené tématice, např. *Enzyme and Microbial Technology*.

## Literatura

- [1] Sharma, R., Chisti, Y., Benerjee, U. C.: *Biotechnol. Adv.* 2001, **19**:627–662.
- [2] Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A.: *Enzyme Microb. Technol.* 2006, **39**:235–251.
- [3] Nachlas, M. M., Seligman, A. M.: *J. Biol. Chem.* 1949, **181**:343–355.
- [4] Downey, W. K., Andrews, P.: *Biochem. J.* 1965, **94**:642–650.
- [5] Long, J. Z., Cravatt, B. F.: *Chem. Rev.* 2011, **111**:6022–6063.
- [6] Winkler, F. K., D'Arcy, A., Hunziker, W.: *Nature*. 1990, **343**:771–774.
- [7] Rathelot, J., Julien, R., Canioni, P., Coeroli, C., Sarda, L.: *Biochimie*. 1975, **57**:1117–1122.
- [8] Brockerhoff, H.: *Biochim. Biophys. Acta*. 1968, **159**:296–303.
- [9] Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L., Menge, U.: *Nature*. 1990, **343**:767–770.
- [10] Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J. L., Verscheuren, K. H. G., Goldman, A.: *Protein Eng.* 1992, **5**(3):197–211.
- [11] Schrag, J. D., Li, Y., Wu, S., Cygler, M.: *Nature*. 1991, **351**:761–764.
- [12] Van Vranken, D., Weiss, G.: *Introduction to Bioorganic Chemistry and Chemical Biology*. New York: Garland Science, 2013.
- [13] Aranda, J., Cerqueira, N. M. F. S. A., Fernandes, P. A., Roca, M., Tuñon, I., Ramos, M. J.: *Biochemistry*. 2014, **53**:5820–5829.
- [14] Jaeger, K.-E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O.: *FEMS Microbiol. Rev.* 1992, **15**:29–63.
- [15] Sémériva, M., Chapus, C., Bovier-Lapierre, C., Desnuelle, P.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1974, **58**(3):808–813.
- [16] Chapus, C., Sémériva, M., Bovier-Lapierre, C., Desnuelle, P.: *Biochemistry*. 1976, **15**(23):4980–4987.
- [17] Verger, R.: *Trends Biotechnol.* 1997, **15**:32–38.
- [18] Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Huge-Jensen, B., Patkar, S. A., Thim, L.: *Nature*. 1991, **351**:491–494.
- [19] Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M., Derewenda, Z. S.: *Biochemistry*. 1992, **31**:1532–1541.
- [20] Schmid, R. D., Verger, R.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, **37**:1608–1633.
- [21] Van Tilbeurgh, H., Egloff, M.-P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R., Cambillau, C.: *Nature*. 1993, **362**:814–820.
- [22] Turner, N. A., Needs, E. C., Khan, J. A., Vulfson, E. N.: *Biotechnol. Bioeng.* 2001, **72**(1):108–118.
- [23] Fernández-Lorente, G., Palomo, J. M., Fuentes, M., Mateo, C., Guisán, J. M., Fernández-Lafuente, R.: *Biotechnol. Bioeng.* 2003, **82**(2):232–237.
- [24] Martinelle, M., Holmquist, M., Hult, K.: *Biochim. Biophys. Acta*. 1995, **1258**:272–276.
- [25] Zaks, A., Klibanov, A. M.: *Science*. 1984, **224**:1249–1251.
- [26] Klibanov, A. M.: *Nature*. 2001, **409**:241–246.
- [27] Singh, A. K., Mukhopadhyay, M.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012, **166**:486–520.
- [28] Adlercreutz, P.: *Chem. Soc. Rev.* 2013, **42**:6406–6436.
- [29] Cadirici, B. H., Yasa, I.: *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2010, **64**:155–161.
- [30] Abdel-Fattah, Y. R., Soliman, N. A., Yousef, S. M., El-Helow, E. R.: *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2012, **10**:193–200.
- [31] Jiang, X.-J., Hu, L., Jiang, L., Zhou, B., Song, P., Huang, H.: *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2013, **18**:350–357.
- [32] Ramesh, P., Harini, T., Fadnavis, N. W.: *Org. Process Res. Dev.* 2015, **19**:296–301.

- [33] Klibanov, A. M.: *Trends Biochem. Sci.* 1989, **14**:141–144.
- [34] Chen, C.-S., Sih, C. J.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 1989, **28**:695–707.
- [35] Herbst, D., Peper, S., Niemeyer, B.: *J. Biotechnol.* 2012, **162**:398–403.
- [36] Rubio, E., Fernandez-Mayorales, A., Klibanov, A. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 1991, **113**:695–696.
- [37] Wescott, C. R., Klibanov, A. M.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1994, **1206**:1–9.
- [38] Valivety, R. H., Johnston, G. A., Suckling, C. J., Halling, P. J.: *Biotechnol. Bioeng.* 1991, **38**:1137–1143.
- [39] Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C.: *Biotechnol. Bioeng.* 1987, **30**(1):81–87.
- [40] Wehtje, E., Adlercreutz, P.: *Biotechnol. Bioeng.* 1997, **55**(5):798–806.
- [41] Kvittingen, L., Sjursnes, B., Anthosen, T., Halling, P.: *Tetrahedron.* 1992, **48**(13):2793–2802.
- [42] Svensson, I., Wehtje, E., Adlercreutz, P., Mattiasson, B.: *Biotechnol. Bioeng.* 1994, **44**:549–556.
- [43] Sabbani, S., Hedenström, E.: *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2009, **58**:6–9.
- [44] Blanco, R. M., Terreros, P., Fernández-Pérez, M., Otero, C., Díaz-González, G.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2004, **30**:83–93.
- [45] Kazlauskas, R. J., Weissfloch, A. N. E., Rappaport, A. T., Cuccia, L. A.: *J. Org. Chem.* 1991, **56**:2656–2665.
- [46] Tokiwa, Y., Suzuki, T.: *Nature.* 1977, **270**:76–78.
- [47] Christopher, L. P., Kumar, H., Zambare, V. P.: *Appl. Energ.* 2014, **119**:497–520.
- [48] Kim, M.-J., Yangsoo, A., Park, J.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 2012, **13**:578–587.
- [49] Kapoor, M., Majumder, A. B., Mukherjee, J., Gupta, M. N.: *Biocatal. Biotransform.* 2012, **30**(4):399–408.
- [50] Ranangathan, S., Gärtner, T., Wiemann, L. O., Sieber, V.: *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2015, **114**:72–76.
- [51] Du, L.-H., Ling, H.-M., Luo, X.-P.: *RSC Adv.* 2014, **4**:7770–7773.
- [52] Zhou, L.-H., Wang, N., Chen, G.-N., Yang, Q., Yang, S.-Y., Zhang, W., Zhang, Y., Yu, X.-Q.: *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2014, **109**:170–177.
- [53] Li, K., He, T., Feng, X.-W., Wang, N., Yu, X.-Q.: *Green Chem.* 2009, **11**:777–779.
- [54] ten Brink, G.-J., Arends, I. W. C. E., Sheldon, R. A.: *Chem. Rev.* 2004, **104**:4105–4123.
- [55] Lide, D. R., ed., et al.: *CRC Handbook of Chemistry and Physics.* 87. vydání. Boca Raton, Florida: Taylor & Francis, 2007.
- [56] Stenutz, R.: *Tables for Chemistry.* [online]. [cit. 28.4.2015]. URL: <http://www.stenutz.eu/chem/>.
- [57] *Wikipedia, the Free Encyclopedia.* [online]. [cit. 30.3.2015]. URL: <http://en.wikipedia.org/>.
- [58] Paroul, N., Grzegorski, L. P., Chiaradia, V., Treichel, H., Cansian, R. L., Oliveira, J. V., de Oliveira, D.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012, **166**:13–21.
- [59] Ravelo, M., Fuente, E., Blanco, Á., Ladero, M., García-Ochoa, F.: *Biochem. Eng. J.* 2015, **101**:228–236.
- [60] Yang, Z., Pan, W.: *Enzyme Microb. Technol.* 2005, **37**:19–28.
- [61] Chen, C.-S., Fujiomoto, Y., Girdaukas, G., Sih, C. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 1982, **104**:7294–7299.
- [62] Keith, J. M., Larrow, J. F., Jacobsen, E. N.: *Adv. Synth. Catal.* 2001, **343**(1):5–26.
- [63] Heidlindemann, M., Rulli, G., Berkessel, A., Hummel, W., Gröger, H.: *ACS Catalysis.* 2014, **4**:1099–1103.
- [64] Chen, C.-S., Wu, S.-H., Girdaukas, G., Sih, C. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 1987, **109**:2812–2817.
- [65] Sheldon, R. A., van Pelt, S.: *Chem. Soc. Rev.* 2013, **42**:6223–6235.
- [66] Reetz, M. T., Zonta, A., Simpelkamp, J.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, **34**(3):301–303.
- [67] Avnir, D., Braun, S., Lev, O., Ottolenghi, M.: *Chem. Mater.* 1994, **6**:1605–1614.

- [68] Vlastní pozorování.
- [69] Yilmaz, E., Sezgin, M., Yilmaz, M.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2010, **62**:162–168.
- [70] Brem, J., Turcu, M. C., Paizs, C., Lundell, K., Toşa, M.-I., Irimie, F.-D., Kanerva, L. T.: *Process Biochem.* 2012, **47**:119–126.
- [71] Tielmann, P., Kierkels, H., Zonta, A., Ilie, A., Reetz, M. T.: *Nanoscale.* 2014, **6**:6220–6228.
- [72] Reetz, M. T., Tielmann, P., Wiesenhöfer, W., Könen, W., Zonta, A.: *Adv. Synth. Catal.* 2003, **345**:717–728.
- [73] El Rassy, H., Maury, S., Buisson, P., Pierre, A. C.: *J. Non-Cryst. Solids* 2004, **350**:23–30.
- [74] Fernandez-Lafuente, R., Armisén, P., Sabuquillo, P., Fernández-Lorente, G., Guisán, J. M.: *Chem. Phys. Lipids.* 1998, **93**:185–197.
- [75] Palomo, J. M., Muñoz, G., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M.: *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2002, **19/20**:279–286.
- [76] Soares, C. M. F., dos Santos, O. A., Olivo, J. E., de Castro, H. F., de Moraes, F. F., Zanin, G. M.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2004, **29**:69–79.
- [77] Brabcová, J., Blažek, J., Janská, L., Krečmerová, M., Zarevúcka, M.: *Molecules.* 2012, **17**:13813–13824.
- [78] Uyanik, A., Sen, N., Yilmaz, M.: *Bioresource Technol.* 2011, **102**:4313–4318.
- [79] Yilmaz, E., Sezgin, M.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012, **166**:1927–1940.
- [80] Kwon, D. Y., Rhee, J. S.: *Kor. J. Ch. E.* 1984, **1**(2):153–158.
- [81] Kawakami, K.: *Biotechnol. Tech.* 1996, **10**(7):491–494.
- [82] Ursoiu, A., Paul, C., Kurtán, T., Péter, F.: *Molecules.* 2012, **17**:13045–13061.
- [83] Cao, L.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2005, **9**:217–226.
- [84] Brabcová, J., Demianová, Z., Vondrášek, J., Jágr, M., Zarevúcka, M., Palomo, J. M.: *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2013, **98**:62–72.
- [85] Petkar, M., Lali, A., Caimi, P., Daminati, M.: *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2006, **39**:83–90.
- [86] Norin, M., Boutelje, J., Holmberg, E., Hult, K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1988, **28**:527–530.
- [87] Fernández-Lorente, G., Ortiz, C., Segura, R., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M., Palomo, J. M.: *Biotechnol. Bioeng.* 2005, **92**(6):773–779.
- [88] Yamanaka, S. A., Nishida, F., Ellerby, L. M., Nishida, C. R., Dunn, B., Valentine, J. S., Zink, J. I.: *Chem. Mater.* 1992, **4**(3):495–497.
- [89] Dave, B. C., Dunn, B., Valentine, J. S., Zink, J. I.: *Anal. Chem.* 1994, **66**(22):1120A–1127A.
- [90] Braun, S., Shtelzer, S., Rappoport, S., Avnir, D., Ottolenghi, M.: *J. Non-Cryst. Solids* 1992, **147/148**:739–743.
- [91] Braun, S., Rappoport, S., Zusman, R., Avnir, D., Ottolenghi, M.: *Mater. Lett.* 1990, **10**:1–5.
- [92] Brinker, C. J., Keefer, K. D., Schaefer, D. W., Ashley, C. S.: *J. Non-Cryst. Solids* 1982, **48**:47–64.
- [93] Chen, K. C., Tsuchiya, T., Mackenzie, J. D.: *J. Non-Cryst. Solids* 1986, **81**:227–237.
- [94] Stöber, W., Fink, A., Bohn, E.: *J. Colloid Interface Sci.* 1968, **26**:62–69.
- [95] Bogush, G. H., Tracy, M. A., Zukoski IV, C. F.: *J. Non-Cryst. Solids* 1988, **104**:95–106.
- [96] Hench, L. L., West, J. K.: *Chem. Rev.* 1990, **90**:33–72.
- [97] Pope, E. J. A., Mackenzie, J. D.: *J. Non-Cryst. Solids* 1986, **87**:185–198.
- [98] Colby, M. W., Osaka, A., Mackenzie, J. D.: *J. Non-Cryst. Solids* 1988, **99**:129–139.
- [99] Brinker, C. J.: *J. Non-Cryst. Solids* 1988, **100**:31–50.
- [100] Avnir, D.: *Acc. Chem. Res.* 1995, **28**:328–334.
- [101] Lev, O., Tsionsky, M., Rabinovich, L., Glezer, V., Sampath, S., Pankratov, I., Gun, J.: *Anal. Chem.* 1995, **67**(1):22A–30A.
- [102] Colby, M. W., Osaka, A., Mackenzie, J. D.: *J. Non-Cryst. Solids* 1986, **82**:37–41.

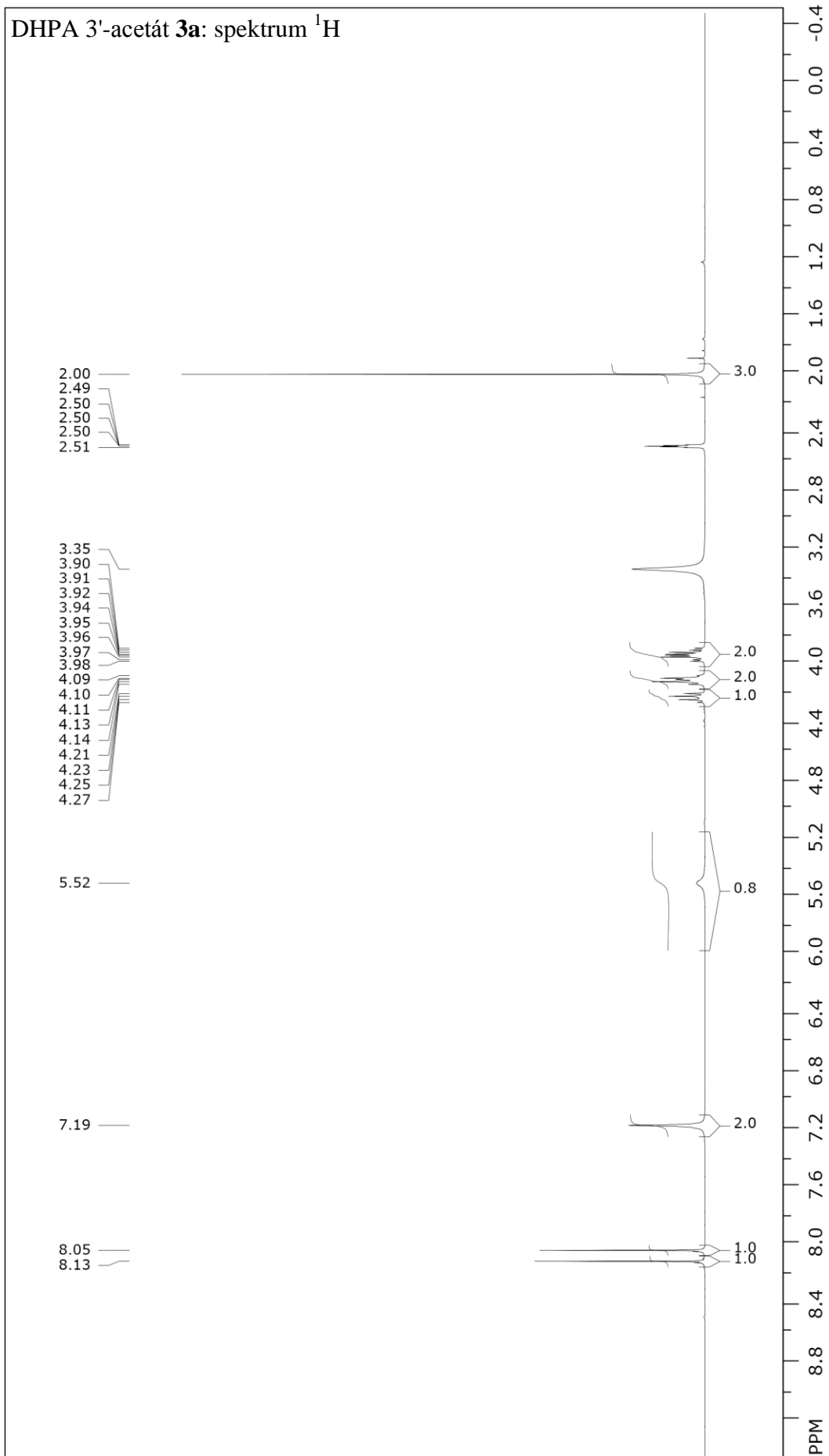
- [103] Corriu, R. J. P., Guerin, C., Henner, B. J. L., Chi Man, W. W. C. W.: *Organometallics*. 1988, **7**:237–238.
- [104] Reetz, M. T., Zonta, A., Simpelkamp, J., Rufinska, A., Tesche, B.: *J. Sol-Gel Sci. Techn.* 1996, **7**:35–43.
- [105] Noureddini, H., Gao, X.: *J. Sol-Gel Sci. Techn.* 2007, **41**:31–41.
- [106] Novak, B. M.: *Adv. Mater.* 1993, **5**(6):422–433.
- [107] Schubert, U., Hüsing, N., Lorenz, A.: *Chem. Mater.* 1995, **7**:2010–2027.
- [108] Inama, L., Diré, S., Carturan, G., Cavazza, A.: *J. Biotechnol.* 1993, **30**:197–210.
- [109] Avnir, D., Caoradin, T., Lev, O., Livage, J.: *J. Mater. Chem.* 2006, **16**:1013–1030.
- [110] Chen, J.-P., Hwang, Y.-N.: *Enzyme Microb. Biotechnol.* 2003, **33**:513–519.
- [111] Yi, Y., Neufeld, R., Kermasha, S.: *J. Sol-Gel Sci. Techn.* 2006, **38**:251–259.
- [112] Ciriminna, R., Pagliaro, M.: *Org. Process Res. Dev.* 2006, **10**:320–326.
- [113] Péter, F., Poppe, L., Kiss, C., Szocs-Bíró, E., Preda, G., Zarcuła, C., Oltenau, A.: *Biocatal. Biotransform.* 2005, **23**(3/4):251–260.
- [114] Kawakami, K., Urakawa, T., Oda, Y., Iwai, Y.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2009, **84**:1412–1417.
- [115] Meunier, S. M., Legge, R. L.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2010, **62**:54–58.
- [116] Kawakami, K., Yoshida, S.: *Biotechnol. Tech.* 1994, **8**(6):441–446.
- [117] Reetz, M. T., Zonta, A., Simpelkamp, J.: *Biotechnol. Bioeng.* 1996, **49**:527–534.
- [118] Noureddini, H., Gao, X., Joshi, S., Wagner, P. R.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2002, **79**(1):33–40.
- [119] Kawakami, K., Yoshida, S.: *Biotechnol. Tech.* 1995, **9**(10):701–704.
- [120] Soares, C. M. F., dos Santos, O. A. A., de Castro, H. F., Itako, J. E., de Moraes, F. F., Zanin, G. M.: *J. Non-Cryst. Solids* 2006, **352**:3469–3477.
- [121] Pierre, A. C.: *Biocatal. Biotransform.* 2004, **22**(3):145–170.
- [122] Internetové katalogy firem *Sigma-Aldrich* (USA) a *SynBiocat* (Maďarsko) obsahují v nabídce několik lipas (např. *CaLB* a *PfL*) imobilizovaných na sol-gelu.
- [123] Kawakami, K., Yoshida, S.: *J. Ferment. Bioeng.* 1996, **82**(3):239–245.
- [124] Reetz, M. T., Zonta, A., Simpelkamp, J., Könen, W.: *Chem. Commun.* 1996, (11):1397–1398.
- [125] Chen, J.-P., Lin, W.-S.: *Enzyme Microb. Biotechnol.* 2003, **32**:801–811.
- [126] Tomin, A., Weiser, D., Hellner, G., Bata, Z., Corici, L., Péter, F., Koczka, B., Pope, L.: *Process Biochem.* 2011, **46**:52–58.
- [127] Sayin, S., Yilmaz, E., Yilmaz, M.: *Org. Biomol. Chem.* 2011, **9**:4021–4024.
- [128] Pierre, M., Buisson, P., Fache, F., Pierre, A.: *Biocatal. Biotransform.* 2000, **18**:237–251.
- [129] Souza, R. L., Faria, E. L. P., Figueiredo, R. T., Fricks, A. T., Zanin, G. M., Santos, O. A. A., Lima, A. S., Soares, C. M. F.: *J. Therm. Anal. Calorim.* 2014, **117**(1):301–306.
- [130] Lee, S. H., Doan, T. T. N., Ha, S. H., Chang, W.-J., Koo, Y.-M.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2007, **47**:129–134.
- [131] Lee, S. H., Doan, T. T. N., Ha, S. H., Koo, Y.-M.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2007, **45**:57–61.
- [132] Sahin, O., Erdemir, S., Uyanik, A., Yilmaz, M.: *Appl. Catal. A: Gen.* 2009, **369**:36–41.
- [133] Zarcuła, C., Corici, L., Croitoru, R., Ursoiu, A., Peter, F.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2010, **65**:79–86.
- [134] Kuncová, G., Šivel, M.: *J. Sol-Gel Sci. Techn.* 1997, **8**:667–671.
- [135] Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1977, **74**(12):5463–5467.
- [136] Elion, G. B., Furman, P. A., Fyfe, J. A., de Miranda, P., Beauchamp, L., Schaeffer, H. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1977, **74**(12):5716–5720.
- [137] De Clercq, E., Holý, A.: *J. Med. Chem.* 1985, **28**:282–287.
- [138] Chu, C. K., Cutler, S. J.: *J. Heterocyclic Chem.* 1986, **23**:289–319.



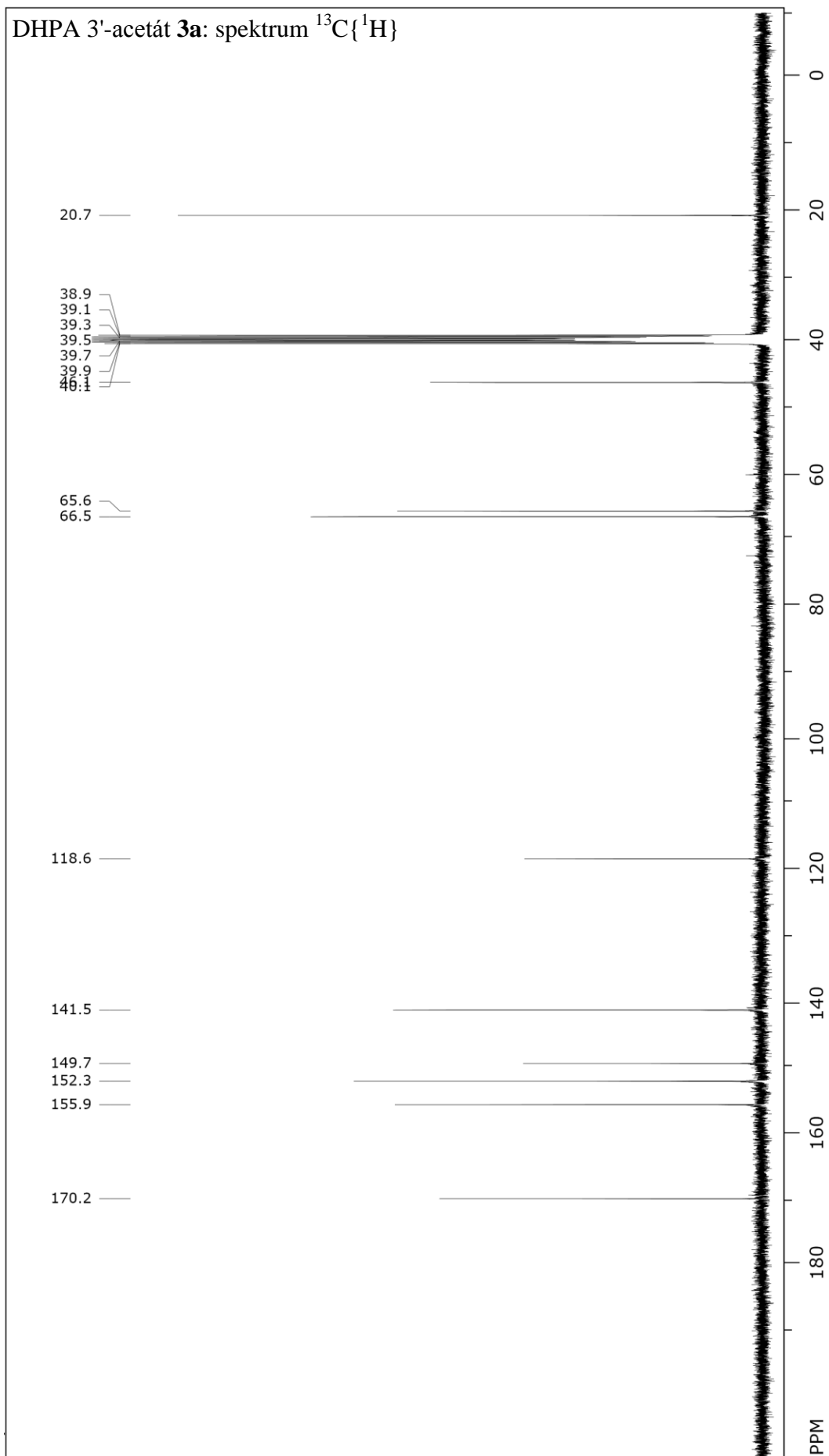
- [139] De Clercq, E.: *Nucleos. Nucleot.* 1994, **13**(6/7):1271–1295.
- [140] De Clercq, E.: *J. Clin. Vir.* 2004, **30**:115–133.
- [141] Schaeffer, H. J., Beauchamp, L., de Miranda, P., Elion, G. B., Bauer, D. J., Collins, P.: *Nature.* 1978, **272**:583–585.
- [142] Seita, T., Yamauchi, K., Kinoshita, M., Imoto, M.: *Bull. Chem. Soc. Japan.* 1972, **45**:926–928.
- [143] Holý, A.: *Collect. Czech. Chem. C.* 1975, **40**:187–214.
- [144] De Clercq, E., Holý, A.: *J. Med. Chem.* 1979, **22**(5):510–513.
- [145] De Clercq, E., Descamps, J., De Somer, P., Holý, A.: *Science.* 1978, **200**:563–565.
- [146] *Dvorana slávy. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR.* [online]. [cit. 1.8.2015]. URL: <http://www.uochb.cz/>.
- [147] Martin, J. C., Dvorak, C. A., Smee, D. F., Matthews, T. R., Vergeyden, J. P. H.: *J. Med. Chem.* 1983, **26**:759–761.
- [148] Boyd, M. R., Bacon, T. H., Sutton, D., Cole, M.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987, **31**(8):1238–1242.
- [149] Harnden, M. R., Jarvest, R. L., Bacon, T. H., Boyd, M. R.: *J. Med. Chem.* 1987, **30**:1636–1642.
- [150] De Clercq, E., Holý, A., Rosenberg, I., Sakuma, T., Balzarini, J., Maudgal, P. C.: *Nature.* 1986, **323**:464–467.
- [151] De Clercq, E., Sakuma, T., Baba, M., Pauwels, R., Balzarini, J., Rosenberg, I., Holý, A.: *Antivir. Res.* 1987, **8**:261–272.
- [152] Holý, A., Votruba, I., Merta, A., Černý, J., Veselý, J., Vlach, J., Šedivá, K., Rosenberg, I., Otmar, M., Hřebabecký, H., Trávníček, M., Vonka, V., Snoeck, R., De Clercq, E.: *Antiv. Res.* 1990, **13**:295–312.
- [153] De Clercq, E.: *Nature Rev. Drug Disc.* 2005, **4**:928–940.
- [154] Baszeczyński, O., Hocková, D., Janeba, Z., Holý, A., Jansa, P., Dračínský, M., Keough, D. T., Guddat, L. W.: *Eur. J. Med. Chem.* 2013, **67**:81–89.
- [155] Krečmerová, M., Holý, A., Pohl, R., Masojídková, M., Andrei, G., Naesens, L., Neyts, J., Balzarini, J., De Clercq, E., Snoeck, R.: *J. Med. Chem.* 2007, **50**:5765–5772.
- [156] Tichý, T., Andrei, G., Dračínský, M., Holý, A., Balzarini, J., Snoeck, R., Krečmerová, M.: *Bioorg. Med. Chem.* 2011, **19**:3527–3539.
- [157] Krečmerová, M., Pohl, R., Masojídková, M., Balzarini, J., Snoeck, R., Andrei, G.: *Bioorg. Med. Chem.* 2014, **22**:2896–2906.
- [158] Balzarini, J., Andrei, G., Balestra, E., Huskens, D., Vanpouille, C., Introini, A., Zicari, S., Liekens, S., Snoeck, R., Holý, A., Perno, C.-F., Margolis, L., Schols, D.: *PLOS Pathogens.* 2013, **9**(7):1–18.
- [159] Ettmayer, P., Amidon, G. L., Clement, B., Testa, B.: *J. Med. Chem.* 2004, **47**(10):2393–2404.
- [160] Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Järvinen, T., Savolainen, J.: *Nature Rev. Drug Disc.* 2008, **7**:255–270.
- [161] Huttunen, K., Raunio, H., Rautio, J.: *Pharmacol. Rev.* 2011, **63**:750–771.
- [162] Bildstein, L., Dubernet, C., Couvreur, P.: *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 2011, **63**:3–23.
- [163] Kataoka, K., Harada, A., Nagasaki, Y.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, **47**:113–131.
- [164] Liu, Z., Robinson, J. T., Sun, X., Dai, H.: *J. Am. Chem. Soc.* 2008, **130**:10876–10877.
- [165] Han, H.-K., de Vruet, R. L. A., Rhie, J. K., Covitz, K.-M. Y., Smith, P. L., Lee, C.-P., Oh, D.-M., Sadée, W., Amidon, G. L.: *Pharm. Res.* 1998, **15**(8):1154–1159.
- [166] Wagner, C. R., Iyer, V. V., McIntee, E. J.: *Med. Res. Rev.* 2000, **20**(6):417–451.
- [167] Hecker, S. J., Erion, M. D.: *J. Med. Chem.* 2008, **51**:2328–2345.
- [168] Liederer, B., Borchardt, R.: *J. Pharm. Sci.* 2006, **95**:1177–1195.
- [169] Laemmli, U. K.: *Nature.* 1970, **227**:680–685.
- [170] Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.* 1976, **72**:248–254.

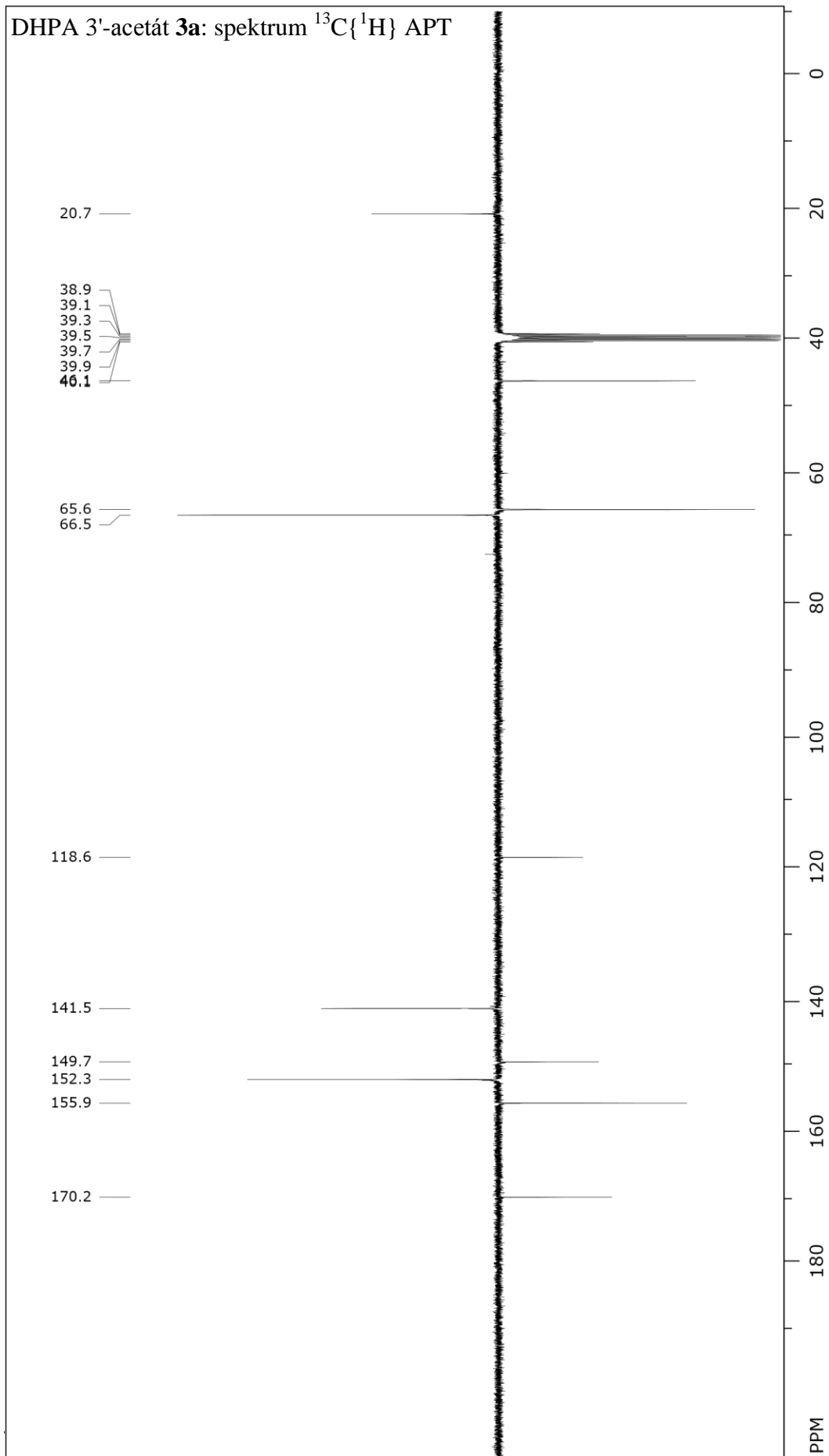
- [171] Eckschlager, K., Horsák, I., Kodejš, Z.: *Vyhodnocování analytických výsledků a metod*. Praha: SNTL, 1980.
- [172] Miles, J., Banyard, P.: *Understanding and Using Statistics in Psychology: A Practical Introduction*. Londýn: SAGE Publications, 2007.
- [173] *Lipase AK "Amano"*. Amano Enzyme. [online]. [cit. 29.7.2015]. URL: <http://www.amano-enzyme.co.jp/>.
- [174] *GRAS Notification for Lipase derived from Penicillium camembertii*. Food and Drug Administration. [online]. [cit. 30.7.2015]. URL: <http://www.fda.gov/>.
- [175] Sugiura, M., Oikawa, T.: *Biochim. Biophys. Acta*. 1977, **489**:262–268.
- [176] Ferraboschi, P., Casati, S., de Grandi, S., Grisenti, P., Santaniello, E.: *Biocatalysis*. 1994, **10**:279–288.
- [177] Naemura, K., Fukuda, R., Murata, M., Konishi, M., Hirose, K., Tobe, Y.: *Tetrahedron: Asymmetry*. 1995, **6**(9):2385–2394.
- [178] Mannesse, M. L. M., Boots, J.-W. P., Dijkman, R., Slotboom, A. J., van der Hijden, H. T. W. M., Egmond, M. R., Verheij, H. M., de Haas, G. H.: *Biochim. Biophys. Acta*. 1995, **1259**:56–64.
- [179] Miled, N., Roussel, A., Bussetta, C., Berti-Dupuis, L., Rivière, M., Buono, G., Verger, R., Cambillau, C., Canaan, S.: *Biochemistry*. 2003, **42**:11587–11593.
- [180] Wei, Y., Peng, A.-Y., Wang, B., Ma, L., Peng, G., Du, Y., Tang, J.: *Eur. J. Med. Chem.* 2014, **74**:751–758.
- [181] Scholze, H., Stütz, H., Paltauf, F., Hermetter, A.: *Anal. Biochem.* 1999, **276**:72–80.
- [182] Carnero, A., Sanghvi, Y. S., Gotor, V., Fernández, S., Ferrero, M.: *Org. Process Res. Dev.* 2015, **19**(7):701–709.
- [183] Castillo, E., Dossat, V., Marty, A., Condoret, J. S., Combes, D.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997, **74**(2):77–85.
- [184] Wu, S.-H., Guo, Z.-W., Sih, C. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 1990, **112**:1990–1995.

# PŘÍLOHA

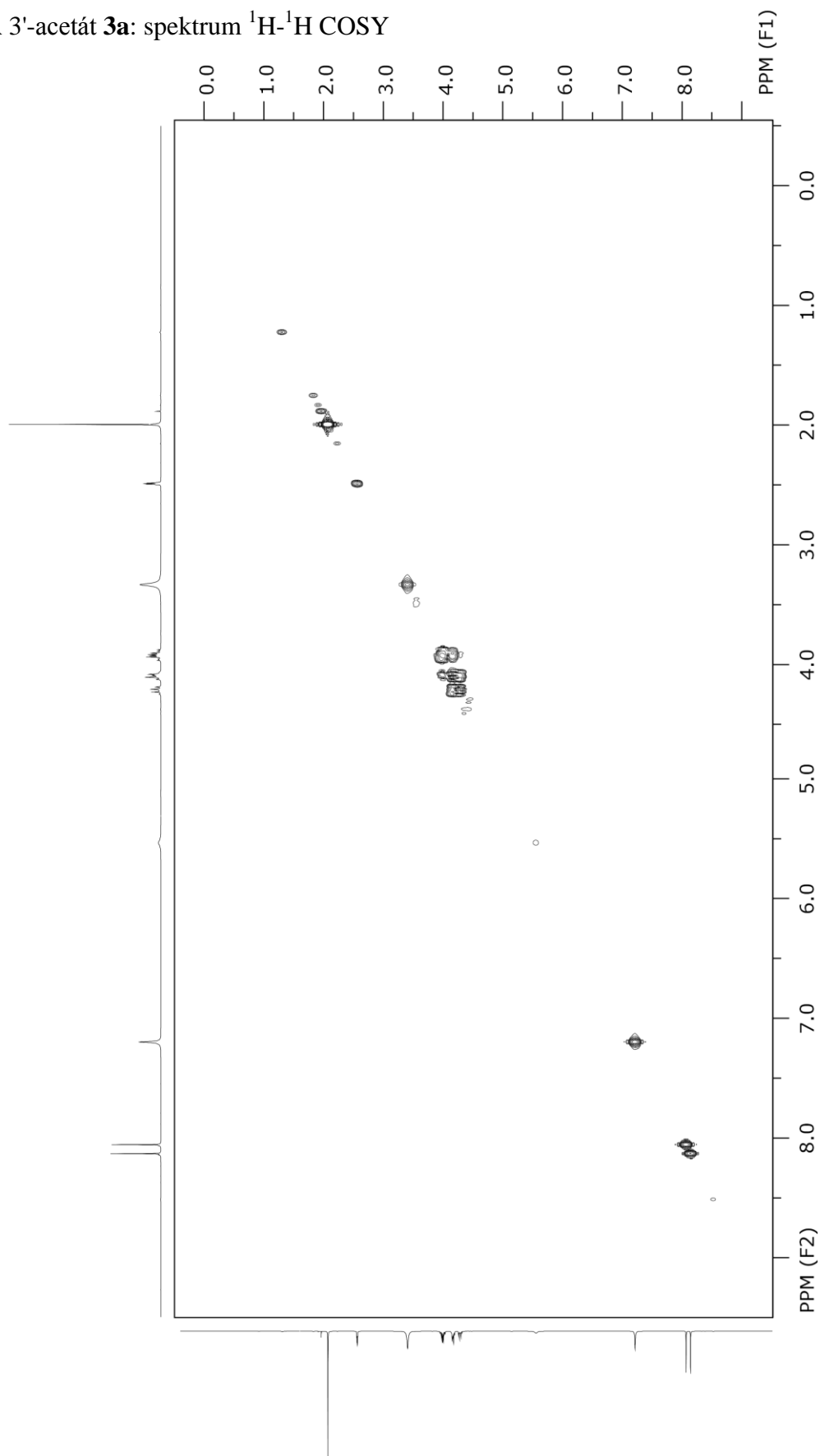


DHPA 3'-acetát **3a**: spektrum  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$

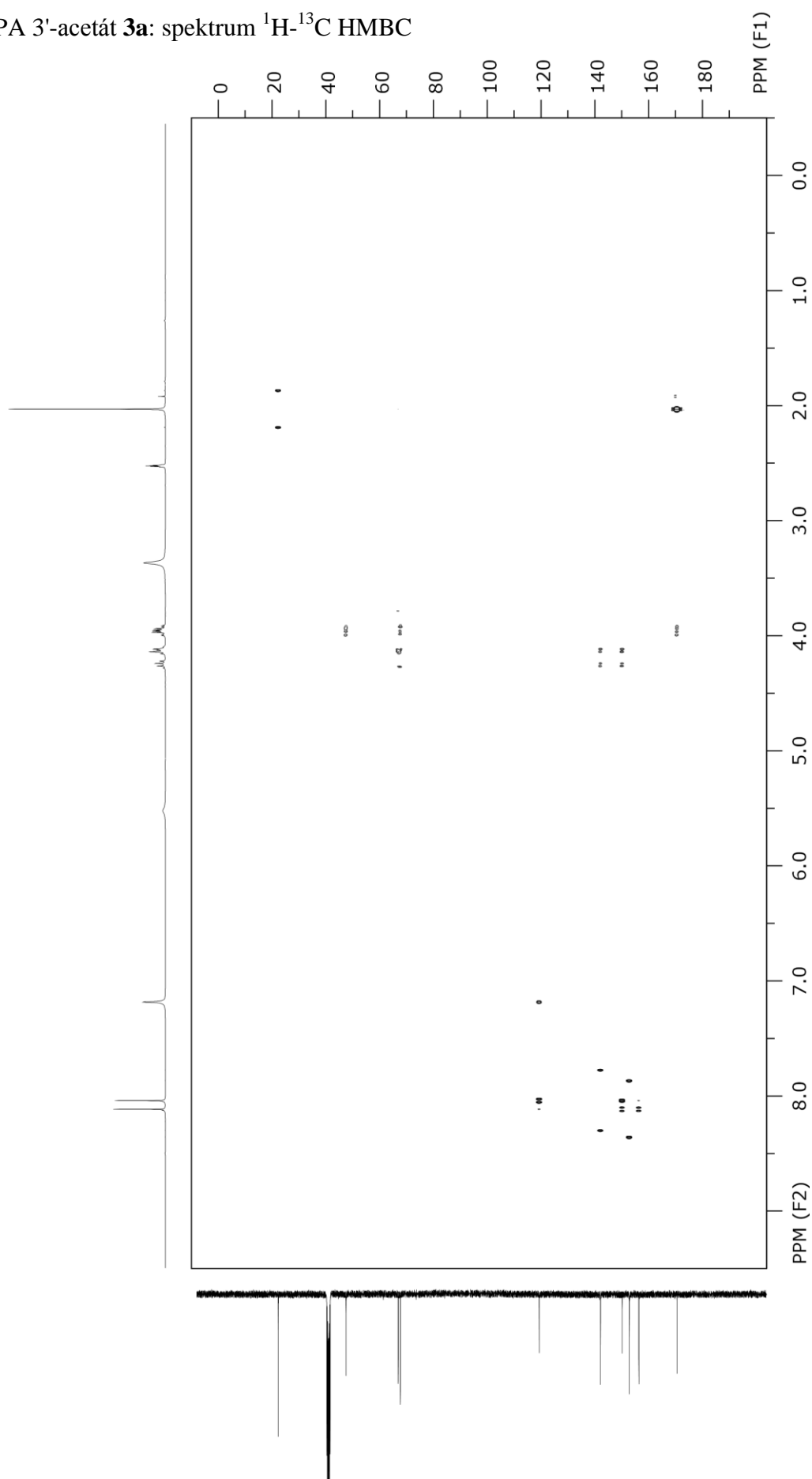




DHPA 3'-acetát **3a**: spektrum  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY

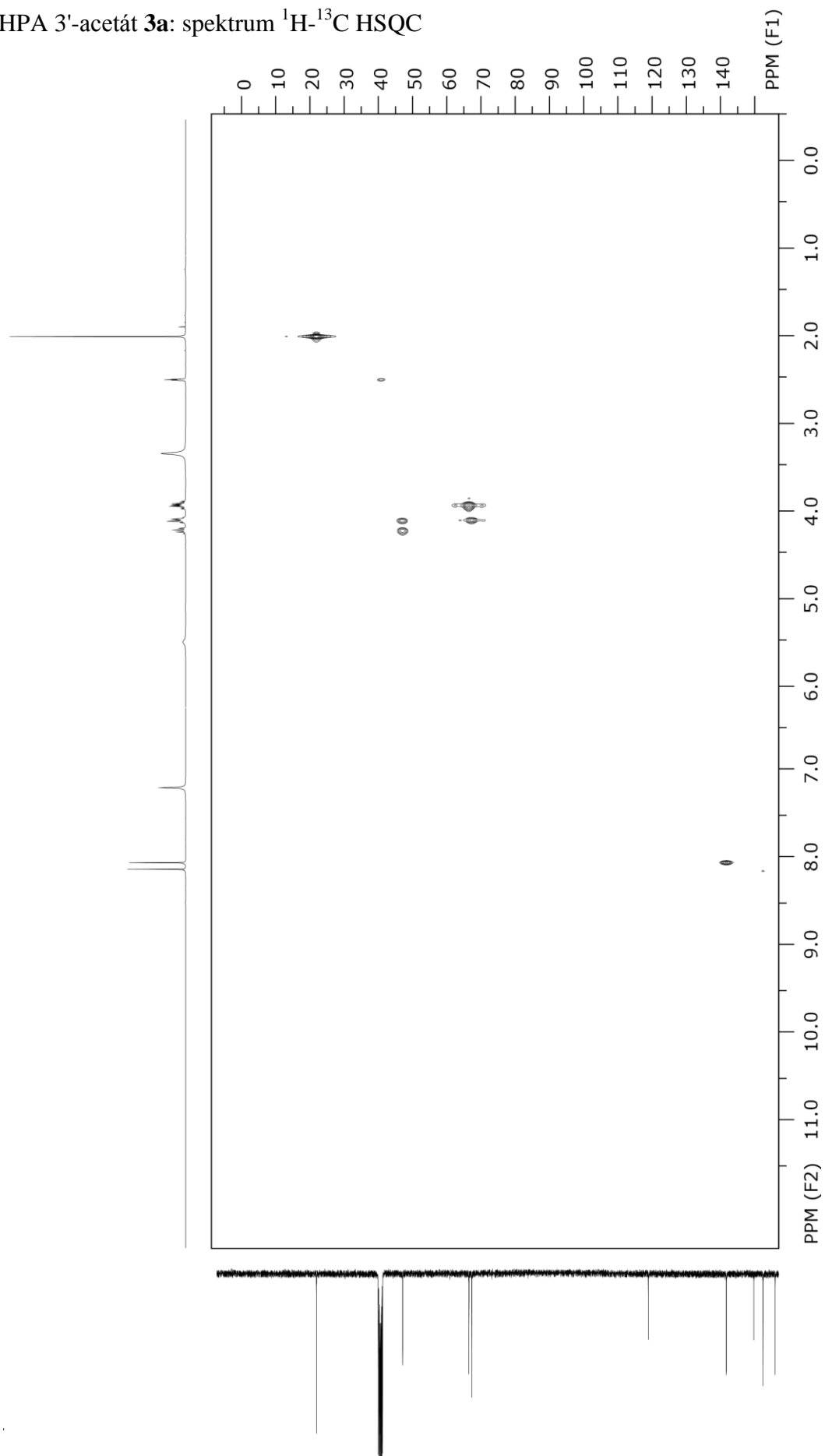


DHPA 3'-acetát **3a**: spektrum  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC





DHPA 3'-acetát **3a**: spektrum  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC



P106-S

### **Esterification of 9-(2,3-dihydroxypropyl)adenine by sol-gel immobilized *Pseudomonas fluorescens* lipase**

M. Tupec<sup>1,2</sup>, M. Zarevúcka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, 166 10 Prague 6, Flemingovo n. 2, Czech Republic* <sup>2</sup> *Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, 128 43 Prague 2, Hlavova 8, Czech Republic, e-mail: michal.tupec@natur.cuni.cz*

Different free lipases have been used previously for the esterification of antiviral compound 9-(2,3-dihydroxypropyl)adenine (DHPA) in a polar solvent [1]. Based on this work, the lipase from *Pseudomonas fluorescens* was chosen for its good catalytic properties towards longer chain vinyl esters, and it was immobilized by the sol-gel method using three types of hydrophobic silane precursors: propyl-, octyl- and phenyltrialkoxysilane.

The prepared immobilized biocatalysts were characterized by means of their transesterification and hydrolytic activities towards model substrates, 4-nitrophenol and its esters. The sol-gel lipases were then used for esterification of DHPA with vinyl esters of various chain lengths (C2 to C16) in a nonpolar solvent; the reactions proceeded with up to 90 % conversion of DHPA.

**Acknowledgments** This study has been financially supported by a research project

of the Academy of Sciences of the Czech Republic (Project No. M200551203). The work is a part of a research project of the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR (RVO: 61388963).

**References**

[1] Brabcová, J., Blažek, J., Janská, L., Krečmerová, M., Zarevúcka, M.: Lipases as Tools in the Synthesis of Prodrugs from Racemic 9-(2,3-Dihydroxypropyl)adenine. *Molecules*, **17** 13813–13824 (2012).

---

P107

### **Evolution of fatty acid content during alcoholic fermentation of Carménère wine using GC-FID**

S. Restrepo<sup>1</sup>, A. Urtubia<sup>2,3</sup>, A. Ceballos<sup>2</sup>, M. Valdenegro<sup>3</sup>, L. Espinoza<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Department of Chemistry, Universidad Técnica Federico Santa María, Av. España 1680, Valparaíso, Chile.* <sup>2</sup> *Department of Chemical and Environmental Engineering, Universidad Técnica Federico Santa María, Av. España 1680, Valparaíso, Chile, e-mail: alejandra.urtubia@usm.cl* <sup>3</sup> *Centro Regional de Estudios en Alimentos Saludables (CREAS). Av. Universidad 330, Placilla, sector Curauma, Valparaíso, Chile.*

Fatty acids play an important role during wine alcoholic fermentation; however, they have not been studied with detail, specifically their behavior across the fermentation. Previous studies revealed two kinds of fatty acid during the progress the alcoholic fermentation and with different roles.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka