



BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

és



IVAX GYÓGYSZERKUTATÓ INTÉZET
FERMENTÁCIÓS KÍSÉRLETI ÜZEM

Aril- és aralkil-metil ketonok sztereoszelektív redukciója élesztőkkel

Ph.D. értekezés

Erdélyi Balázs

Budapest
2004

A doktori iskola neve: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Biotechnológia

vezetője: Dr. Fekete András
egyetemi tanár
BCE, Fizika és Automatizálási Tanszék

Témavezető: Dr. Hoschke Ágoston
egyetemi tanár
BCE, Élelmiszertudományi Kar, Sör- és Szeszipari Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Dr. Fekete András
Iskolavezető jóváhagyása

.....
Dr. Hoschke Ágoston
Témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Doktori Tanács 2005 február 22-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Biacs Péter, DSc

Tagjai

Deák Tibor, Dsc

Halász Anna, DSc

Kosáry Judit, DSc

Rezessyné Szabó Judit, PhD

Opponensek

Nyeste László, DSc

Poppe László, DSc

Titkár

Rezessyné Szabó Judit, PhD

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS

<u>1.1 A TALAMPANEL JELENTŐSÉGE ÉS ELŐÁLLÍTÁSA</u>	7
<u>1.2 KITŰZÖTT CÉLOK</u>	8

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

<u>2.1 A BOKATALÍZIS FEJLŐDÉSE ÉS SZEREPE NAPJAINKBAN</u>	10
<u>2.2 MIKROBIOLÓGIAI FEJLESZTÉSEK A GYÓGYSZERKUTATÓ INTÉZETBEN</u>	14
<u>2.3 NÉHÁNY BIOTRANSZFORMÁCIÓS ALAPFOGALOM</u>	16
<u>2.3.1 Konverzió</u>	16
<u>2.3.2 Hozam</u>	17
<u>2.4 AZ ENZIMEK JELLEMZÉSE</u>	17
<u>2.4.1 Az enzimműködés</u>	17
<u>2.4.2 A biokatalizátorok előnyei a kémiai katalizátorokkal szemben</u>	19
<u>2.4.3 A biokatalizátorok hátrányai</u>	19
<u>2.4.4 Az enzimek három szelektivitása</u>	20
<u>2.5 EGÉSZ-SEJTES RENDSZEREK, VAGY IZOLÁLT ENZIMEK</u>	20
<u>2.6 KIRALITÁS</u>	23
<u>2.6.1 A kiralitás fogalmának bevezetése</u>	23
<u>2.6.2 A sztereokémia néhány alapvető fogalma</u>	23
<u>2.6.3 Az enantiomerek arányának meghatározása</u>	24
<u>2.6.4 Az enzimek sztereoszelektivitásának magyarázata: 3 pontos szabály</u>	25
<u>2.6.5 A szelektivitás kinetikai okai</u>	27
<u>2.6.6 Módszerek az enantiomerek arányainak meghatározására</u>	29
<u>2.7 A KIRALITÁS JELENTŐSÉGE A GYÓGYSZERIPARBAN</u>	29
<u>2.7.1 Néhány gyógyszeripari példa</u>	30
<u>2.7.2 Régi gyógyszerek új élete</u>	32
<u>2.8 A TALAMPANEL</u>	33
<u>2.8.1 A Talampanel szintézise</u>	34
<u>2.8.2 A királis alkohol előállítása</u>	35
<u>2.8.3 A biokatalizátor: Zygosaccharomyces rouxii</u>	38
<u>2.8.4 A Z. rouxii alkohol dehidrogenázának jellemzése</u>	40
<u>2.8.5 A Debaryomyces hansenii</u>	41
<u>2.8.6 Az acetofenon, fenilacetone és benzilacetone, valamint néhány származékuk sztereoszelektív bioredukciója</u>	42
<u>2.8.7 A biokatalizátor tárolása</u>	43
<u>2.9 A 21. SZÁZAD ADH BOKATALIZÁTOR TERVEZÉSI STRATÉGIÁJA</u>	45

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

<u>3.1 A KÍSÉRLETEK ÉS MÉRÉSEK HELYSZÍNEI</u>	46
<u>3.2 A BOKATALIZÁTORÉNT ALKALMAZOTT ÉLESZTŐTÖRZSEK</u>	46
<u>3.3 TÁPTALAJOK</u>	46
<u>3.4 A SEJTNYÉSZTÉS</u>	48
<u>3.4.1 Törzsfenntartás</u>	48
<u>3.4.2 Az inokulum tenyészet előállítása</u>	48
<u>3.4.3 A biokatalizátor főfermentációs szaporítása és szeparálása</u>	48
<u>3.4.4 Sejtkoncentráció meghatározása</u>	49
<u>3.4.5 Az ülepített nedves sejtörmeg mérése (PMW)</u>	50
<u>3.4.6 A sejtmassza tisztítása</u>	50
<u>3.5 A BIOREDUKCIÓ</u>	51
<u>3.5.1 Laboratóriumi lépték, gyanta nélkül</u>	51
<u>3.5.2 Laboratóriumi lépték, gyantát tartalmazó reakcióelegy</u>	51
<u>3.5.3 Léptéknövelt bioredukció</u>	51
<u>3.5.4 Liofilizálás</u>	52
<u>3.5.5 Bioredukció liofilizált sejt alkalmazásával</u>	52
<u>3.6 ANALITIKAI MÓDSZEREK</u>	52
<u>3.6.1 Mintavétel gyantát tartalmazó reakcióelegyből</u>	52
<u>3.6.2 Az alkalmazott VRK módszer</u>	53
<u>3.6.3 HPLC módszer az enantiomerek elválasztására</u>	53

<u>4. EREDMÉNYEK</u>	
<u>4.1 A (3,4-METILÉNDIOXIFENIL)ACETON SZTEREOSZELEKTÍV BIOREDUKCIÓJÁNAK LÉPTÉKNÖVELÉSE</u>	54
<u>4.1.1 A sejtermelés fejlesztése és a sejtmassza előállítás 1000 literes fermentorban</u>	54
<u>4.1.2 A bioredukció fejlesztése</u>	59
<u>4.2 MULTI-FUNKCIONÁLIS MINTAVEVŐ BERENDEZÉSEK GYANTÁT ALKALMAZÓ REAKCIÓNELÉGYHEZ</u>	64
<u>4.2.1 A mintavevő berendezés működésének bemutatása</u>	64
<u>4.2.2 A mintavevő berendezés egyszerűsített változata</u>	65
<u>4.3 A Z. ROUXII KARBONIL REDUKTÁZ AKTIVITÁSÁNAK JELLEMZÉSE</u>	66
<u>4.4 A D. HANSENI KARBONIL REDUKTÁZ AKTIVITÁSÁNAK JELLEMZÉSE</u>	70
<u>4.4.1 A koszubsztrát kiválasztása</u>	70
<u>4.4.2 Kísérletek nagyobb hozam elérésére</u>	71
<u>4.4.3 A szubsztrát tolerancia vizsgálata</u>	72
<u>4.5 A LIOFILIZÁLT BIOKATALIZÁTOROK ADH AKTIVITÁSA</u>	73
<u>4.5.1 A fagyasztás módjának hatása a biokatalizátorra</u>	73
<u>4.5.2 A liofilizált Z. rouxii és a friss sejtmassza ADH enzimaktivitásának összehasonlítása</u>	74
<u>4.5.3 A liofilizált D. hansenii és a friss sejtmassza ADH enzimaktivitásának összehasonlítása</u>	74
<u>4.6 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK</u>	76

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....

6. ÖSSZEFOGLALÁS.....

7. ABSTRACT.....

8. IRODALOMJEGYZÉK.....

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADH	alkohol de hidrogenáz (EC 1.1)
cfu	telepképző egység (colony forming unit)
CLS	kukoricalekvár felülúszó (Corn steep Liquor Sedimentant)
DO	relatív oldott oxigén koncentráció (D issolved O xygen)
EC	Nemzetközi Enzimbizottság (E nzyme C ommission)
ee	enantiomer felesleg (e nantiomeric e xcess)
FDA	az Egyesült Államok élelmiszer és gyógyszerellenőrzési hivatala (F ood and D rug A dministration)
FDH	fruktóz de hidrogenáz
HPLC	nagy felbontású folyadékkromatográfia (H igh P ressure L iquid C hromatography)
IUPAC	Elméleti és Alkalmazott Kémia Nemzetközi Egyesülete (I nternational U nion of P ure and A pplyed C hemistry)
MDA	(3,4- metiléndio xifenil) ac eton
NADP	n ikotinsavamid- a denin- d inukleotid f oszfát
PMW	ülepített micélium tömeg (P acked M ycelia W eight)
PPG	poli propilén- g likol
rpm	percenkénti fordulatszám (r otation p er m inute)
VRK	vékonyréteg k romatográfia
vvm	térfogat (levegő)/térfogat (táptalaj)/perc (v olume/ v olume/ m inute)

1. BEVEZETÉS

1.1 A Talampanel jelentősége és előállítása

A sztereoszelektív reakciókkal előállított termékek, illetve szintézis köztermékek mind nagyobb számban fordulnak elő a mai gyógyszerszintézisekben. A növekvő számú, könnyen hozzáférhető enzimek – többek között a biokatalizált reakciók enyhe körülményei miatt – egyre jobban háttérbe szorítják a kémiai katalizátorokat.

A Talampanel az epilepszia kezelésére szolgáló, hatékony és mellékhatásoktól mentes leendőbeli gyógyszerkészítmény, ami jelen pillanatban a második klinikai vizsgálatok lezárásánál tart. Szokásos jelölései: GYKI-53773, LY-300164, molekulatömege: 337,3820. A mértékadó gyógyszeripari figyelő, az Ensemble (Prous Science) a bevezetés évére félmilliárd USD feletti forgalmat prognosztizál. A Talampanel Intézetünkben (az akkori Gyógyszerkutató Intézet) találták fel, majd jelenlegi tulajdonosunk (IVAX Co., Miami, Florida, USA) az Eli Lilly gyógyszeripari vállalattal közösen döntött a gyógyszer világpiacon történő bevezetése mellett.

A hatóanyag jótékony hatását nem kizárólag az epilepsziában szenvedők fogják élvezni. Széles körben alkalmazható görcsoldó, pl. elektrosokk, vagy nikotin-túladagolás okozta roham megszűnését is elősegíti. Egereken vizsgálták a Talampanel oxotremorin, illetve harmalin által keltett remegés csillapító hatását is.

A GYKI-53773 jelű molekula vázizom görcsök oldásában játszott szerepe is bizonyított. Egy modellkísérletben megállapították, hogy az agyi ischaemiát szenvedő patkányok agysejtjeinek túlélését 47%-kal növeli meg a Talampanel, így akár egy ambulanciás mentőorvos állandó tartozéka is lehet a Talampanel. A különböző koponyasérülések esetében ez a megnövelt túlélési idő rengeteg agysérülést szenvedett ember életét mentheti meg. Patkányokon előidézett autoimmun agylágyulás szimptomáit pedig 78%-kal csökkentette a megfelelő dózis adagolása mellett.

Az ipari léptékű szintézisút kifejlesztése Intézetünk feladata lett. A hétlépéses szintézis első lépése a prokirális (3,4-metiléndioxifenil)aceton sztereoszelektív redukciója, amelynek során a célmolekula királis centruma keletkezik. Ez a lépés a szintézis kulcslépése, aminek kémiai szintézise extrém körülményeket és környezetre ártalmas katalizátor alkalmazását követelné meg. A keletkezett (S)-alkoholt 4-nitro-benzaldehiddel kell kondenzálni, majd lúgos körülmények között dimetilformamidban oxidálni, amit egy acetyl-hidrazinos kezelés követ. A hidroxil csoport ciklizálása nátrium-hidroxid segítségével, erősen lúgos kémhatású közegben történik. A szintézis utolsó lépése a nitro csoport redukciója.

Tekintve a hatóanyag jelenét, és reményt keltő jövőjét, rendkívül fontossá vált a szintézis üzemi léptékű kidolgozása, különös tekintettel a szintézis első lépésére, ahol a Talampanel királis centruma alakul ki. A gazdaságos szintézishez először a biokatalizátor költséghatékony előállítását kellett megoldanunk. Biokatalizátorként a korábban laboratóriumi körülmények között erre a célra kiválasztott *Zygosaccharomyces rouxii*-t választottuk. Ez a valódi élesztő korábban más sztereoszelektív redukcióban még nem, sőt léptéknövelt, üzemi körülmények között pedig információink szerint soha nem került alkalmazásra. Sőt, gyantát alkalmazó reakcióelegyet sem alkalmaztak még a biotranszformációs iparban.

Az optikailag aktív propanol előállításának másik lehetséges módja a kémiai módon egyszerűen előállítható racemát alkohol sztereospecifikus acilezése lipázzal. Ennek a módszernek egyértelmű hátránya, hogy megnöveli a szintézis lépéseinek számát, valamint extrém körülményeket is tartalmaz, így kevésbé környezetbarát a módszer.

A Talampanel lehetséges utódmolekuláinak előállítása érdekében, valamint a *Zygosaccharomyces rouxii* alkohol dehidrogenáz (ADH) aktivitásának jellemzése céljából egy sor aril metil keton sztereoszelektív redukcióját végeztük el. A *Candida famata* diploid változata, a *Debaryomyces hansenii* és a *Z. rouxi* élesztő alkohol dehidrogenáz enzimrendszerének szubsztrátspecifitását hasonlítottuk össze.

1.2 Kitűzött célok

Korábbi tapasztalatok alapján ADH enzimaktivitása miatt már kiválasztott élesztő számomra is megfelelőnek bizonyult, ezért célnak tűztem ki a mikroorganizmus vizsgálatát, valamint a (3,4-metiléndioxifenil)aceton üzemi léptékű bioredukcióján keresztül az (S)-1-(3,4-metiléndioxifenil)propán-2-ol üzemi léptékű előállításához szükséges vizsgálatok elvégzését. Célkitűzéseimet az alábbi pontokban foglalom össze:

I. A biokatalizátor, optimalizált előállítása

1. A *Z. rouxii* fenntartásának, és enzimstabilitásának vizsgálata.
2. A megfelelő táptalajok kifejlesztése; a világon bárhol beszerezhető, állati eredetű komponenseket nem tartalmazó (egészségügyi előírások miatt, ld. BSE) inokulum és sejtermelő táptalajok kifejlesztése gazdaságossági szempontok figyelembevételével.
3. Az inokulum és a sejtermelő fermentáció körülményeinek optimalizálása.
4. A sejtmassza tárolhatóságának vizsgálata.

II. A bioredukció fejlesztése

1. A hőmérséklet, pH, levegőztetés hatása a biokonverzióra.
2. A legmegfelelőbb keverési módszer kidolgozása, a gyanta mechanikai behatásokkal szembeni védelme.
3. A koszubsztrát minőségének és mennyiségének hatása a sztereoszelektivitásra, valamint a hozamra.
4. A bioredukció reprodukálhatóságának növelése.

III. A Talampanel utódmolekuláinak szintézise is napirendre került, ezért egy olyan mikroorganizmust kellett keresnem, melynek szubsztrát toleranciája nagyobb, mint a *Z. rouxii*-é. Így került bevezetésre a *Debaryomyces hansenii*. Össze kellett hasonlítanom a *Z. rouxii* és a *D. hansenii* ADH enzimrendszerét egy sor aril metil ketonon. A biokatalizátor tárolhatóságának kézenfekvő lehetősége a szárítás, ezért a liofilizált, majd regenerált sejtmasszák aktivitását is meg kellett vizsgálnom.

1. A kiválasztott aril ketonok redukciója, az eredmények értékelése és összehasonlítása.
2. A különböző fagyasztási módok hatékonyságának vizsgálata.
3. A friss és a liofilizált sejtmassza enzimaktivitásainak összevetése, értékelése.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

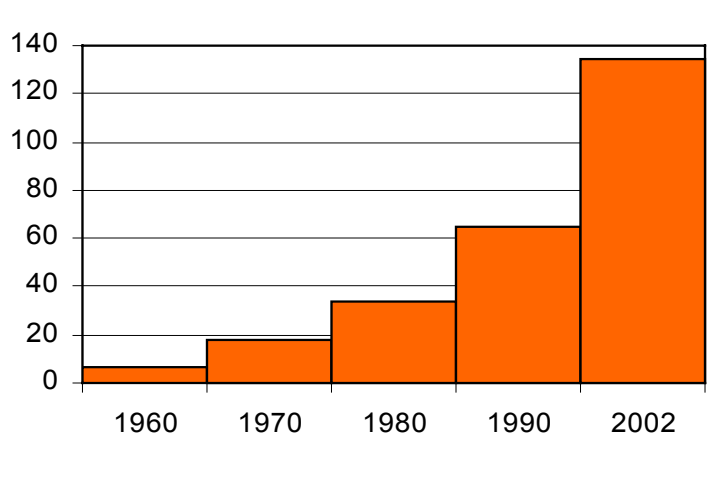
2.1 A biokatalízis fejlődése és szerepe napjainkban

Mára a köznyelvben is oly általánosan elterjedt katalízis szót meglepően régen, 1836-ban keltette életre Jöns Jakob Berzelius, svéd kémikus, aki számos *biokatalizált* folyamatot jegyzett fel, igaz ő még nem foglalkozott a reakciók hajtómotorjával [Laidler 1997]. Ugyanebben az évben Berzelius kortársa, Schwann a gyomornedvekből nyert húst emésztő aktív szubsztanciát pepszinnek keresztelte el (1. táblázat) [Perham 1976]. Csak 40 évvel később vezették be az enzim elnevezést a természetben lejátszódó kémiai reakciók katalizátoraira [Kühne 1876]. A biokatalízis ekkor kezdte meg gyors fejlődését, négy évvel később már ipari körülmények között fermentáltak optikailag tiszta tejsavat [Sheldon 1993]. Zemplén Géza 1914-ben jelentette meg az első kb. 150 oldalas magyar nyelvű összefoglalóját az enzimek kémiai alkalmazásáról [Zemplén 1914]. A következő mérföldkövet jelentő felismerés 1923-ból származik: L-szorbózt sikerült előállítani *Acetobacter suboxydans* segítségével D-szorbitolból [Kluyver 1924], ami később az aszkorbinsav szintézis kulcslépésévé vált [Reichstein 1934]. Az ötvenes években megindult a szteroidok ipari léptékű átalakítása: a progeszteron régióspecifikus hidroxilezését *Rhizopus arrhizus* törzssel végezték el [Peterson 1952]. Az ötvenes évektől egy nagyon intenzív fejlődésen ment keresztül a biotranszformációs ipar, valamennyi komoly gyógyszeripari résztvevő kialakította biotechnológiai részlegét, fermentációs üzemeket építettek. Magyarországon, 1950-ben hat állami gyógyszervállalat közös vállalataként alapított Gyógyszerkutató Intézetben kezdődtek meg a mikrobiológiai átalakítások fejlesztését célzó kutatások.

1. táblázat Mérföldkövek az enzimműködés alkalmazásában [Liese 2000, Gutfreund 1976]

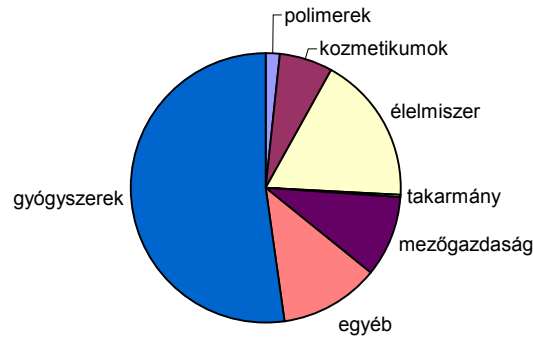
-
- 1836:** (Schwann) Hús *in vitro* emésztése pepszinnel
1876: (Kühne) Az "**enzim**" név és fogalom
1890: (Takamine Co.) Takadisztáz - az első iparilag alkalmazott enzimkészítmény
1897: (Hill) Az enzimműködés reverzibilis (hidrolázok)
1906: (Pottevin) Metil oleát szintézise gyakorlatilag szerves közegben (MeOH + ojsav)
1913: (Michaelis, Menten) Az enzimműködés kinetikai alapjai
1926: (Sumer) Ureáz: az első kristályos fehérje. Az enzim⇌fehérje kapcsolat felismerése
1950-es évek (Watson, Crick és többen) A DNS, RNS szerkezete, a genetikai kód
1967: (Phillips) Lizozim - Röntgen kristallográfia: az első fehérje harmadlagos szerkezete
1969: (Gutte, Merrifield) A Ribonukleáz A enzim kémiai totálszintézise 11'931 műveletben
1969: (Tanabe Co) Az első iparilag alkalmazott rögzített enzim (Aminoaciláz⇌L-metionin)
1983: (Ensley) Az első iparilag alkalmazott rekombináns mikroorganizmus
(*Pseudomonas putida* gének → *Escherichia coli* → indigó előállítás)
1986: (Klibanov) Az enzimek többsége működőképes "vízmentes" szerves közegben
1992: (Milton, Petsko) HIV-1 proteáz (99 aminosav) enantiomer formájának szintézise
D-aminosavakból (az enzimek sztereoselektivitásának forrása kiralitásuk)
-

Napjainkra már számos enzim és egész-sejtes rendszer elérte a “reagens” állapotot, a szintetikus kémikusok úgy kezelik azokat, mint bármely más modern szintetikus eszközt, létjogosultságuk megkérdőjelezhetetlen. Az elmúlt időszakban nagyszámú könyv és áttekintő cikk jelent meg az ipari, vagy legalábbis léptéknövelt technológiák bemutatásának céljából [Faber 2004, Zaks 2001, Liese et al. 2000, Bornsheuer et al. 2000, Peters et al. 1998, Liese 1999, Patel 2000, Poppe és Novák 1992]. Az elmúlt negyven évben az iparilag is megvalósult biotranszformációk száma 2002-re elérte a 134-et. Az 1. ábra jól szemlélteti a növekedés felgyorsult ütemét [Straathof et al. 2002].



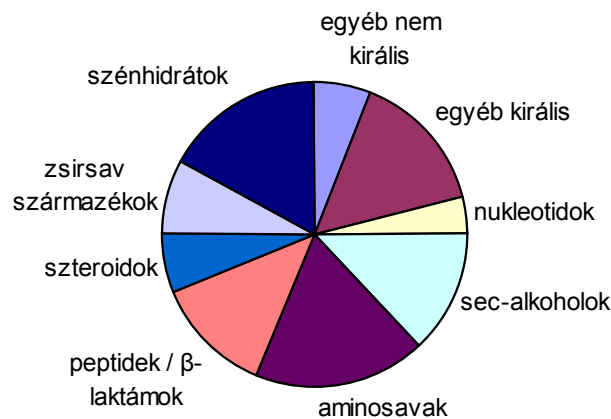
1. ábra Az iparilag megvalósult biotranszformációs technológiák kumulatív száma

A hozzáférhető adatokat alsó határként kell kezelni, mert természetesen előfordulhat, hogy a gyártók egy része szintézisútjaikat nem publikálják, eredményeiket semmilyen formában nem hozzák nyilvánosságra. Cheetham és társai szerint a növekedés üteme várhatóan fennmarad [Cheetham et al. 2000]. Amennyiben az ipari termelésbe bevont biotranszformációs eljárások ipari szektoronkénti megoszlását vizsgáljuk, úgy megállapítható, hogy a legtöbb enzimkatalizált reakció a gyógyszeripar területéről származik (2. ábra). A gyógyszeripar 50% feletti részesedésének magyarázata abban rejlik, hogy a sztereoselektivitás jelentősége itt a legnagyobb, a biotranszformációs eljárások ezen a területen bírnak a legtöbb gazdaságossági előnnyel [Rasor és Voss 2001].



2. ábra Az iparilag megvalósult biotranszformációs technológiák szektoronkénti megoszlása

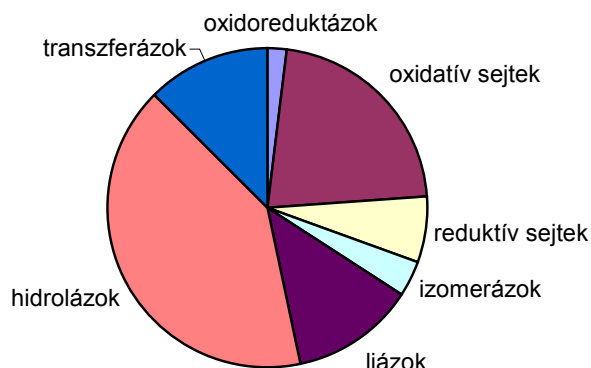
A már klasszikus β -laktám antibiotikumok, a szteroidok, a zsírsav és szénhidrát származékok, valamint az aminosavak enzimes átalakításain túlmenően mára a szekunder alkoholok sztereospecifikus előállítására is jelentősége vált (3. ábra). A királis szekunder alkoholok jelentősége folyamatosan növekszik, hiszen mind több új hatóanyag szintézisének kulcsintermedierjei [Bódai 2003, Homann 2004, Chartain 2000]. A szteroidok mikrobiológiai átalakításának elmélyült vizsgálatában és ipari léptékű technológiák fejlesztésében a Gyógyszerkutató Intézet munkatársainak világviszonylatban is kiemelkedő szerepe volt [Ambrus 2001].



3. ábra Az iparilag megvalósult biotranszformációk molekulatípusonkénti megoszlása

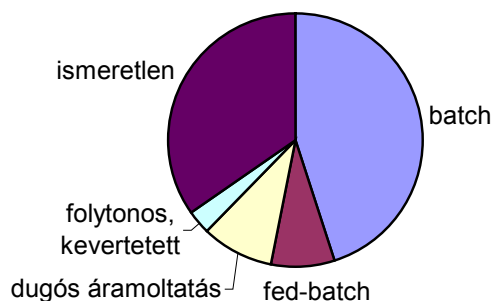
A legtöbb fejlesztés a hidroláz enzimsoport biokatalizátorait alkalmazza. Mindössze 15%-os az oxidoreduktáz enzimek aránya, amennyiben az egész sejtes reakciókat nem számítjuk ide. Az alacsony oxidoreduktáz enzimfelhasználás oka a nélkülözhetetlen kofaktor folyamatos regenerálásával, vagy pótlásával járó problémákban keresendő. Ezt általában egy „dupla enzimrendszerrel” oldják meg, a kofaktor visszaredukálásához szükséges enzimet is a reakcióegyhez adagolják. A megvalósult technológiák esetében (134) már jóval alacsonyabb a hidrolázok aránya, de az még itt is 40% felett van (4. ábra). Látható, hogy az egész sejtes oxidációk

és redukciók szerepe jelentős. Ilyenkor az enzim izolálásának költség- és időigényével nem kell kalkulálnunk, viszont megfelelő fermentációs kapacitásokkal kell rendelkezni a biokatalizátor előállításához.



4. ábra Az iparilag megvalósult biotranszformációk enzimtípusonkénti megoszlása

A megvalósult biotranszformációs technológiák további érdekes felosztása a reaktortípus szerinti (5. ábra). Batchnek hívjuk az olyan technológiákat, amelyeket egy kitüntetett nulla időpontban indítunk, és a kívánt átalakítások elérésekor a teljes fermentációs, vagy enzimes reakcióelegyet leengedjük, majd abból nyerjük ki a terméket. A fed-batch technológiák esetében a reaktorhoz a nulla időpontot követően is adagolhatunk különböző komponenseket. Az immobilizált enzimek, illetve sejtek mellett további előnyöket várunk a folytonos/félfolytonos rendszerek ipari alkalmazásától (5. ábra)



5. ábra Az ipari biotranszformációk reaktortípusonkénti megoszlása

2.2 Mikrobiológiai fejlesztések a Gyógyszerkutató Intézetben

A II. világháborút követő időszakban a hazai antibiotikum gyártás fejlesztése intézetünk nemzetstratégiai feladata volt. Az 50-es évek során a streptomycin, az oxytetracycline, a neomycin és a nystatine ipari termelését vezették be az intézet kutatói magyarországi gyógyszeripari vállalatoknál. Az 1970 és 1995 közötti időszakban fejlesztett antibiotikum termelést célzó fermentációs eljárásokat a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat A Gyógyszerkutató Intézet ipari léptékű antibiotikum előállítását célzó fermentációs technológiái

Széles antibakteriális hatású aminoglikozid típusú antibiotikumok

- gentamicin C komplex
- sisomicin
- tobramycin
- kanamycin B
- apramycin

Antibakteriális antibiotikum (külsőleg)

- mupirocin

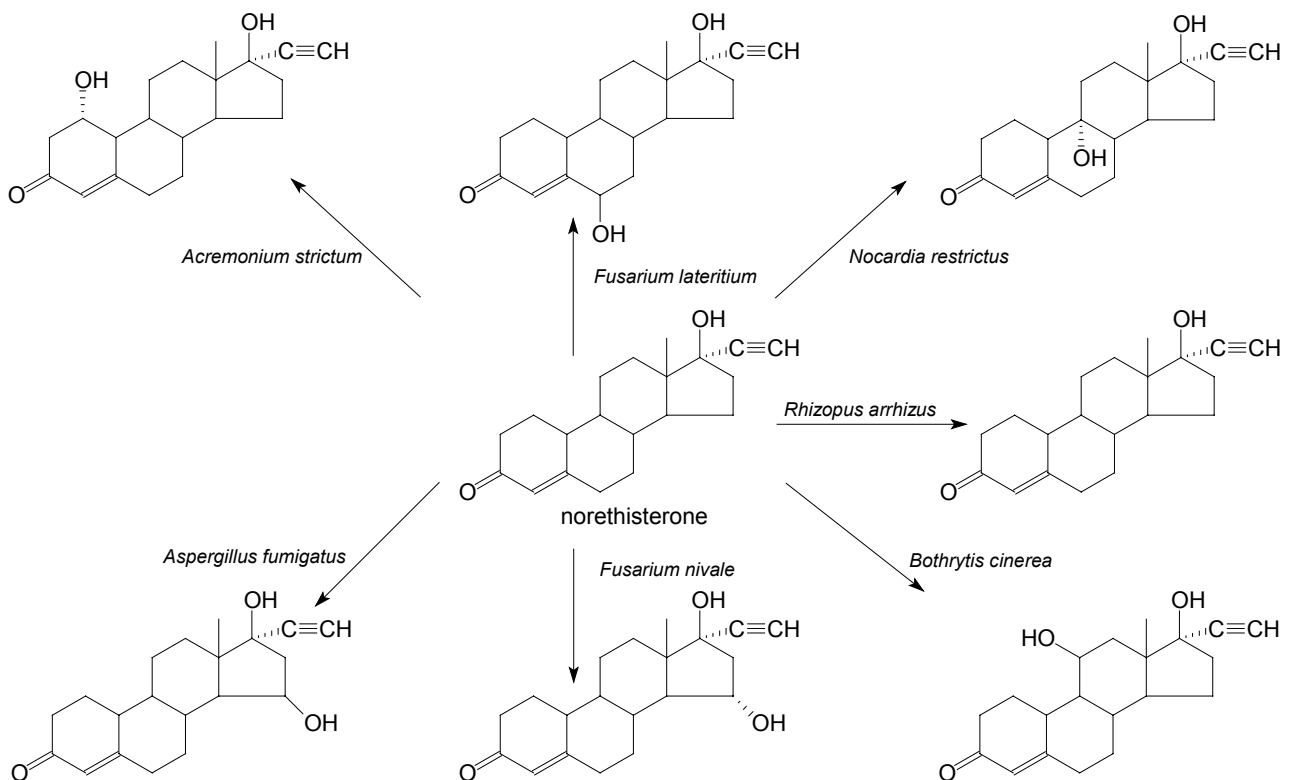
Tumorellenes antibiotikum

- daunomycin

Finomvegyszerként forgalmazott antibiotikumok

- actinomycin D
- mithramycin
- oligomycin
- thiostrepton

A szteroid átalakítások kutatásának megindítása Wix György nevéhez fűződik (Wix és Albrecht, 1961). Az első ipari szteroid átalakítás Magyarországon 1959-ben született meg. *Fusarium caucasicum*-mal 1,4-androsztadién-3,17-dion állítottak elő progeszteronból. A 6. ábrán a norethisterone mikrobiológiai hidroxilezési munkáit követhetjük nyomon. Ezek közül az 1- α -hidroxi származék bizonyult hasznos származéknak. Sőt, Wix és Albrecht úttörőmunkát végeztek a rögzített sejtekkel történő biotranszformációkban is (1959).

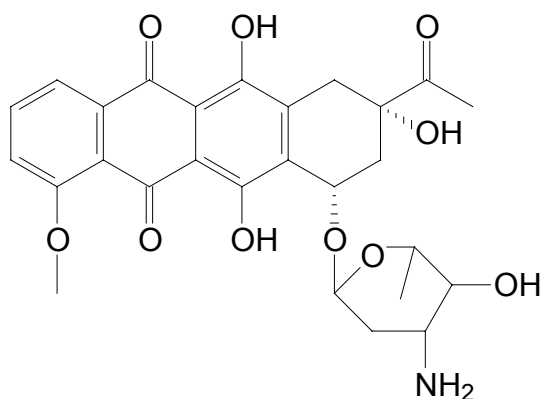


6. ábra A norethisterone mikrobiológiai hidroxilezése

Az 1970-es évekre az aminoglükozid antibiotikumok vizsgálata hozott jelentős eredményt. A gentamicin C komplex, a sisomicin és a tobramycin előállítására kidolgozott kísérleti üzemi léptékű technológiákat a Chinoin és Biogal gyógyszergyárakban üzemeltették. Ezen fejlesztések során új kromatográfiai módszereket és mikrobiológiai módszereket fejlesztettek ki támogatva az intézet kutatási programjait (Bérdy et al. 1977).

Az 1980-as években az antibiotikum screening programot kiterjesztették baktérium törzsekre is a talajbaktériumok mellett. A kiterjesztett program keretén belül egy mupirocin termelő törzsre akadtak. A mupirocin terápiás bevezetését a Beecham gyógyszergyár végezte el, míg a gyártást a Biogal gyógyszergyárban kezdték meg.

Az antitumor antibiotikumok izolálása során egy antraciklin típusú antibiotikumokat termelő törzset találtak, melyet *Streptomyces coeruleus*-ként sorolták be. A törzs fő terméke, a daunomicin, egy rákellenes gyógyszer (7. ábra), a doxorubicin szintézisének köztterméke.



7. ábra A daunomycin szerkezeti képe

További fermentációs technológiák kidolgozása is sikeres volt ebben az időszakban: az actinomycin D, a mithramycin, az oligomycin és a thiostrepton ipari termelése a Reanalnál valósult meg.

A rendkívül hatékony immunszuppresszáns, a mikofenolsav mikrobiológiai előállítására szintén ipari léptékű fermentációs technológiát fejlesztettek ki.

2.3 Néhány biotranszformációs alapfogalom

Eddigi tapasztalataim azt mutatják, hogy a konverzió és a hozam fogalmát tudományos cikkekben [Peng et al., 1997], kongresszusokon is helytelenül használják, ezért szükségesnek érzem kettő, a biotranszformációs gyakorlatban használt fogalom ismertetését [Liese 2000].

2.3.1 Konverzió

A konverzió az átalakítatlan (visszamaradt szubsztrát) és a kezdeti szubsztrát arányáról tájékoztat, számszerűen az alábbi képlet segítségével kapjuk meg:

$$X_s = \frac{n_{s0} - n_s}{n_{s0}},$$

ahol X_s a szubsztrátra számolt konverzió, az n_{s0} a szubsztrát mólból kifejezett mennyisége a reakció kezdetekor, az n_s pedig a reakció végén mért szubsztrát mólból kifejezett mennyisége. Teljes a konverzió, ha a reakcióelegyben kiindulási anyag nem marad, vagyis n_s 0-hoz közelít. Tehát a konverzió a képződött termék mennyiségéről nem tájékoztat!

2.3.2 Hozam

A reakció hozama a kívánt termék és az átalakítandó szubsztrát arányáról tájékoztat.

$$\eta_p = \frac{n_p - n_{p0}}{n_{s0}} \times \frac{\nu_s}{\nu_p},$$

ahol η_p a termékre vetített hozam, n_{p0} a termék, n_{s0} a szubsztrát mólbán kifejezett mennyisége a reakció kezdetén, n_p pedig a reakció során keletkezett termék mólbán kifejezett mennyisége. A ν_s és ν_p értékek hányadosa a szubsztrát és a termék sztöchiometrikus arányával korrigálja az egyenletet.

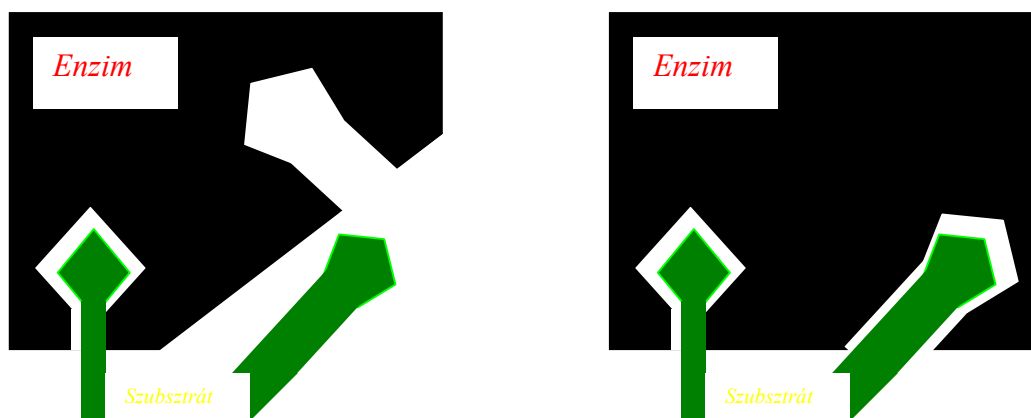
2.4 Az enzimek jellemzése

Az enzimek olyan fehérjék, amelyek a rájuk jellemző szerkezetükből adódóan bizonyos reakciótípusokat katalizálni képesek. Az enzimek poliamid láncában a térszerkezetben létezik, amelyik számára a legalacsonyabb szabad energia (ΔG) értéket biztosítja. Első ránézésre egy enzim leginkább egy fonallabdára emlékeztet. A fehérje külső oldalán a természetes, vizes környezetből adódóan olyan poláros, hidrofíli funkció csoportok találhatóak, mint a karboxil-, hidroxil-, amino-, amido- és tiolcsoportok. Így az enzimek külső felületén szerkezeti víz található, amely még a liofilizálás során is megmarad, megőrizve annak térbeli szerkezetét, és ezzel aktivitását is. Ez a szerkezeti víz a fagyasztva szárított enzimkészítmények 5-10% m/m%-át teszi ki [Cooke 1974]. A peptidlánc harmadlagos szerkezetének kialakításában számos viszonylag gyenge erősségű kémiai kötés vesz részt (van der Waals-, π -, vagy ionos kötések (sóhidak) a töltéssel rendelkező csoportok között). Az enzimfehérjékben a poliamid láncon túl kovalens kötés csupán az S-S diszulfid hidakban van jelen. A gyenge kötések viszonylag könnyű megbonthatósága miatt az enzimek érzékeny, könnyen aktivitásukat veszítő katalizátorok. Nemcsak a hőmérséklet, de a kedvezőtlen pH vagy sókoncentráció is könnyen denaturálja azokat [Ahern 1985].

2.4.1 Az enzimműködés

Az első enzimmechanizmust megérteni próbáló elmélet, a „kulcs-zár” elmélet („lock-and-key”) még 1894-ből való. Ez a megközelítés a szubsztrátra egyszerű kulcsként tekintett, amelyik ha pontosan illik a zárba, az ajtó kinyílik, vagyis a reakció végbemegy [Fischer 1984]. Hamarosan megdőlt ez a koncepció, mivel bizonyítottá vált, hogy a zárba (enzim) kisebb, nagyobb kulcsok is illenek, vagyis egy adott enzimmel az átalakítás különböző szubsztrátokon is végbemegy. A hatvanas évek derekán született meg a szofisztikáltabb, ún. „indukált kapcsolású” modell

(„induced-fit mechanism”)[Koshland 1968]. Ez a modell azon alapszik, hogy a szubsztráttól függően az enzim változtatni képes konformációját a szubsztrát szerkezetéhez idomulva. Ez a modell vezette be a kesztyű-kéz hasonlatot, amely évtizedekkel később a sztereokémia kedvenc hasonlata is lett. Tipikus „indukált kapcsolású” enzimek a lipázok. Egy-egy képviselőjük meglepően sokféle, a természetes szubsztrátuktól, a trigliceridektől szerkezetileg távoli szubsztrátot képes átalakítani. Ennek a működési modellnek a lényegét a 8. ábra mutatja be.



8. ábra az „indukáltan kapcsolt” működési modell sematikus rajza. A baloldalon nem indukálja a szubsztrát az enzim reaktív részét, míg a jobb oldalon a szubsztrát indukálja az enzim kötődését.

Nem egészen két évtizeddel ezelőtt látott napvilágot egy érdekes elmélet, az ún. „deszolvációs teória” (desolvation theory) [Dewar 1986], amelyik már magyarázatot adott arra is, hogy miként lehetséges az, hogy a nagyobb szubsztrátokon gyorsabban megy végbe az átalakítás, mint a kisebbeken. A gondolat lényege a korábban említett szerkezeti, külső vízmembrán viselkedésében keresendő. Amikor a szubsztrát belép az enzim aktív részébe, akkor az ott lévő összes vízmolekulát lecseréli. Ekkor, egy kvázi gáz fázisú reakció játszódhat le, amely reakcióban a résztvevő felek mellett más zavaró oldószer nincs jelen. Végeredményben a szerkezeti vízmolekulák akadályozzák a szubsztrátot, hogy az az enzim aktív részéhez kapcsolódjon, ezáltal lassítják a reakció sebességét. Ez a modell magyarázatot adott arra is, miért alakulnak át gyakran gyorsabban a nagyobb méretű szubsztrátok: a kisebb méretű szubsztrát molekulák lassabban szabadítják fel az enzim aktív részén lévő vízmolekulákat. Pár évvel később egy fontos kiegészítést nyert a teória, ami „szolvatáció-szubsztitúció” (solvation-substitution) néven vált ismertté [Warshel et al. 1989]. Energetikai szempontból a vízmolekulák deszolvációja előnytelen lenne, vagyis azt feltételezték, hogy önmagától az enzim a szubsztrát „kedvéért” vízmolekuláit nem adja le, hanem a szubsztrát a vízmolekulákat más poláros csoportokra cseréli le, és a reakció az eredetitől eltérő poláros környezetben zajlik le.

2.4.2 A biokatalizátorok előnyei a kémiai katalizátorokkal szemben

1. **Szelektivitás:** kiemelkedő enantio-, régió- és kemoszelektivitást érhetünk el enzimkatalizált reakciókkal. Magas ee értéket érhetünk el biokatalizátor segítségével alifás ketonok, mint pl. etil propil keton redukciója során, míg kémiai katalizátorral csak a szubsztituensek nagyobb különbsége mellett tudunk enantioszelektív reakciót vezetni [Nakamura et al. 2003].
2. **Hatékonyak:** a kémiai katalizátorok a szubsztrátra vonatkoztatva 0,1-1 mól%-ban, míg az enzimek mindössze 10^{-3} - 10^{-4} mól%-ban szükségesek a reakció lefutásához.
3. **Környezetvédelem:** mivel az enzimek fehérjék, így teljesen lebomlanak, ellentétben a szintetikus katalizátorok esetében gyakran előforduló nehézfémekkel. Emiatt az enzimeket zöld katalizátorokként is emlegetik.
4. **Enyhe reakciókörülmények:** Az enzimek közel semleges tartományban, szobahőmérséklet környékén a legaktívabbak. Ilyen körülmények között ráadásul a nem kívánatos mellékreakciók, mint izomerizáció, racemizáció és a molekulán belüli különféle átrendeződések nem zajlanak le.
5. **Több lépés egy időben:** az enzimek hasonló körülmények között aktívak, így ugyanabban a reakcióelegyben akár több biokatalizátort is beletehetünk, így egyszerre több szintézislépést is elindíthatunk. Ez akkor lehet különösen hasznos, ha az enzimműködést az első reakciótermék gátolja [Eliel et al. 2001].
6. **Kedvező közeg megválasztás:** az enzimek kiszakíthatóak természetes körülményeik közül, a biokatalizátorok egy széles skálája szerves oldószeres közegben is képes működni.
7. **Széles spektrumban használhatóak:** az enzimek egy jelentős része a reakciót több irányban is képes katalizálni.

2.4.3 A biokatalizátorok hátrányai

1. **Egyetlen enantiomer forma:** mivel az enzimfehérjék csak L-aminosavakból állnak, és nem áll módunkban D-aminosavakból az enzimet felépíteni, így általában a másik enantiomer termék előállításához egy másik biokatalizátort használunk fel.
2. **Szűk optimális reakciókörülmények:** számos esetben pontosan kell tartani a reakció hőmérsékletét, mert pár °C-os eltérés már a reakció drasztikus lassulásához vezethet. Természetesen az ipar számára kevésbé „kényes” enzimekre van szükség. Évtizedek óta használnak termofil, extermofil enzimeket (például termostabil amilázok), de már jégben aktív enzimekről is beszámoltak. [Strauss et al. 1999].

3. **Legnagyobb aktivitás vizes közegben:** az enzimek nagy része bár kifejti hatását szerves oldószeres közegben is, ott gyakran rosszabb hozammal, vagy sztereoszelektivitással, jó kivételként említhetjük a lipázok alkalmazását szerves oldószerekben.
4. **Kofaktorhoz kötött működés:** számos enzim, mint a karbonil reduktázok csak a megfelelő állapotban lévő – oxidációnál oxidált, redukciónál redukált– kofaktor jelenlétében fejtik ki katalitikus hatásukat [Kometani et al. 1993].
5. **Szubsztrát/termék gátlás:** az enzimműködést gyakran már az iparilag gazdaságos szint alatt gátolja a szubsztrát és/vagy a termék [Clark et al. 1994]. A szubsztrátgátlás a kisebb probléma, folyamatos adagolással elkerülhetjük a limitáló koncentrációt. A termék esetében a folyamatos termékleválasztás általában bonyolultabb technológiát igényel, speciális membránok és gyanták alkalmazása oldhatja meg a problémát.
6. **Allergén hatás:** az enzimek allergén hatást válthatnak ki a bőrfelületen. Ezt akár az alkalmazott enzim kapszulálásával, vagy akár kesztyű használatával védhetjük ki.

2.4.4 Az enzimek három szelektivitása

1. **Kemoszelektivitás:** csak a számunkra szükséges típusú reakció megy végbe.
2. **Régiószelektivitás:** az enzimek komplex térbeli szerkezetük folytán különbséget tudnak továbbá tenni az átalakítandó molekula különböző helyén lévő azonos funkciós csoportok között is.
3. **Sztereoszelektivitás:** az enzimek L-aminosavakból felépülő fehérjék, vagyis királis katalizátorok. Ezért megfelelő screen segítségével általában megtalálhatjuk az adott feladathoz leginkább szükséges enzimet, amelyik a kívánt sztereomert (eutomer) nagy százalékban állítja elő. Érdeemes megjegyeznünk, hogy a biokatalizátorok ezen tulajdonságáról Fischer már 1898-ban beszámolt [Douzou et al. 1977].

2.5 Egész-sejtes rendszerek, vagy izolált enzimek

A címben megjelölt két lehetőség között számtalan lehetőség kínálkozik: a sejteket biokatalizátorként növesztés után közvetlenül, vagy esetleg liofilizálás közbeiktatásával, vagy egy hosszabb pihentetési szakasz után is felhasználhatjuk. A sejtfal emésztésétől kezdve különböző szintű tisztításokon keresztül az izolált enzimfehérje szárítmányig számos lehetőség közül választhatjuk ki a feladatra legalkalmasabb biokatalizátort (9. ábra).

Mikroorganizmusok, egész-sejtes rendszerek	Enzimek
Élő egész-sejtes rendszerek	Homogén enzim
Holt sejtek	Részlegesen tisztított enzim
Feltárt sejt, nyers enzimmátrix	

9. ábra Biokatalizátorok [Poppe 2004]

Minden esetben választhatjuk továbbá, hogy immobilizált, vagy szabad formában kívánjuk-e enzimmátrixunkat, vagy sejtjeinket felhasználni. Döntésünkben a következő faktorok játszhatnak szerepet:

- meglévő eszközök, beruházási lehetőségek
- várható sarzsméret (laboratóriumtól a több ezer literes fermentorokig)
- enzim érzékenysége (hőmérséklet, pH, száríthatóság stb.)
- kofaktor van/nincs, kell-e regenerálni
- optikai tisztaság fontossága
- termék értéke.

Az izolált enzimmátrixok és az egész sejt biokatalízisek előnyeit és hátrányait a 3. táblázat foglalja össze. A prokirális ketonok sztereoselektív redukcióját nyugvó, egész sejt rendszerrel végeztük el, amit részletesen a 3.5 pont alatt ismertetek.

3. táblázat Az izolált enzimek és az egész sejtes rendszerek összehasonlítása (Faber 2004)

Biokatalizátor	Felhasználási mód	Előny	Hátrány
Izolált enzim		Egyszerű eszközök, egyszerű feldolgozás, jobb termelékenység a jobb tolerancia miatt.	Kofaktor regenerálás nincs, vagy folyamatos pótlással, vagy pl. FDH segítségével. Az izolálással járó többletráfordítás.
	Vizes közegben	Magasabb enzimaktivitás.	Lehetséges melléktermékek, lipofil szubsztrátok nem hozzáférhetőek, feldolgozás extrakciót igényel.
	Szerves oldószerben	Lipofil szubsztráttal is, egyszerű termék kinyerés, enzim újrahasznosítás egyszerűbb, emelt szubsztrát koncentráció.	Csökkent aktivitás.
	Immobilizált	Enzim újrahasznosítás folyamatos.	Csökkenő aktivitás.
Egész sejtes rendszerek		<i>In vivo</i> kofaktor regenerálás.	Költséges eszközigény, nagy térfogatok, alacsony termelékenység, szerves oldószerrel szembeni alacsony tolerancia, melléktermék képződés.
	Friss sejttömeg	Nagy aktivitás.	Nagy biomassza tömeg, melléktermék képződés, nehézkes a katalízis kézben tartása.
	Nyugvó sejttömeg	Egyszerűbb feldolgozás, kevesebb melléktermék.	Alacsonyabb aktivitás.
	Immobilizált sejtek	Újrahasznosítás lehetséges.	Alacsonyabb aktivitás.

2.6 Kiralitás

2.6.1 A kiralitás fogalmának bevezetése

A kiralitás megértését segítő legkézenfekvőbb példa a jobb és a bal kéz, melyek egymás tükörképei, de egymással fedésbe nem hozhatóak. Ez a két sztereoizomer, vagy enantiomer szerkezetileg teljesen megegyezik, vagyis ugyanolyan és ugyanannyi atomból állnak, sőt ezek kötéseinek sorrendje is megegyezik; vagyis megegyezik a konformációjuk, így a molekulák fizikai-kémiai tulajdonságaik is egyformák, mint az olvadáspont, szín stb., sőt kémiai tulajdonságaik is majdnem megegyeznek, kivétel a királis reakciók (pl. reakció királis katalizátorral), és a polarizált fény törése. Másképpen fogalmazva; az enantiomerek akirális környezetben teljesen egyformán viselkednek. Az enantiomer párok egyedül térszerkezetükben különböznek egymástól. A sztereoizomer párokat a latinból vett jobb *rectus* (*R*), és bal *sinister* (*S*) kezdőbetűivel, vagy „+” és „-”, jelekkel jelöljük. A molekulák előtti betűket éppen a latin eredetre való utalás miatt dőlt karakterekkel írjuk. A polarizált fényt az optikailag tiszta egyik enantiomer jobb irányba forgatja, míg a másik enantiomer -ugyanolyan mértékben- balra forgatja. Az olyan keveréket, melyben az *R* és az *S* abszolút konfigurációjú molekulák 50-50%-ban vannak jelen, racemátnak hívjuk. Az ilyen keverékek optikailag inaktívak, vagyis a polarizált fényt nem forgatják el. Szokásos jelölésük: *rac*-, vagy \pm .

Gyakran ad okot félreértésre a latinból vett jobb (*R*) és bal (*S*) elnevezés, amely ugyanis nem feltétlenül egyezik meg a forgatás irányával. Az optikailag tiszta molekulák abszolút konfigurációját röntgenkristallográfiás, vagy cirkuláris dikroizmus módszerrel lehet megállapítani. Elterjedtek továbbá az ismert abszolút konfigurációjú molekulákból való eredeztetés útján történő konfiguráció bizonyítások is.

2.6.2 A sztereokémia néhány alapvető fogalma

A **konstitúció** azt definiálja, hogy egy molekula milyen és hány atomból áll, milyen a sorrendjük, és azok milyen kémiai kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz. A **konfiguráció** az atomok, vagy atomcsoportok térbeli elrendezéséről tájékoztat. Egy molekula különböző **konformációit** pedig egy egyszeres kötés körüli forgatással kaphatjuk meg. Azokat a molekulákat amelyeknek szerkezeti képletük megegyezik, de egymástól mégis megkülönböztethetőek, **izomereknek** hívjuk. A konstitúciós izomerek konstitúciójukban különböznek, míg a sztereoizomerek bár azonos konstitúcióval rendelkeznek, különböző a konfigurációjuk.

Egy molekula sztereokémiai jellemzése azok szimmetriájának vizsgálatán keresztül lehetséges: akirálisak azok a molekulák, melyek tükörképei egymásra illeszthetőek, míg a királis molekulák tükörképei nem hozhatóak egymással fedésbe. A királis molekula mindig tartalmaz legalább egy királis centrumot. **Királis centrum**nak hívjuk azt a szénatomot, amelyik körül a háromdimenziós térben 4 különböző szubsztituens van [Eliel et al. 2001]. Ha a molekula csak egy királis csoportot tartalmaz, akkor a két sztereoizomer molekulát **enantiomereknek** hívjuk. Az olyan reakciókat, amelyek eredményeképpen döntően az egyik enantiomer keletkezik **sztereoselektív, vagy aszimmetrikus reakcióknak**, szintéziseknek hívjuk.

Az abszolút konfiguráció fogalmát a királis molekulák sztereokémiai jellemzése miatt kellett bevezetni. Az abszolút konfigurációt leggyakrabban a Cahn-Ingold-Prelog (C.I.P.) szabállyal határozzuk meg. A C.I.P. szabály a szubsztituensek rangsorolására a következőket mondja ki: 1, a rangosabb csoport kapja a kisebb sorszámot. 2, A nagyobb magtöltésű atom a rangosabb pl.: O>N>C>H. 3, Azonosság esetén továbblépünk a kötések mentén, rang szerinti sorrendben, míg különbséget nem találunk. 4, A többszörös kötésekets megsokszorozva vesszük figyelembe.

2.6.3 Az enantiomerek arányának meghatározása

A királis molekula enantiomereinek arányát az optikai, vagy enantiomer tisztasággal szoktuk kifejezni:

$$P = \frac{[\alpha]}{[\alpha]_{\max}}$$

ahol $[\alpha]$ a minta specifikus forgatása, míg $[\alpha]_{\max}$ a tiszta enantiomer forgatása. Ezt gyakran százalékosan adják meg, amit optikai hozamként (Op) is szokás nevezni:

$$Op = \frac{[\alpha]}{[\alpha]_{\max}} \times 100$$

Napjainkban az enantiomer felesleg (ee = enantiomeric excess) kifejezés a legáltalánosabb az optikai tisztaság jellemzésére:

$$ee = \frac{E - E^*}{E + E^*},$$

ahol E a nagyobb mennyiségben jelenlevő enantiomer mólban kifejezett hányada, míg az E^* a kisebb arányban keletkezett enantiomer mólban kifejezett hányada. Mivel az enantiomerek mólsúlya minden esetben megegyezik, ezért koncentrációértékekkel is lehet számolni. Az ee értéket százalékosítva kapjuk az enantiomer hozamot:

$$Ep = ee \times 100 = (2E - 1) \times 100.$$

2.6.4 Az enzimek sztereoselektivitásának magyarázata: 3 pontos szabály

Mivel a kiralitás egy térbeli minőség, így a szubsztrát a három dimenziós térben meghatározott módon kötődik az enzim aktív részéhez, az enzim aktív részét felismeri és nagyfokú enantiomer tisztaság mellett megy végbe az átalakítás [Faber 2004]. Ez a szigorúan térben definiált kapcsolat csak úgy jöhet létre, ha legalább 3 ponton kapcsolódik a szubsztrát az enzim aktív részéhez.

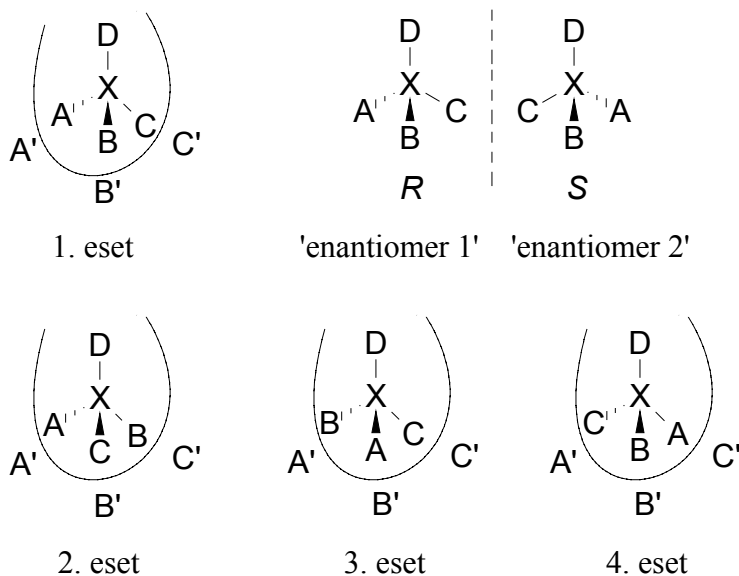
A 3 pontos szabályt a következő példákon lehet bemutatni [Ogston 1948]:

1. eset:

Az 'enantiomer 1' jó szubsztrátja az enzimnek, mert az A, B és C csoportok optimálisan kapcsolódnak az enzim aktív csoportjaihoz (10. ábra, A', B' és C'), ezáltal biztosítva az átalakítandó D csoport megfelelő orientációját, ami szükséges a sztereoselektív konverzióhoz.

2-4. eset:

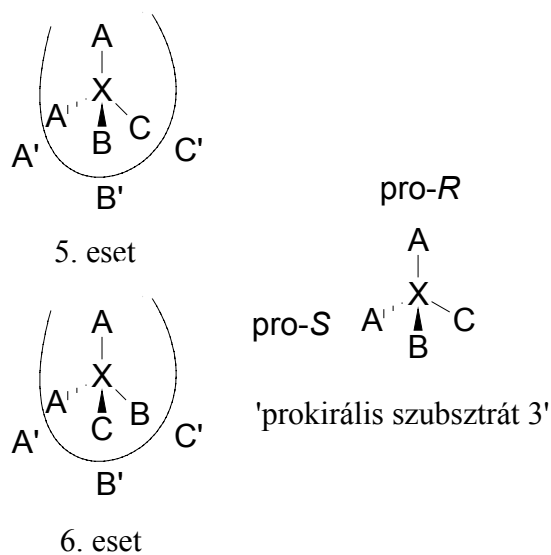
Az 'enantiomer 2' ugyanakkor nem kapcsolódhat ugyanahhoz az aktív részhez, mert az A, B és C csoportok sorrendje fordított (10. ábra).



10. ábra Az enantiomer kizárás sematikus ábrája

5. eset:

A 'prokirális szubsztrát 3' két kémiaailag egyező, de sztereokémiaailag különböző enantiotóp csoportot tartalmaz (11. ábra). Ez hasonló modellhez vezet, mint az első eset, mivel a reakció során valamelyik A csoport átalakul, s a termék már királis lesz, hiszen mind a négy csoport különbözni fog. Természetesen, ha az A csoport B, vagy C csoporttá alakul, akkor nem beszélhetünk királis molekuláról.

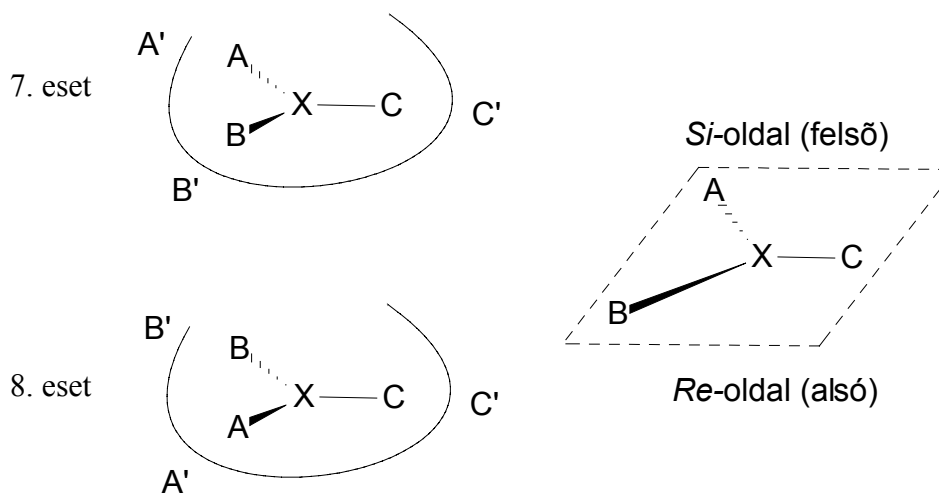


11. ábra Az enantiotóp diszkrimináció sematikus rajza

6. eset:

A 'prokirális szubsztrát 3' esetében is felmerülhet, hogy nem egyeznek a szubsztrát és az enzim aktív részének csoportjai, vagyis nem jön létre a szükséges kapcsolat. Ilyenkor nem, vagy csak alig zajlódik le az átalakítás.

Az enzimeknek azt a képességét, hogy meg tudjanak különböztetni egy prokirális szubsztrát két enantiomer oldalát a 12. ábra szemlélteti.



12. ábra Az enantiotóp oldali kiválasztás sematikus ábrája

7. eset:

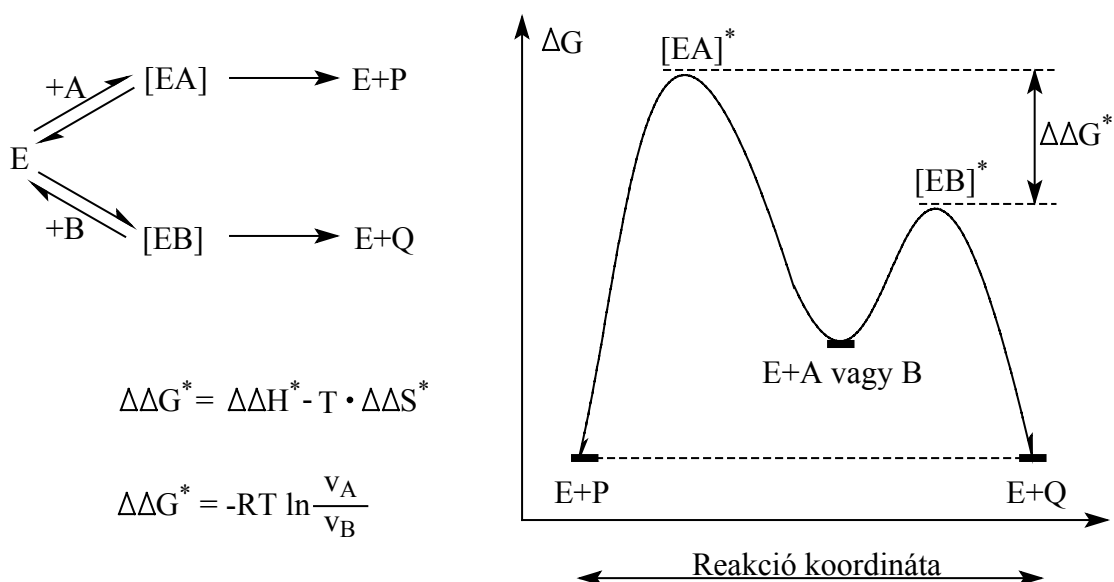
Optimális esetben a szubsztrát és az enzim funkciós csoportjai passzolnak, így a kémiai operátor felülről (*Si*-oldal) tudja támadni a 'prokirális szubsztrát 4' központi atomját.

8. eset:

A 'prokirális szubsztrát 4' tükörképe van az enzim aktív csoportjainál, így nem jön létre a megfelelő kötődés, a kémiai operátor alulról (*Re*-oldal) támadná X központi atomot, ami ebben az esetben előnytelen.

2.6.5 A szelektivitás kinetikai okai

Az enzimek sztereoszelektivitásának kinetikai oka az enzim-átmeneti állapotkomplexben $[ES]^*$ lévő energiakülönbségből ered (13. ábra). Ha az enantiomer pár mindkét konfigurációs izomerje ($[A]$ és $[B]$) verseng az enzim aktív kötőhelyéért, akkor az enzim aktív részének királis környezetében olyan két diasztereomer enzim-szubsztrát komplex jön létre ($[EA]^*$ $[EB]^*$), amelyek különböző szabad energiával ($\Delta G_{[EA]^*}$ és $\Delta G_{[EB]^*}$) rendelkeznek. Ennek eredménye az az aktiválási energiák közötti különbség ($\Delta\Delta G^*$), ami miatt az egyik enantiomer biotranszformációjára gyorsabban kerül sor, mint a másikéra. Ezt a folyamatot általánosan 'királis felismerésnek' hívjuk.



13. ábra Egy enzimkatalizált enantioszelektív reakció sematikus energiadiagramja (E = enzim; A és B = enantiomer szubsztátok; P és Q = enantiomer termékek; $[EA]^*$ és $[EB]^*$ = diasztereomer enzim-szusztát komplex; $\Delta\Delta G$, $\Delta\Delta H$ és $\Delta\Delta S$ = szabad energia, entalpia és entrópia különbségek; R = egyetemes gázállandó; T = hőmérséklet; v_A és v_B = A és B reakciósebessége

A $\Delta\Delta G^*$ -vel jelölt szabad energia különbség közvetlenül mérőszáma a reakció szelektivitásának. A termék enantiomer felesleg értékei és a hozzá tartozó $\Delta\Delta G^*$ értékek láthatóak a 4. táblázatban.

4. táblázat Az optikai terméktisztasághoz tartozó szabadenergia különbség értékek ($\Delta\Delta G^*$)

$\Delta\Delta G^*$ [kcal/mól]	'A' termék/'B' termék	ee [%]
0,118	1,2	10
0,651	3	50
1,74	19	90
2,17	39	95
3,14	199	99
4,50	1999	99,9

Látható, hogy egészen alacsony szabad energia értékkülönbség (2,17 kcal/mól) már jó (90%) enantioszelektivitást eredményez, de még ennek kétszerese sem elegendő a 100%-os optikai tisztaság eléréséhez.

2.6.6 Módszerek az enantiomerek arányainak meghatározására

Az enantiomerek elválasztásának egyik lehetséges útja, hogy más, királis centrumot tartalmazó molekulákkal, polimerekkel hozzuk azokat kölcsönhatásba. Az enantiomerarány meghatározása történhet elválasztással királis közegben, majd az enantiomerek detektálásával, vagy az enantiomerek különböző fénytörési tulajdonságainak felhasználásának segítségével. A témát egy alaposan feldolgozó közlemény [Rétey és Robinson 1982] a következő csoportokba osztotta ezeket:

1. A meghatározás az eredeti enantiomerek (*R* és *S*) elegyből elválasztás nélkül. A keverék specifikus forgatását polariméter segítségével tudjuk mérni, majd összevetni irodalmi adatokkal, amennyiben azok léteznek.
2. A meghatározást az enantiomerek elválasztása előzi meg. A megfelelő királis kromatográfiás álló fázis megválasztása tapasztalatot igénylő feladat. Akár HPLC [Pike 1987], akár GC [Breslow 1986] módszerrel megvalósíthatjuk az enantiomerek elválasztását. Az enantiomerek kromatográfiás elválasztásának legújabb eredményeit Bojarski és társai foglalták össze [2005]. Az általunk alkalmazott HPLC módszert a 3.6.3 pontban ismertetem.
3. Az enantiomerekből diasztereomereket képezhetünk ismert abszolút konfigurációjú enantiomerrel (*R,R'* és *S,R'*), és a meghatározást nem előzi meg elválasztás. A diasztereomerek abszolút konfigurációját normál ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P stb. NMR spektroszkópiával [Aida et al. 1986, Ema et al. 2002] határozhatjuk meg.
4. Diasztereomerek előállítás, mint az előző esetben, majd a diasztereomerek arányát GC, HPLC, vagy más kromatográfiás módszerrel határozzuk meg [Pike 1987].

Érdekességként említhetjük meg, hogy japán kutatók királis alkoholok esetében kielégítőnek találják, ha két ismert szerkezetű enzimmel (lipáz és szubtilizin) a racemát szekunder alkoholt átészterezik, és az enzimfehérje ismert harmadlagos- és negyedleges szerkezetének segítségével már meg tudják állapítani, hogy melyik enantiomer keletkezik. Feltevésüket több különböző ketonból biokatalitikus úton előállított királis alkohol NMR vizsgálatával megerősítették [Ema et al. 2002].

2.7 A kiralitás jelentősége a gyógyszeriparban

Az enzimek és az egész sejtes biokatalizátorok királis konfigurációjuk eredményeképpen túlnyomó részben optikailag tiszta sztereoizomerek előállításánál alkalmazhatóak előnyösen. Az élővilágot felépítő molekulák, mint az aminosavak, és ezáltal az enzimfehérjék királisak [Panke et al. 2004].

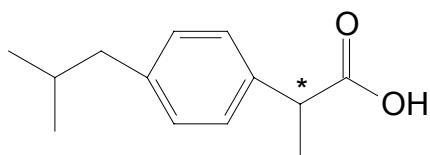
A gyógyszerek hatásukat a szervezetben található receptormolekulákon keresztül fejtik ki, amelyek fehérjék, tehát királis molekulák. A jobb és bal kéz analógiára visszatekintve, a receptorokra tekinthetünk úgy, mint a kesztyűkre: a bal kézfejünkre igazán kényelmesen csak a bal kesztyűt tudjuk felhúzni, a jobb kesztyűt nem, vagy csak nehézkesen tudjuk kezünkre húzni, tehát a megfelelő kézre húzott megfelelő kesztyű tudja csak kifejteni hatását. Amennyiben mindkét enantiomer egyforma módon kötődik a receptorhoz, úgy a kötés nem specifikus, és a vegyület nem lesz szelektíven hatékony. Az aktív enantiomert eutomernek, míg a kevésbé hatékony, vagy akár mérgező hatású párját disztomernek hívjuk.

A gyógyszerbiztonság és a kiralitás fogalma mára teljesen egybeolvadt. Gross 1989-ben azt jósolta, hogy még hosszú évekig szerepet játszanak a racemát készítmények. Igaza is lett, de sztereoiszomer keveréket gyógyszerhatóanyagként csak indokolt esetben lehet forgalomba hozni [Gross 1989]. Napjainkra a szabályozás odáig szigorodott, hogyha racemát hatóanyagot kívánunk bevezetni, akkor mindkét enantiomerre, és a racemátra is el kell végezni az összes klinikai és toxikológiai vizsgálatot. Ez a szabályozás olyan többletkiadással terheli meg a racemát esetleges forgalomba hozatalát, hogy a fejlesztések mára kizárólag optikailag tiszta vegyületek irányában folynak. A megfelelő szabályozásnak és a terapeutikus előnyöknek köszönhetően 2000-ben 120 md \$ volt a tiszta enantiomerek forgalma, ez a teljes gyógyszerpiac 30%-át tette ki. A fejlődés ütemét érzékelteti, hogy ez az érték 1980-ban 3%, míg 1990-ben is csak 9% volt [Abraham 2003].

2.7.1 Néhány gyógyszeripari példa

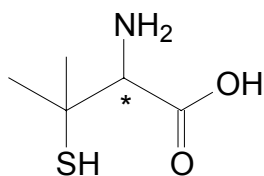
Az enantiomerek egyike általában erősebben kötődik a receptorhoz, míg a másik abszolút konfigurációval rendelkező molekula nem aktív, vagy csak kevésbé az. A 70-es évek második felétől a β -blokkolók a gyógyszerpiac jelentős szegmensét teszik ki. Harminc évvel ezelőtt ezek a készítmények még racemát keverékek voltak. Ma már tudjuk, hogy csak az (*S*)-izomerek fejtik ki hatásukat, míg az (*R*)-enantiomerek ballasztanyagként voltak jelen a forgalmazott termékekben, de -szerencsére- nem okoztak semmilyen káros mellékhatást. A propranololnál 130-szor, míg a metoprolol esetében 270-szer aktívabb az (*S*)-enantiomer, mint az (*R*) forma.

Természetesen arra is van példa, hogy a két enantiomer aktivitása és hatásspektruma megegyezik, bár ez ritka. Az ibuprofen (14. ábra) mindkét enantiomerjének egyformán jó gyulladáscsökkentő hatása van [Williams et al. 1989].



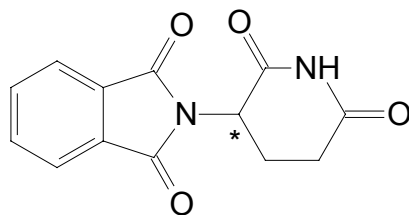
14. ábra Ibuprofen a ritka példa: mindkét sztereoizomerje a kívánatos hatást fejt ki

Az ízületi gyulladáscsökkentő penicillinamin (*S*) formája kiváló hatóanyag, míg enantiomer párja toxikus. Hasonlóképpen az ethambutol egyik enantiomerje tuberkulózis kezelésében hatékony, míg a másik abszolút konfigurációjú molekula vakságot okozhat. A Parkinson-kór kezelésénél alkalmazott Levodopa (L-dopa) csak az (*S*) eutomert tartalmazza, mert a másik optikailag aktív molekula a vérben a granulociták számának vészes csökkenését okozza. A penicillinamin esete is hasonló: míg az (*S*) izomer kiváló hatóanyag a krónikus artritisz kezelésére, az (*R*) izomer toxikus (15. ábra).



15. ábra Penicillinamin a gyakori példa: kizárólag egyik enantiomerje hatékony, a másik toxikus

A legsúlyosabb példa a thalidomide esete [16. ábra, Rhodes 2002], melynek racemát keverékét a 60-as évek derekán hozták forgalomba, az állapotos nők gyakran fellépő rosszzullétét és hányingerét gátolta, ezáltal a rendellenesen fejlődött magzat megtartását is elősegítette. Míg az (*S*) izomer a kívánt effektust váltotta ki, addig az (*R*) forma súlyosan teratogén volt, így a thalidomide közvetetten sok esetben születési rendellenességet okozott (alulfejlett végtagokkal születtek csecsemők). Ebben az esetben az optikailag tiszta enantiomer adagolása sem javított volna a helyzeten, ugyanis az optikailag tiszta forma 10 percen belül racemizálódik az emberi vérben. Jelenleg is az egyik legjobb lepra kezelésére, megelőzésre alkalmazott hatóanyag, természetesen állapotos nőknél tilos alkalmazni.



16. ábra Thalidomide a tragikus példa a 60-as évekből: racemátja erősen teratogén

Mindezen tragikus tapasztalatok eredményeképpen mára a sztereoszelektív szintézis – mind a kémiai, mind a biokatalitikus reakcióutak – összefogottan, de más diszciplínáktól elkülönülten publikált szakterületté vált (pl.: Tetrahedron: *Asymmetry* 1990-től, Journal of Molecular Catalyst B: Enzymatic 1995-től). Szerepe az oktatásban, a kutatásban és az iparban folyamatos növekedést mutat. Az FDA nemcsak az új készítmények esetében szigorú, a forgalomba lévő racemát tartalmú készítmények kivonását is támogatja, és azok enantiomer tiszta változatát javasolja újrabevetni a piacra, növelve a gyógyszer biztonságát.

2.7.2 Régi gyógyszerek új élete

A rendelkezés természetesen a gyártóknak is kedvez, a lejárt szabadalmi védettségeket meg tudják hosszabbítani úgy, hogy új hatóanyagot tulajdonképpen nem is hoznak forgalomba [De Camp 1989]. Az optikailag tiszta forma előállítás, engedélyeztetésének költsége és időtartama csak töredéke annak, ami új hatóanyagú készítmények forgalomba hozatalához szükséges. Két további járulékos előny származik a „racemát-kikapcsolásból”: (i) a környezet terhelése a gyártás során a felére csökken, miután (ii) a kezeléshez szükséges mennyiségek a felére csökkennek. Remek példa a „racemát-kikapcsolásra”, és az ebből származó előnyök maximális kiaknázására az AstraZeneca által forgalmazott fekély képződést gátló készítménye, a Prilosec. Az anti-fekély készítmények piaca 2001-re világszinten a 20 md \$-t is elérte, amely piacon a Prilosec piacvezető volt. Az európai szabadalom 1999-ig, míg az Egyesült Államokban 2001-ig állt szabadalmi védettség alatt. Az AstraZeneca előállította a hatékonyabb (S)-izomert, speciális szabadalommal levédte, ezzel termékének életciklusát további 12 évvel meghosszabbította, vagyis 2014-ig magas profittal, versenytárs nélkül tud forgalmazni egy olyan termékét, amelyik egyébként mára generikus terméké vált volna. Az optikailag tiszta hatóanyag Nexium néven került forgalomba. Az gyógyszeripari vállalat mellett valamennyi kezelésre szoruló beteg is jobban járt. Klinikai vizsgálatokkal bizonyították, hogy az optikailag tiszta enantiomer gyorsabb javulást okoz a beteg területeken, valamint megszűnt a korábban gyakran megfigyelt mellékhatás, a szívritmus zavar is [Mork 2003]. Hasonlóan pozitív eredményeket hozott a depresszió kezelésére korábban alkalmazott Cipralax kiváltására bevezetett optikailag tiszta hatóanyagot tartalmazó Cipramil is. Állatkísérletekkel bizonyították, hogy a fele mennyiségben adagolt Cipramil megegyező aktivitású, mint a normálisan adagolt Cipralax.

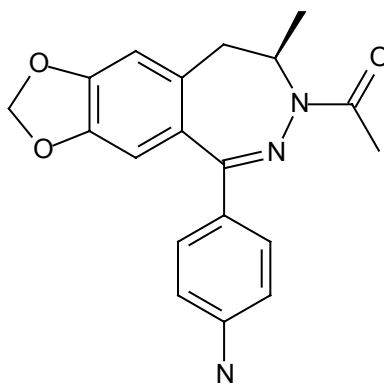
A korábban forgalomba kerülő gyógyszerek esetében megoldást jelent a „racemát-kikapcsolás”, azonban új, királis hatóanyagtartalmú gyógyszert kizárólag enantiomer tiszta bázison érdemes forgalomba hozni. Az egyik első ilyen módon fejlesztett készítmény a Lipitor (Pfizer), amelyik egy koleszterinszintet csökkentő gyógyszer. Óriási karriert futott be a koleszterinszintet csökkentő

készítmények 20 milliárd \$ forgalmú világpiacán: éves forgalma 2001-ben meghaladta a 7 milliárd \$-t, ami a teljes forgalom, több mint 35%-a.

2.8 A Talampanel

Intézetünkben hosszú múltra tekint vissza a benzodiazepinek kutatása [Kenessey et al. 1987]. Igazán hatékony, és az első reményt keltő 2,3-benzodiazepin a Talampanel, melynek IUPAC szerinti elnevezése: 7-acetil-5-(4-aminofenil)-8(R)-metil-8,9dihidro-7H-1,3-dioxolo[4,5-*h*][2,3] benzodiazepin (17. ábra). Molekulatömege: 337,3820. Irodalmi hivatkozásokban, szabványokban a következő jelöléseivel találkozhatunk: GYKI-53773, IDR-53773, LY-300164.

A Talampanel rendkívül széles hatáspectrumáról Andrásfi számolt be [1991]. A GYKI-53773 jelű molekula AMPA típusú glutamát receptorok antagonistája, melynek epilepsziaellenes, idegnyugtató és izomgörcsoldó hatása miatt gyorsan a gyógyszeripari vállalatok figyelmébe került. Intézetünk a 1990-es években a Talampanelhoz köthető összes jogot eladta az Eli Lilly gyógyszeripari vállalatnak, ahol kidolgozták a szintézis sarokpontjait, valamint megindították az epilepszia kezelésének II. klinikai fázisát az Amerikai Egyesült Államokban.



17. ábra A Talampanel szerkezete

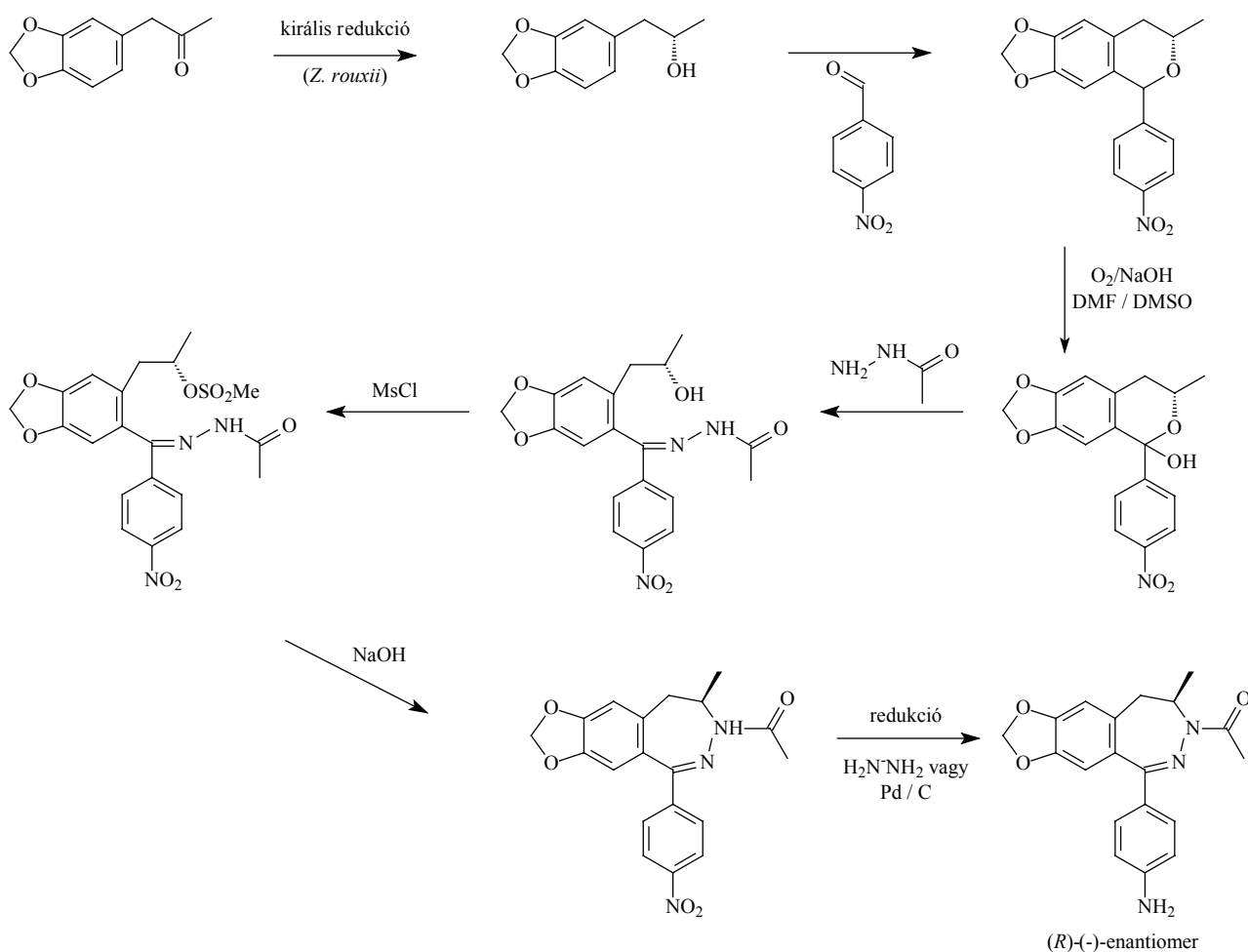
Az IVAX Co. 2000-ben azzal a céllal vásárolta vissza a Talampanel összes liszenszjogát, hogy az évtized végére piacra léphessen első, originális készítményével. A cél megvalósításához a klinikai és a különböző toxicitás vizsgálatokat be kell fejezni, valamint a Talampanel szintézisét kell továbbfejleszteni, ipari léptékűvé kell alakítani.

A Talampanel ismertté válása közben egy sor további területről is biztató eredményekről számoltak be. Ilyen többek között a Parkinson-kór kezelésében tapasztalt pozitív hatása [Konitsiotis et al.

2000]. A molekula bevezetése ezen a területen is jól halad, jelenleg a II. klinikai fázis folyik Magyarországon.

2.8.1 A Talampanel szintézise

A Talampanel hétlépéses szintézisének első lépése a prokirális (3,4-metiléndioxifenil)aceton sztereoselektív redukciója, amelynek során a célmolekula királis centruma keletkezik. Ez a lépés a szintézis kulcslépése, aminek kémiai szintézise extrém körülményeket és környezetre ártalmas katalizátor alkalmazását követelné meg. A keletkezett (*S*)-alkoholt 4-nitro-benzaldehiddel kell kondenzálni, majd lúgos körülmények között dimetil-formamidban oxidálni, amit egy acetylhidrazinos kezelés követ. Az optikailag aktív hidroxil csoportot mezil csoporttal észterezzük, majd nátrium-hidroxid segítségével, erősen lúgos kémhatású közegben zárjuk a gyűrűt. A szintézis utolsó lépése a nitro csoport redukciója (18. ábra).



18. ábra A Talampanel szintézise

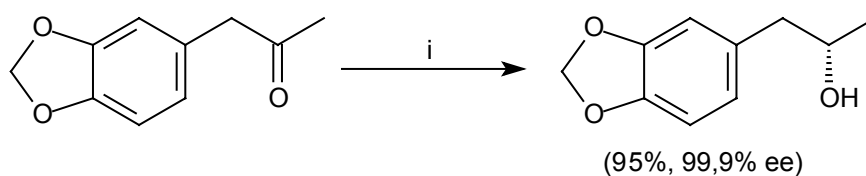
2.8.2 A királis alkohol előállítása

2.8.2.1 A kémiai szintézis

A királis alkohol kémiai szintézissel való előállítása (*S*)-propilénoxidből indul ki, ami önmagában egy drága kiindulási szubsztrát. Az epoxi vegyületet 3,4-metilén-1-brómbenzollal regáltatjuk réz katalizátor jelenlétében. A metilénbrómbenzolt pedig tetrahidrofurán közegben magnézium jelenlétében kaphatjuk meg 5-bromo-1,3-benzodioxolból kiindulva [Zmijewski et al. 1997]. Ez a módszer természetesen nem alkalmas az alkohol léptéknövelt előállítására, a szintézis kifejlesztésére a biokatalitikus úton előállított alkohol abszolút konfigurációjának bizonyítása miatt volt szükség.

2.8.2.2 A biokatalizátor kiválasztása

A Talampanel hét lépésből álló szintézisének kulcslépése a kiindulási szubsztrát, a (3,4-metiléndioxifenil)aceton sztereoselektív redukciója (*S*)-1-(3,4-metiléndioxifenil)propán-2-ollá (más néven: (*S*)-metil-1,3-benzodioxolo-5-etanol, 19. ábra).



(i) *Z. rouxii*, XAD-7 gyanta, 33-35°C, 16-24 óra

19. ábra Az (*S*)-1-(3,4-metiléndioxifenil)propán-2-ol előállításának sematikus útja és legfontosabb paraméterei

A szükséges dehidrogenáz aktivitásra egy screent végeztek el, melynek eredményeképpen *Candida famata* és *Zygosaccharomyces rouxii* törzsekkel tudták nagy optikai tisztaságú termékképződés mellett redukálni a prokirális aril ketont [Zmijewski et al. 1997]. A 5. táblázatban láthatjuk, hogy a vizsgált törzsek laboratóriumi körülmények között milyen hozammal végezték el a bioredukciót.

5. táblázat A tesztelt mikroorganizmusok és a hozam 2 g/l keton beadagolás mellett [Zmijewski et al. 1997]

Mikroorganizmus, eredet	Hozam (%)
<i>Pichia fermentans</i> , ATCC 10651	32,2
<i>Endomycopsis fibuligera</i> , M45-637	5,3
<i>Nematospora coryli</i> , NRRL Y-1343	10,6
<i>Saccharomyces</i> sp., C333	59,8
<i>Candida famata</i> , ATCC 26255	98,4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , X88	8,6
<i>Candida utilis</i> , ATCC 9950	6,9
<i>Saccharomyces globosus</i> , ATCC 10651	33,5
<i>Kluyveromyces dobzhanskii</i> , NRRL Y-1974	9,5
<i>Candida albicans</i> , 799R	70,8
Bakers' yeast, Sigma	10,9
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , ATCC 14462	100,0
<i>Aureobasidium pullulans</i> , QM 2725	15,2
<i>Mortierella isabellina</i> , NRRL 1557	100,0
<i>Rhizopus oryzae</i> , ATCC 9363	9,2
<i>Kloeckera javanica</i> , ATCC 10636	15,2
<i>Hanseniaspora valbyensis</i> , ATCC 10631	11,7
<i>Octosporomyces octosporus</i> , ATCC 2479	53,6
<i>Candida guilliermondi</i> , ATCC 6260	100,0
<i>Candida parapsilosis</i> , ATCC 22019	11,8
<i>Candida tropicalis</i> , ATCC 12659	17,8
<i>Torulopsis taboadae</i> , ATCC 42213	6,7
<i>Torulopsis ethanolitolerans</i> , ATCC 46859	5,5
<i>Torulopsis enokii</i> , ATCC 20432	73,7
<i>Torulopsis methanothermo</i> , ATCC 20434	57,5
SAF instant yeast	25,1
<i>Candida blankii</i> , ATCC 18735	24,4

A megfelelő konverzió mellett képződött alkoholok optikai tisztaságát vizsgálták, és azt az eredményt kapták, hogy mind a *Candida famata*, mind a *Zygosaccharomyces rouxii* 99,9% ee érték mellett állítja elő a kívánt enantiomert. A két törzs közül az utóbbi került további technológiai fejlesztésre, mert a szubsztrát/termék toleranciája ennek az élesztőnek volt magasabb: 6 g/l koncentráció mellett is – bár lassan – elvégezte a redukción. A lehetséges legmagasabb (6 g/l) koncentráció mellett is rendkívül költséges lett volna az (S)-intermedier előállítása, viszont a koncentráció további emelése a sejtek pusztulásához vezetett volna.

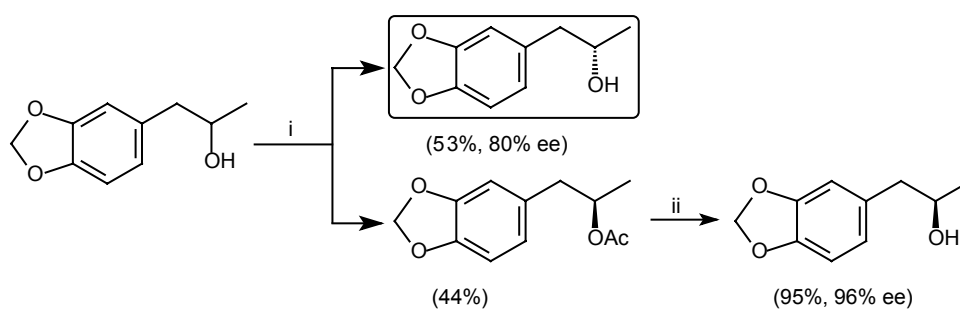
2.8.2.3 Az XAD-7 gyanta bevezetése

Megoldásként egy gyengén poláros, hidrofób, poli-metakrilát gyanta, az Amberlite XAD-7 alkalmazása szolgált, mivel az a sejtre egyformán toxikus hatású szubsztrátot és a terméket úgy adszorbeálja, hogy a 40 g/l összes koncentráció mellett a folyadékfázisban, a sejtnak hozzáférhetően 2 g/l egyensúlyi koncentráció marad [Anderson et al. 1995]. Ugyanígy egyensúlyi megoszlást mutat a termék is, így a reakció befejeztével a gyantára adszorbeált termék szerves oldószer segítségével eluálható. Az XAD-7 gyanta egyéb fontos paraméterei a következők: nagy részecskeméret (300-600 μm), mérsékelt ár (15 \$/liter), nagy fajlagos felület (400 m^2/g) és kis pórusméret (100 Å). A megoldás ipari méretekben környezeti ártalmakat, biztonságot és gazdaságosságot tekintve sokkal előnyösebb, mint az ilyen esetekben korábban széles körben alkalmazott két-folyadék-fázisú bioreaktorok. Az ilyen, vízzel nem elegyedő szerves oldószert tartalmazó rendszerek lényege, hogy a toxikus termék a szerves közegbe kerül át [Flickinger et al. 1999, Lye et al. 1999]. A sztereoszelektív bioredukció léptéknövelt megvalósítását, és az ehhez szükséges reaktort Vicenzi és társai 1997-ben ismertették, de a sejtmassza előállítására gazdaságos fermentációs technológiát nem fejlesztették ki. A közleményben megjelent kísérleti eredmények és következtetések közül jónéhánnyal, például a gyanta fizikai tűrőképességének megítélésével, a redukció körülményeinek megválasztásával nem értek egyet. A Vicenzi és társai közleményében említett 10000 literes léptéknövelés [1997] véleményem szerint az alkalmazott gyantával nem megoldható.

A XAD-7 gyanta alkalmazásával az (S)-2-(etilfenil)-2-propén-1-ol szintézisében is találkozunk [Conceicao et al. 2003]. A reakció gazdaságossá tételéhez a koncentrációt olyan mértékben kellett megnövelni, ami a *Pichia stipitis* számára már toxikus volt. Ebben az esetben is azért került sor a gyanta bevezetésére, hogy a felületén adszorbeálja a szubsztrát, illetve a termék jelentős részét, ezzel megelőzve a biokatalizátor elpusztulását.

2.8.2.4 Alternatív biokatalitikus út az alkohol előállítására

Érdemes megemlíteni, hogy napjainkban is folynak a Talampanel szintézisének kulcs lépését, a bioredukciót vizsgáló kutatások intézetünkön kívül is. A szintetikus úton előállított (\pm)-(3,4-metiléndioxifenil)propán-2-olt a 20. ábraán jelölt körülmények között Amano PS lipáz enzim segítségével, sztereoszelektíven acilezték, majd a különböző optikai aktivitású acilezett terméket és az alkoholt szilikagélen elválasztották. Ezután az acetil származékot K_2CO_3 jelenlétében metanolban hidrolizálták, és így kapták az optikailag aktív alkoholt [Easwar és Argade 2003].



(i) *n*-hexán/benzol (2:1), Amano PS lipáz, vinil-acetát, 50°C, 72 óra; (ii) K₂CO₃/MeOH, 0°C, 4 óra

20. ábra Az (*S*)-1-(3,4-metiléndioxifenil)propán-2-ol előállításának alternatív lehetősége

Ez a megoldás természetesen nem szoríthatja ki az általunk kifejlesztett egész sejtes technológiát, azonban két olyan technológiai előnyére szeretném felhívni a figyelmet, amit még a cikk írói sem jegyeztek meg: (1) nem szükséges hozzá fermentációs kapacitás, az alkalmazott lipáz kereskedelmi forgalomból beszerezhető; (2) alacsonyabb hozamú, de stabilabb a technológia, mivel a reakciót a sejt pillanatnyi állapotától függetlenül tartják. Alapvető és megkerülhetetlen problémája, hogy a technológia nem gazdaságos, nem környezetbarát és extrém körülményeket is tartalmaz (pl. 0°C). További 2,3-benzodiazepinek (pl. Tofisopam, GYKI-53405, 53655) szintézisútjairól olvashatunk Zappalá és tsai által publikált áttekintő közleményben [2001].

2.8.3 A biokatalizátor: *Zygosaccharomyces rouxii*

A *Saccharomycetae* családba tartozó *Zygosaccharomyces rouxii* legfontosabb tulajdonsága a rigiditás, rendkívüli só- és cukortűréséről híresült el. Bizonyos mézfajtákban még szaporodni is képes, ami az extrém alacsony vizaktivitás toleranciáját bizonyítja. Jellemző, hogy legközelebbi rokonától, a szintén 60%-os glükózos tápközegben növekedni képes *Zygosaccharomyces mellis*-től a klasszikus taxonómiai meghatározás során sótüréssel (16% NaCl) lehet megkülönböztetni, ugyanis a *Z. mellis* még ilyen sókoncentráció mellett is képes szaporodni [Deák 1999]. Holland kutatók a *Z. rouxii* alkohol termelését vizsgálták különböző pH, NaCl koncentráció és hőmérsékleten. Legjobb eredményeket alacsony pH (3,0-4,0) és NaCl koncentráció mellett kapták 25°C hőmérsékleten. Megasabb pH-t és sókoncentrációt alkalmazva jelentős mennyiségű α -keto glutársavat és deaminált termékeket választott ki a sejt. A legmagasabb sejt koncentrációt 30°C-on történő növesztés mellett figyelték meg [Jansen et al. 2003].

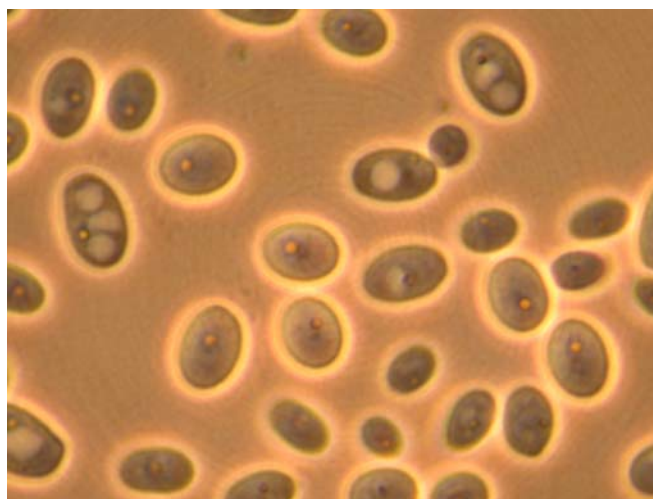
A *Z. rouxii*-t a Talampanel előtt léptéknövelt, gyógyszeripari átalakításokban még nem alkalmazták, azonban laboratóriumi körülmények között β -keto-észter enantioszelektív redukcióját, valamint – kálcium-algináthoz rögzített sejtekkel – az etil 4-klóracetát sztereoszelektív redukcióját Hallinan és társai sikeresen elvégezték [1995]. Ahmad és társai az (1*S*,3*R*)-1-fenil-1,3-hidroxi-bután előállítását oldották meg egész sejttes *Z. rouxii* rendszerrel. [2004]. Érdekes eredményeket értek el a *Z. rouxii* szilárd fázisú tenyészetével is. Extracellulárisan kiválasztott L-glutaminázt állítottak elő korpa, illetve szezámolaj pogácsákon növesztett élesztővel [Kashyap et al. 2002].

A *Z. rouxii* élelmiszeripari alkalmazása régóta ismeretes: az USA-ban és Japánban a szójaszós (shoyu) másodlagos fermentációját végzik nagy sótűrésű fajokkal, mint például *Z. rouxii*-val. A fermentáció végterméke a miso, amely az említett országokban elterjedt ízesítőszer és leves alapanyag [Hecquet et al. 1996].

A sherry készítésének másodlagos fermentációja során vastag élesztőbevonat alakul ki, amely réteg populációjának jelentős képviselője a *Z. rouxii* [Deák 1999].

Az alkalmazott élesztő ellenállóképességére, rigiditására jellemző, hogy 0,1-300 MPa között különböző élesztők inaktivációs kinetikáját vizsgálták, és a *Z. rouxii*-t jó nyomástűrőnek találták [Chen et al. 1997]. Török és King a *Z. rouxii* és a *Saccharomyces cerevisiae* hőpusztulását vetették össze, és megállapították, hogy az adott körülmények között a *Z. rouxii* hőtűrése jóval gyengébb [1991].

Biotranszformációs technológiához előállítandó *Z. rouxii* sejtmassza termelésének fejlesztését, optimalását eddig még nem végezték el.



21. ábra A *Z. rouxii* 24 órás tenyészetének 125-szörös nagyítású mikroszkópikus képe
(saját felvétel)

A valódi sarjadzó élesztők morfológiailag nem megkülönböztethetőek általános tápagarra szélesztéssel, sőt egy 500-szoros nagyítású mikroszkópos képen is nagyon hasonlóak. A CHROMagar tápagart *Candida* fajok egyszerű, a telep színe alapján történő megkülönböztetésére fejlesztették ki. Egy tanulmány szerint ez az agar alkalmas 33 különböző (valamennyi vizsgált!) valódi élesztő megkülönböztetésére, mert valamennyi faj növekszik a tápagaron, és mind különböző színárnyalatú telepet hoz létre [Tornai-Lehoczki, Péter, Dlačny 2003]. Így a tápagar alkalmas az alkalmazott élesztőtörzs különböző *Candida*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspóra*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Pichia* törzsektől való megkülönböztetésére.

2.8.4 A *Z. rouxii* alkohol dehidrogenázának jellemzése

Az alkohol dehidrogenázok (ADH) az oxidoreduktázok csoportjába tartoznak. Természetes szubsztrátjai az alkoholok, amelyeket a megfelelő és oxidált kofaktor jelenlétében ketonná redukálják. A reakciót fordított irányban is katalizálja az ADH, ekkor a kofaktor redukált formájára van szükség. Az ADH enzimek EC szerinti besorolása 1.1, a további alosztályba sorolás pedig a szükséges kofaktor minősége szerint történik. A karbonil reduktázok a xenobiotikus karbonil molekulák redukciójában vesznek részt [Hara et al. 1986] és a koenzim kötési pontja a fehérje N-terminális régiójában található katalitikus triád: Ser-(X)_n-Tyr-X-X-X-Lys [Jornvall et al. 1995]. Ezek az enzimek monomerek, 30-40 kDa méretű rövid láncú reduktázok. Karbonil reduktázokat eddig emlőssejtekből, élesztőből és különböző baktériumokból izoláltak [Krozowski 1994].

A *Z. rouxii* karbonil dehidrogenáz kofaktora a NADPH, amelynek regenerálása a megfelelő kosubsztrát adagolása mellett *in vivo* történik. Eddig a redukcióban kosubsztrátként csak glükózt alkalmaztak [Anderson et al. 1995].

A tisztított enzim karakterizálását már Costello és társai elvégezték, az általuk kiválasztott prokírális szubsztrátokon kapott relatív ((3,4-metiléndioxifenil)acetonhoz számított) aktivitás adatokat az 6. táblázatban mutatom be [2000].

6. táblázat A *Z. rouxii* ADH szubsztrátspecifitása

Prokirális, királis keton szubsztrát	Relatív aktivitás(%)
(3,4-metiléndioxifenil)aceton	100
Piperonilaceton	18
Etil (4-klór)acetát	42
4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxobutánsav	37
Acetofenon	4
Benzilaceton	0
Dihidro-4,4-dimetil-furán-dion	194
Izatin	86
Ftalimidoaceton	17
(<i>S</i>)-kámforkinon	100
(<i>R</i>)-kámforkinon	32

Számunkra azonban a Talampanelt követő utódmolekulák (analógok) szintézisének fejlesztése érdekében a különböző fenilaceton származékok redukciója vált érdekessé. A 6. táblázatból számunkra két eredmény volt különösen érdekes: az alkalmazott karbonil reduktáz enzimmal a fenilacetonnál egy (CH₂)-vel rövidebb oldallánccal rendelkező aceto-fenon, valamint az eggyel hosszabb láncú benzilaceton redukciója nem megoldható. Az enantiomer tisztaságról nem ad tájékoztatást a cikk, pedig az enzim jellemzésénél a konverzió mellett a termék optikai tisztasága is esszenciális.

2.8.5 A *Debaryomyces hansenii*

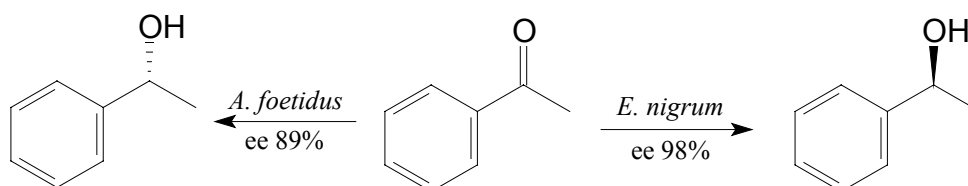
A szinte mindenütt előforduló haploid élesztőfaj általánosan előfordul vizeinkben [Bruni et al. 1983], opportunista parazitaként él a halakban és az emberben [Solntseva et al. 1987], megtalálható zöldségeken és magas cukortartalmú élelmiszerekben is [Tokuoka et al. 1985]. A *D. hansenii* a *Z. rouxii*-hoz hasonlóan magas sókoncentrációt tolerál [Larsson et al. 1990], sőt olyan aromás molekulák lebontására képes, mint a naftol, a bifenil- és a benzopirén [Cerniglia et al. 1981]. Kobalt, réz, cink és vas nehézfémeket tartalmazó közegben is képes fennmaradni [Gadd és Edwards 1986].

Fehérje és zsírbontó enzimei miatt a sajtgyártásban starterkultúrákban más mikroorganizmusokkal együtt alkalmazzák [Fleet 1990]. További előnyös élelmiszeripari tulajdonsága, hogy számos romlást okozó baktérium növekedését gátolja, miközben az élelmiszerek magas cukor és/vagy sótartalma nem gátolja szaporodását [Bintsis et al. 2003, Ferreira és Viljoen 2003]. A *D. hansenii*-t

β -glükozidáz aktivitása, valamint a borban előforduló nem illékony komponensek felszabadításában játszott szerepe miatt mind kedveltebb mikroorganizmusként tartják számon [Rosi et al. 1994].

2.8.6 Az acetofenon, fenilacetone és benzilacetone, valamint néhány származékuk sztereoszelektív bioredukciója

Az acetofenon mind *R*, mind *S* oldali sztereoszelektív redukcióját már több törzssel megoldották, az *S* izomert egy *Fusarium oxysporum* törzssel (ee 74%), míg az *R* izomert legtisztább formában egy *Tricothecium* faj állította elő [Mandal et al. 2004]. Az utóbbi törzs meglepő módon a *p*-metoxi származékon semmiféle átalakítást nem csinált, viszont a *p*-kloro származékon magasabb hozammal és enantioszelektivitás felesleggel végezte el a redukciót. Andrade és társai is találtak két mikroorganizmust, amelyek az enantiomer tiszta feniletanolokat állítják elő: az *Aspergillus foetidus* 89%-os ee érték mellett az (*R*), míg az *Epicoccum nigrum* 98%-os ee érték mellett az (*S*)-1-feniletanol állítja elő (22. ábra).



22. ábra Optikailag tiszta 1-feniletanolok előállítása mikroorganizmusokkal

A 2-bróm-4-fluor-acetofenont különböző *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sphingomonas* élesztőtörzsekkel redukálták 90% feletti hozammal, 99%-os ee érték mellett [Patel et al. 2004]. Nagy optikai tisztaságú (>99,5 ee), de ellentétes izomer formákat kapott Ye Ni kutatócsoportja, amikor ugyanazzal a *Rhodotorula* törzssel acetofenont és α -bromoacetofenont redukált, bár alacsony koncentráció mellett is rossz hozammal ment végbe a reakció [2003].

Az (*S*)-1-feniletanol *Candida utilis*-szel nagy optikai tisztasággal állította elő Cheng és Ma kutatócsoportja. A tenyészet kémhatásának változása és az enantiomer felesleg között figyeltek meg összefüggést. A legnagyobb enzimaktivitást 6,0; míg a legmagasabb ee értéket 5,0 pH érték mellett kapták.

Az optikailag tiszta (S)-1-fenilpropán-2-olt az aril alkohol racemát keverékéből egy *Pseudomonas* törzsből izolált lipáz által katalizált acilezéssel is előállították [Burgess et al. 1991]. A (4-metoxifenil)aceton sztereoszelektív bioredukciója sütőélesztő alkalmazásával alacsony hozam mellett (S)-1-(4-metoxifenil)propán-2-olt eredményezett, de az 5 napos reakcióidő és az alacsony indulási koncentráció miatt a reakcióút további vizsgálata elmaradt [Ferraboschi et al. 1990]. Optikailag tiszta dimetoxi származékokat irodalmi ismereteink alapján a megfelelő keton sztereoszelektív redukciójával ezidáig nem állították elő.

A különböző fenilbutanol származékok a kozmetika ipar értékes nyersanyagai, a 2-metil és a 3-metoxi származék például illatanyagként kerül egyes termékekbe. Az anizilacetont „málnaketon”-ként tartják számon, mivel a málna legfontosabb illatanyaga [Donzelli et al 1996]. Az anizilaceton lebontása során keletkezik racém anizilalkohol *Beauveria bassiana* fermentlevében, de a növekedés későbbi fázisában a képződött alkohol visszaoxidálódik. A különböző ketonok redukciója során mi is talákoztunk ilyen esettel *Debaryomyces hansenii* sejtet alkalmazva biokatalizátorként. Optikailag tiszta fenilbutanol, illetve anizilalkohol előállítását leíró közleményt szintén nem találtam, noha *Pleurotus ostreatus* fermentlevéből *p*-anizilalkoholt mutattak ki legnagyobb mennyiségben az aromás alkoholok közül [Gutierrez et al. 1994].

2.8.7 A biokatalizátor tárolása

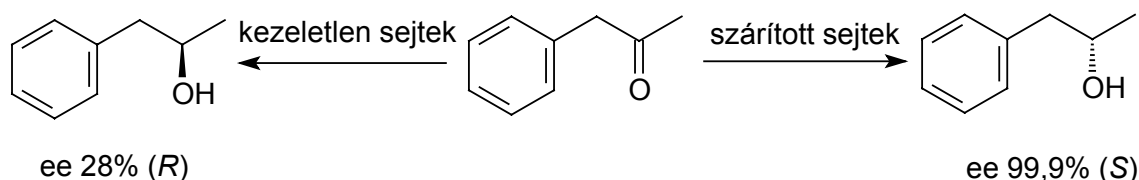
Mivel ipari léptékben, gyógyszergyári körülmények között még nem alkalmaztak élesztőmasszát katalizátorként, ezért fel sem merült a tárolás problémája. Laboratóriumi tapasztalatok alapján előzetesen azt várhattuk, hogy a sejtmasszát annak specifikus enzimaktivitás változása nélkül még hűtött körülmények között is csak nagyon rövid ideig tárolhatjuk. Megoldásként a szárítás merült fel. *Molinaria* és társai *S. cerevisiae*-t liofilizáltak, majd a glükózos oldatban regenerált sejtömegeggyel elvégzett reakciók eredményeit vetették össze a friss sejtmasszával elvégzett redukciók eredményeivel [1999]. Néhány biztató eredményt a 7. táblázatban mutatok be.

7. táblázat Acetofenon redukciója különböző törzsek friss és a liofilizált sejtmasszájával (20 mM kezdeti koncentráció és 24 órás reakcióidő)

	Friss		Liofilizált	
	Konverzió	ee	Konverzió	ee
<i>Candida utilis</i>	30	95 (S)	15	>98 (S)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	10	35 (R)	<5	15 (R)
<i>Pichia etchellsii</i>	90	95 (R)	80	97 (R)
<i>Pichia fermentans</i>	<5	-	<5	-
<i>Pichia glaucozyma</i>	60	90 (S)	30	85 (S)
<i>Pichia minuta</i>	40	95 (S)	20	>98 (S)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<5	-	<5	-

Fuhshuku és tsai a biokatalizátorként alkalmazott élesztősejteket különböző módon szárították, majd megmérték enzimaktivitásukat [2003]. Azt tapasztalták, hogy a 80°C-ra hevített szekrényben szárított élesztő elveszíti ADH aktivitását, viszont a liofilizált és a porlasztva szárított sejtek jó enzimaktivitással rendelkeztek. Eredményeik bár érdekesek, mégse hasonlíthatóak össze egymással, mert a különböző szárítványokat különböző ideig tárolták, különböző mennyiségben használták fel és a reakcióidőket is 2 és 30 óra között változtatták.

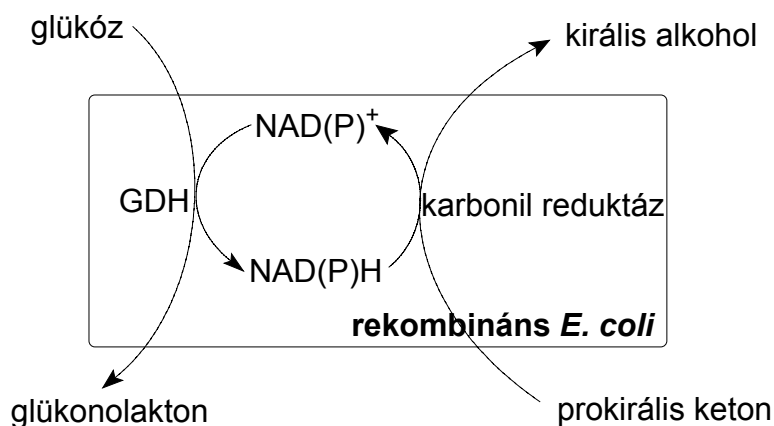
A biokatalizátor szárítása *Geotrichum candidum* esetében azonban egészen meglepő eredményt hozott (23. ábra). Míg a friss sejtek gyenge enantioszelektivitás mellett (R)-1-fenilpropán-2-olt állítottak elő fenilacetonból, addig a szárított sejtek (S)-1-fenilpropán-2-olt termeltek 99% feletti ee érték mellett [Nakamura 1996].



23. ábra Az acetonos szárítás a biokatalizátor optikai szelektivitását invertálta

2.9 A 21. század ADH biokatalizátor tervezési stratégiája

Az igazán hatékony bioreduktor egy olyan élő sejt lesz (24. ábra), amelyikben a számunkra megfelelő enzim a NAD(P)-t regeneráló dehidrogenázzal együtt (pl. glükono-DH, ha NAD, formát-DH, ha NADP a kofaktor) lesz kifejezve egy arra alkalmas (gyorsan növvő, nem patogén, genetikailag stabil) gazdasejtben. Ilyen rekombináns *E. coli*-ról számol be Kataoka [2003], de egyelőre csak laboratóriumi eredményekről olvashatunk.



24. ábra A 21. század bioreduktora

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 A kísérletek és mérések helyszínei

Valamennyi sejtnövesztéssel és bioredukcióval kapcsolatos vizsgálatot a budapesti székhelyű IVAX Gyógyszerkutató Intézet Fermentációs Kísérleti Üzemében végeztem el (1149 Budapest, Berliini utca 47-49.). A léptéknövelt bioredukcióra alkalmas bioreaktor a Szintetikus Kísérleti Üzemben lett telepítve. A bioredukciók hozamának követésére alkalmas vékonyréteg-kromatográfiás analitikai vizsgálatokat a Fermentációs Kísérleti Üzemben, míg az enantiomer arány meghatározásához szükséges HPLC módszer az Analitikai Osztályon került kifejlesztésre.

A dolgozatban leírt eredményekhez szükséges munkát 2000. eleje és 2004. vége közötti időszakban végeztem el.

3.2 A biokatalizátorként alkalmazott élesztőtörzsek

A (3,4-metiléndioxifenil)aceton léptéknövelt sztereoszelektív redukciójához *Zygosaccharomyces rouxii* (ATCC 14462) élesztőtörzset használtunk. Az aril keton szubsztrát screenhez *Debaryomyces hansenii* törzset választottuk (NCAIM Y00468), ami a *Candida famata* teleomorf változata. *C. famata*-val hasonló jó eredményeket kaptak Zmijewski és tsai [1997], mind hozam, mind enantioszelektivitás tekintetében, ezért az általunk kiválasztott aril ketonokon ezzel a törzsszel is elvégeztük a redukciókat, és az eredményeket összevetettük *Z. rouxii* által katalizált átalakítások eredményeivel.

3.3 Táptalajok

Valamennyi táptalajt csapvízzel kellett a kívánt térfogatra kiegészíteni, és a pH értékét egyik esetben sem kellett állítani.

YM tápagar

élesztő kivonat	0,3%
maláta kivonat	0,3%
pepton	0,5%
glükóz	1,0%
agar	2,0%

YMI táptalaj

glükóz	2,0%
borsópepton	1,2%
maláta kivonat	0,4%
élesztő kivonat	0,4%

YMT táptalaj

glükóz	4,0%
borsópepton	2,0%
maláta kivonat	1,2%
élesztő kivonat	1,2%

Difco Candida Chromagar tápagar [Larone 2003]

A tápagart Petri csészékbe öntve, sterilen forgalmazzák.

RR-1 termelő táptalaj

kukoricalekvár	6,0%
glükóz	6,0%
gistex	0,5%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5%
CaCO ₃	0,5%
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,1%
PPG	0,1%

Az RR-2 termelő táptalaj összetétele RR-1 táptalajával megegyező, de a kukoricalekvár helyett 3,0% kukoricalekvár port (Roquette, SolulyS HPP) használtunk.

Az RR-3 termelő táptalaj RR-1 táptalajjal megegyezik azzal a különbséggel, hogy 18% kukoricalekvár felülűszót (CLS) alkalmaztunk a lekvár helyett. A CLS készítésének menete: a lekvárt 60°C-ra hevítettük, majd a pH-ját NaOH-dal 8,5-re emeltük. A pH állítás után a hőmérsékletét 95°C-ra emeltük, majd 10 percen keresztül ott tartottuk. A kezelés során kivált csapadékot és szennyeződést Flottweg Z1 lg gyorsdekanter segítségével távolítottuk el.

A maláta és az élesztő kivonatot a Flukától szereztük be. A borsópeptont az Oxoid „Vegetable peptone Nr. 1” márkaneven forgalmazza. A munka során kukoricaleskvárt hatszor rendeltünk (Hungrana), mindegyik sarzsból származó anyag megfelelt fermentációs céljainkra. A kukoricaleskvárok minőségi bizonylatokon megadott értékeit a 8. táblázatban adom meg.

8. táblázat A felhasznált kukoricaleskvárok legfontosabb paraméterei

lekvár jele	szárazanyag	pH	fehérje
1031	47,0	3,9	20,8
0409	46,0	3,6	21,0
0606	51.0	4.1	21.0
0901	46.5	4.2	21.5
1021	46.0	4.1	22.8
0211	51.0	4.2	21.0

3.4 A sejtenyésztés

3.4.1 Törzsfenntartás

Mindkét élesztőtörzset 1 literes Blake tenyésztő üvegbe sterilizett YM tápagon tartottuk fenn. A 45 percen keresztül sterilizett tápagra 3 ml 10^9 sejt/ml sejt koncentrációjú szuszpenziót terítünk szét. Az inkubálást 28°C hőmérsékleten 3 napon keresztül folytatjuk, majd a tenyésztő üvegeket felhasználásig hűtőszekrényben $4-8^\circ\text{C}$ -on tároljuk. A megfelelő enzimaktivitás fenntartásának érdekében az átoltás hetente végezzük.

3.4.2 Az inokulum tenyészet előállítása

A Blake tenyésztő üvegről nyert sejtsuszpenzió teljes mennyiségével oltottunk 10 liter GYKI-15 típusú fermentorba sterilizett YMT táptalajt. Alsó levegőztetés (0,5 vvm) és 425 rpm kevertetés mellett 28°C hőmérsékleten 22 órán keresztül növesztettük az inokulum tenyészetet. Az inokulum tenyészet továbboltásra alkalmas, ha nem tartalmaz idegen mikroorganizmust, pH értéke 5,0-6,0 közötti és sejtszáma meghaladja a 10^9 sejt/ml koncentrációt.

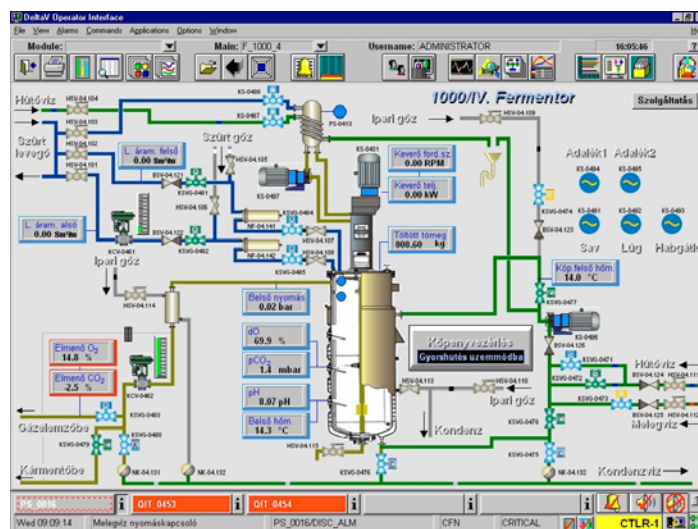
3.4.3 A biokatalizátor főfermentációs szaporítása és szeparálása

3.4.3.1 Sejtenyésztés 10 liter hasznos térfogatú fermentorban

A sejtnevesztést optimalizálási, vagy ellenőrzési célokból szintén GYKI-15 típusú fermentorban végeztük el. Ekkor a választott RR táptalajt 100 ml ellenőrzött inokulum tenyésztéssel oltottuk, majd a 24 órás sejttenyésztési periódushoz a következő paramétereket állítottuk be: 26°C, 0,5 vvm, alsó levegőbevezetés, 0,2 bar túlnyomás, 425 rpm. A fermentáció befejeztével laboratóriumi centrifuga segítségével nyertük a biokatalizátorként alkalmazott sejtmasszát. Az ülepítést 2500 rpm mellett 20 percig végeztük, ekkor egy 20-25% szárazanyagtartalmú sejtmasszát kaptunk, amit maximum egy nap tárolás után felhasználtunk, vagy liofilizálás után, hűtőszekrényben tároltunk.

3.4.3.2 Léptéknövelt sejttenyésztés 1000 literes fermentorban

Amennyiben GYKI-1000 típusú fermentorban sterilizáltunk 1000 liter RR táptalajt, akkor a 22 órás 10 liter inokulum tenyésztés teljes mennyiségével oltottunk. A DeltaV szabályozóberendezéssel ellátott fermentoron (25. ábra) a következő paramétereket állítottuk be: 26°C, a DO >30% tartását a következő paraméterek emelésével oldottuk meg: 0,2-0,6 vvm, alsó levegőbevezetés, 250-350 rpm kevertetés és 0,2-0,4 bar túlnyomás. A 25. ábra az 1000 literes fermentor szabályozórendszerének rendszeráttekintő képét mutatja be.



25. ábra A DeltaV folyamat szabályozó rendszer rendszeráttekintő képe

A 24 órás fermentálé sejtseparálására a Flottweg Z11g típusú gyorsdekantert használtunk. A 6000 rpm sebességgel forgó dobra 2 liter/perc térfogatárammal engedjük a fermentlevet, így 25% szárazanyagtartalmú 65-75 kg tömegű sejtmasszát kaptunk.

3.4.4 Sejtkoncentráció meghatározása

A sejtszám növekedését sejtszámolással követtük. A 10^8 - 10^9 sejt/ml eredeti sejtkoncentráció Bürker kamrában történő számolásához a fermentlevet 1000x-re hígítottuk, majd a nagyobb négyzetben számoltuk a sejteket. Minden esetben 27 db négyzetben számoltuk meg a sejteket, a legnagyobb és a legkisebb értéket elhagyva az átlagértékből a következő egyenlet segítségével számoltuk az eredeti sejtkoncentrációt:

$$s = x \times 2,5 \times 10^5 \times H,$$

ahol s a fermentlé sejtkoncentrációja (sejt/ml), H pedig a hígítás szorzószáma.

A bio redukció során felmerült, hogy a gyantával való dörzsölődés, vagy a toxikus keton/alkohol miatt az eredeti élő sejtszám csökkenhet. Az élő sejtszámot a megfelelő hígítások utáni 1 ml YM agarra terítést követő 2 nap, 28°C-on történő inkubálás után tudtuk meg. Ebben az esetben a sejt/ml sejtkoncentrációt a hígítással felszorozva kaptuk meg. Minden hígításból legalább 5 Petri csészére terítettünk, majd a legnagyobb és a legkisebb értéket elhagyva a 3 középső érték átlagát szoroztuk meg a hígítással. Az így kapott értéket élő sejtszámnak, vagy *cfu*-nak (colony forming unit) is szokás nevezni.

3.4.5 Az ülepitett nedves sejtömeg mérése (PMW)

A PMW-t (packed mycelia weight) MLW 240 típusú laboratóriumi centrifugán 20 perc, 2500 rpm ülepités után kaptuk meg. Megfelelő mennyiségű sejtmasszát nyertünk abból a fermentléből, melynek PMW tartalma meghaladta a 10%-ot. A 10%-os PMW tartalomhoz minimálisan 10^9 sejt/ml sejtkoncentráció tartozott.

3.4.6 A sejtmassza tisztítása

A dekantált sejtmasszát az eredeti fermentlé térfogatával megegyező mennyiségű steril vízzel hígítottuk, majd 26-28°C hőmérsékleten 1 órán keresztül, 250 rpm fordulatszámon kevertettük. Ezután a szuszpenziót a fermentlével megegyező módon ülepitettük.

3.5 A bioredukció

3.5.1 Laboratóriumi lépték, gyanta nélkül

A 2500 rpm fordulatszámon 20 percen keresztül centrifugázott sejtmassza (PMW 10%, 23-25% szárazanyagtartalmú) 2 g mennyiségét, 10 mmol ketont, 250 mg glükózt (*Z. rouxii* esetében), vagy 0,25 ml 2-propanolt (*Debaryomyces hansenii* esetében) 25 ml-re egészítettük ki 1,0% Na₂HPO₄-ot tartalmazó desztillált vízzel 100 ml-es keskenyszájú Erlenmeyer lombikban. A reakcióelegyet ezután 1 órán keresztül 28°C-ra temperált rázószobában 325 rpm rázási sebesség mellett inkubáltuk. A reakció leállítása és a termék extrakciója 25 ml etil-acetáttal történt.

3.5.2 Laboratóriumi lépték, gyantát tartalmazó reakcióelegy

Az XAD-7 gyanta 7,5 g mennyiségéhez 500 mg szubsztrátot és 1 ml 1%-os Na₂HPO₄ oldatot adtunk, majd 30 percen át síkrázón kevertettük a lombikot 100 rpm sebességgel. A 3.5.1 pont alatt leírt módon elkészített sejtmassza 4,0-5,0 g mennyiségét ugyannyi vízzel hígítottuk, majd 7,5 ml-t a gyantán rögzített ketonhoz adtunk. Végül az ADH kofaktoraként 2,0 glükóz adtunk a reakcióelegyhez. Síkrázón 100 rpm kevertetés és 28°C mellett 24 órán keresztül végeztük a redukciókat, majd 50 ml etil-acetáttal extraháltuk az elegyet.

3.5.3 Léptéknövelt bioredukció

A léptéknövelt redukcióhoz szükséges mennyiségű sejtmasszát Flottweg Z1 lg típusú gyorsdekanteren állítottuk elő. Megfelelő szárazanyagtartalmú (22-25%) sejtömeget kaptunk, ha 6000 rpm mellett 2 liter/perc térfogatárammal engedjük a fermentlevet a dekanter dobjába.



26. ábra A Rosenmund reaktor keverőeleme és a szűrője

A léptéknövelt bioredukciót Rosenmund, szűrős reaktorban végeztük. A 300 literes duplikált falú, rozsdamentes edény aljában egy 150 µm méretű szitaszűrő, felette pedig egy a gyantát a szűrő teljes felületén átmozgató, átforgató keverőelem található (26. ábra).

A reaktorba 100 kg XAD-7 gyantát, 8 kg (3,4-metiléndioxifenil)acetont és 10 liter 1%-os Na₂HPO₄ oldatot adagoltunk, és 1 órán keresztül 30 rpm kevertetés mellett homogenizáltuk és rögzítettük a ketont a gyanta felületére. A 30 kg sejtmassza és a 14 kg glükóz beadagolása után a reakcióelegyet 200 literre egészítettük ki, majd 16-24 órán keresztül 30 rpm és 28°C paraméterek rögzítése mellett elvégeztük a beadagolt keton sztereoszelektív redukcióját.

3.5.4 Liofilizálás

A 3.5.1 pontban leírtak szerint készült sejtmassza 10-12 g-ját 250 ml térfogatú, csiszolatos szájú lombikba tettük, majd vagy acetonos szárazjégben, vagy folyékony nitrogénben, vagy jó hőszigetelő (polisztirol hab) dobozban -80°C-os mélyfagyasztóban fagyasztottuk, utána pedig Virtis Sentry 5L típusú liofilizáló berendezés segítségével 24 órán keresztül szárítottuk. A 2,5-3,0 g port jól záró fiólákban hűtőszekrényben tároltuk felhasználásig.

3.5.5. Bioredukció liofilizált sejt alkalmazásával

A hűtőszekrényben tárolt liofilizált sejtpor 2,0-2,5 g mennyiségét 250 ml steril Erlenmeyer lombikba tettük, majd 100 ml 0,1% Na₂HPO₄-ot és 1,0% glükózt tartalmazó steril vízzel öntöttük fel. A sejtregenerálást 28°C-os hőmérsékleten 1 órán keresztül lassú keverés mellett végeztük. A bioredukcióhoz szükséges sejtmasszát a 3.5.1 pont szerinti műveletsorral kaptuk meg.

3.6 Analitikai módszerek

3.6.1 Mintavétel gyantát tartalmazó reakcióelegyből

A bioredukció nyomonkövetésének érdekében a 2., 4., 8. és 24. órában mintát kell venni a gyantát tartalmazó reakcióelegyből. Ehhez a feladathoz a Fermentációs Kísérleti Üzemben egy multifunkcionális mintavevő került kifejlesztésre, amit az Eredmények rész 4.2 fejezetében részletesen bemutatok.

3.6.2 Az alkalmazott VRK módszer

A bioredukció előrehaladtát, a hozamát VRK módszerrel követtük. Állófázisként 10 x 20 cm méretű 60 F₂₅₄ Merck réteget, mobil fázisként hexán - etil-acetát (7:3 v/v%) keveréket használtunk. A réteget a mobil fázissal minden esetben előtisztítottuk, majd vákuum-szárító szekrényben szárítottuk. Az acetonos minták, valamint a referens oldatok 2, 4 és 8 µl mennyiségét CAMAG Linomat IV félautomata eszköz segítségével vittük fel 3 mm széles csíkokban. A megfutatott rétegek kiértékelését CAMAG TLC Scanner II típusú denzitometriás elven működő készülékkel és a CATS szoftver segítségével végeztük el. Az elválasztás eredményei (R_f értékek) a 4.2.3 pont alatt találhatóak.

3.6.3 HPLC módszer az enantiomerek elválasztására

Az előállított királis alkoholok enantiomereinek elválasztásához használt rendszer a következő elemekből épült fel: Waters 510 típusú pumpa és Waters 486 típusú detektor, állófázisként Chiralcel OD-H (Daicel) oszlopot, mozgófázisként hexán és 2-propanol keverékét alkalmaztuk, ahol az utóbbi 2-5%-ban volt jelen az izokratikus rendszerben. Az abszolút konfigurációt pedig az ismert sztereoizomerrel összehasonlítva adtuk meg, ahol ilyen nincs, ott az E1, illetve E2 jelölést vezettük be, ezzel utalva a rövidebb és hosszabb retenciós idővel csúcsot adó enantiomerre. A különböző enantiomerek retenciós időit az Eredmények fejezetben mutatom be.

Érdemes folyamatosan ellenőrizni az enantiomerpárok retenciós idejét, mert egy színvonalas közleményben egészen meglepő eredményről számoltak be. A folyamatosan használt királis töltetű „Chiralcel OJ” típusú oszlop elválasztóképessége romlott, majd az enantiomerek fordított retenciós időkkel eluálódtak az oszlopról! A kimerült oszlop alapos tisztítása és regenerálása után ismételt az eredeti retenciós időkkel sikerült az enantiomer párokat megkapniuk [Fuhshuku et al. 2000].

4. EREDMÉNYEK

4.1 A (3,4-metiléndioxifenil)aceton sztereoszelektív bioredukciójának léptéknövelése

4.1.1 A sejttermelés fejlesztése és a sejtmassza előállítása 1000 literes fermentorban

4.1.1.1 A törzsfenntartás módjának hatása a tenyészet enzimaktivitására

A sejtmassza enzimaktivitásának szempontjából nagy jelentősége volt a friss szilárd tenyészetnek. A hűtőszekrényben 1 hétnél hosszabb ideig tárolt tenyészetekkel oltott fermentációk megfelelő sejtkoncentráció elérése mellett is gyengébb enzimaktivitással rendelkeztek, ezért heti rendszerességgel kellett átoltani *Z. rouxii* tenyészetünket. Megfelelő enzimaktivitású tenyészeteket nyertünk abban az esetben is, ha liofilizált, hűtőszekrényben tárolt por 1 g mennyiségét adtuk a 10 liter inokulum táptalajhoz. A 3.4.2 pontban leírt tenyésztési paraméterek megtartása mellett, 22 óra növesztés után így is 10^9 sejt/ml sejtkoncentrációt meghaladó sejtszámú előtenyészetrel tudtunk oltani.

4.1.1.2 Az inokulum tenyészet előállításának fejlesztése

A GYKI-15 típusú fermentorban a leírt körülmények között 22 órán keresztül tartott az exponenciális növekedési szakasz, melynek befejeztét a glükóz elfogyása miatti pH emelkedés, illetve a sejtkoncentráció növekedésének befejezése is mutatta. Legjobb enzimaktivitású tenyészetet abban az esetben kaptunk, amikor a 22 órás tenysézzel oltottuk a főfermentációs táptalajt (9. táblázat). Idősebb inokulum tenysézzel továbboltva szintén megfelelő sejtkoncentrációt értünk el a főfermentáció 24. órájára, de a tenyészet specifikus enzimaktivitása nem volt megfelelő. Egyértelművé vált, hogy a sejtszám és a specifikus enzimaktivitás között nincs egyértelmű összefüggés.

9. táblázat A különböző ideig növesztett inokulum tenyészet hatása az enzimaktivitásra

	Az inokulum tenyészet növesztési idői (óra)		
	16	22	36
Az inokulum tenyészet sejtszáma (sejt/ml)	$(3-4) \times 10^9$	$(7-11) \times 10^9$	$(10-15) \times 10^8$
A fermentáció sejtszáma (24. óra, sejt/ml)	$(6-9) \times 10^8$	$(18-25) \times 10^8$	$(15-25) \times 10^8$
A bioredukció hozama a 18. órában (%)	60-76	95-100	84-89

4.1.1.3 Az oltási arány hatásának vizsgálata

A sejttermelő fermentációs táptalaj térfogatának mindössze 0,1%-val oltva is megfelelő ADH aktivitású és sejtszámú fermentlevet kaptunk 10 literes fermentorban. A gyakorlatban azonban 1%-kal oltottuk az 1000 literes fermentort, mert így a magasabb kezdeti sejtkoncentráció mellett idegen organizmus felszaporodása még kisebb eséllyel fordulhatott elő. A 10% oltóanyag alkalmazásánál megfelelő sejtkoncentráció elérése mellett is gyenge enzimaktivitású sejtömeget kaptunk, mert túlságosan nagy arányban (kb. 10%) voltak jelen előregedett sejtek a bio redukciós masszában (10. táblázat).

10. táblázat Az inokulálási ráta hatása az enzimaktivitásra

	Oltási arány (%)		
	0,1	1	10
A főfermentáció kezdeti sejtszáma (sejt/ml)	10^6	10^7	10^8
A fermentáció sejtszáma (24. óra, sejt/ml)	$(10-22) \times 10^8$	$(18-25) \times 10^8$	$(18-25) \times 10^8$
A bio redukció hozama a 18. órában (%)	95-100	95-100	78-83

Váratlan eredményt kaptunk az inokulum lépcsők hatásának vizsgálatánál: már a második inokulálási lépcső beiktatásával is romlott a sejt specifikus enzimaktivitása. Az oltási lépcsők hatásának vizsgálatánál 1% oltási arányt alkalmaztunk. Ezzel a legnagyobb készülékünk oltását is egyetlen inokulum lépcsővel sikeresen megoldottuk, így ennek további vizsgálatát, optimalizálását nem folytattuk.

4.1.1.4 A sejttermelő táptalajok kifejlesztése

A korábban leírt költséges sejttenyésztési eljárás [Vicenzi et al. 1997] az IVAX Fermentációs Kísérleti Üzemének körülményei között nem volt alkalmas megfelelő enzimaktivitással rendelkező sejtmassza előállítására. Mivel mind az inokulum, mind a főfermentációs táptalaj állati eredetű összetevőt is tartalmazott, így három igénypont fogalmazódott meg egy új táptalajokat tartalmazó technológia kifejlesztésére:

- Megfelelő enzimaktivitású tenyészet előállítása.
- A táptalajok egyike sem tartalmazhat állati eredetű komponenst.
- Csökkentett költségű táptalajok (léptéknövelten is gazdaságos).

Az inokulum táptalaj minőségének vizsgálata

Az inokulum táptalaj összetevőit alapvetően nem kellett megváltoztatni, mert robbanásszerű növekedést tapasztaltunk az exponenciális növekedési szakaszban, egyedül az állati eredetű pepton kellett kiváltanunk. Kipróbáltunk különböző gyártók által forgalmazott szójakészítményeket, de az ezek adagolása mellett növesztett tenyészetek megfelelő növekedés mellett szintén rossz enzimaktivitást mutattak. Végül az Oxoid Vegetable pepton Nr. 1 (zöldborsóból készült pepton) vált be, amelyikkel az állati eredetű peptonéval megegyező eredményeket kaptunk. Érdekes és megnyugtató eredmény, hogy a Magyarországon forgalmazott (Difco, Fluka, Oxoid, Merck) maláta- és élesztő-kivonatok mindegyikével megfelelő minőségű oltóanyagot tudtunk előállítani, a különböző gyártók termékei között minőségi különbséget nem tapasztaltunk.

A főfermentációs táptalaj fejlesztése

Nehezebb feladat volt a költségérzékeny főfermentációs táptalaj kiválasztása. Az alapszénforrásnak a mindenhol könnyen hozzáférhető glükózt, alapvető nitrogén forrásnak pedig a magyar fermentációs iparban általánosan alkalmazott kukoricafehérjét választottuk. Ezen komponensek mennyiségek optimalizálását a Box-Wilson kétváltozós kísérleti terve alapján próbáltuk meghatározni. Előkísérleteink során megállapítottuk, hogy a megfelelő kiegészítővel jó enzimaktivitású tenyészeteket kaptunk, az alapvető két összetevő mennyiségétől függetlenül, így az optimalizálást csak a sejtszámra kellett elvégeznünk.

A kukoricafehérje bár jó nitrogénforrásnak bizonyult –megfelelő enzimaktivitású sejtmasszát állítottunk elő felhasználásával–, de a fehérjében lévő szennyeződések rontották a gyanta adszorpciós képességét, így a bioredukciós elegyben a keton/alkohol koncentrációja megnőtt, ami megakadályozta a redukció befejezését.

A kukoricafehérjét kukoricafehérje porral (Roquette, Solulys HPP) próbáltuk helyettesíteni, aminek előnye az lett volna, hogy világszerte beszerezhető, és állandó minőségű komponens. Alkalmazásával nem kaptunk kielégítő ADH enzimaktivitású sejtmasszát, ezért a kukoricafehérje megtisztítása mellett döntöttünk. Kifejlesztettünk egy egyszerű technológiát, melynek során megszabadulunk a hőre, és a magas pH-ra kicsapódó szennyezőktől. Az így előállított kukoricafehérje felülcsiszolásból (CLS) szobahőmérsékleten és semleges pH tartományban lejátszódó bioredukció során nem csapódott ki szennyező anyag. A CLS alkalmazásának egyetlen problémája

volt, hogy a kukoricalekvár minősége a világ különböző részein a kukorica minőségétől és fajtájától, valamint a kukoricakeményítő gyártásának technológiájától függően változó, az általunk leírt technológia csak a Hungrana, Amysteep 234 típusú készítményének alkalmazása mellett reprodukálható.

4.1.1.5 A pH szabályozás hatása a sejtömeg előállítására és annak enzimaktivitására

A sejtermelő fermentáció pH görbéje szabályozás nélkül 4,0-4,5-ig csökken a növekedés exponenciális szakaszában, majd nő, és a glükóz teljes kimerülése után 7,0-8,0 közé áll be. Ezért egyértelművé vált, hogy amennyiben szükséges, akkor is elegendő az egyoldali pH szabályozás. A pH szabályozás hatásának vizsgálatát GYKI-15 típusú fermentorban végeztük el. Ammónia, illetve nátrium-hidroxid oldattal úgy szabályoztuk a táptalaj pH-ját, hogy az ne csökkenjen 6,0 alá. A 24 órás növesztés után megvizsgáltuk a tenyészet sejt koncentrációját és enzimaktivitását. Eredményeinket a 11. táblázatban foglaltam össze. A sejt koncentrációban nem tapasztaltunk különbséget, míg az ammónia oldattal szabályozott tenyészet enzimaktivitása nem volt megfelelő. A tenyészet enzimaktivitása azonban pH szabályozás nélküli növesztés mellett is megfelelőnek bizonyult.

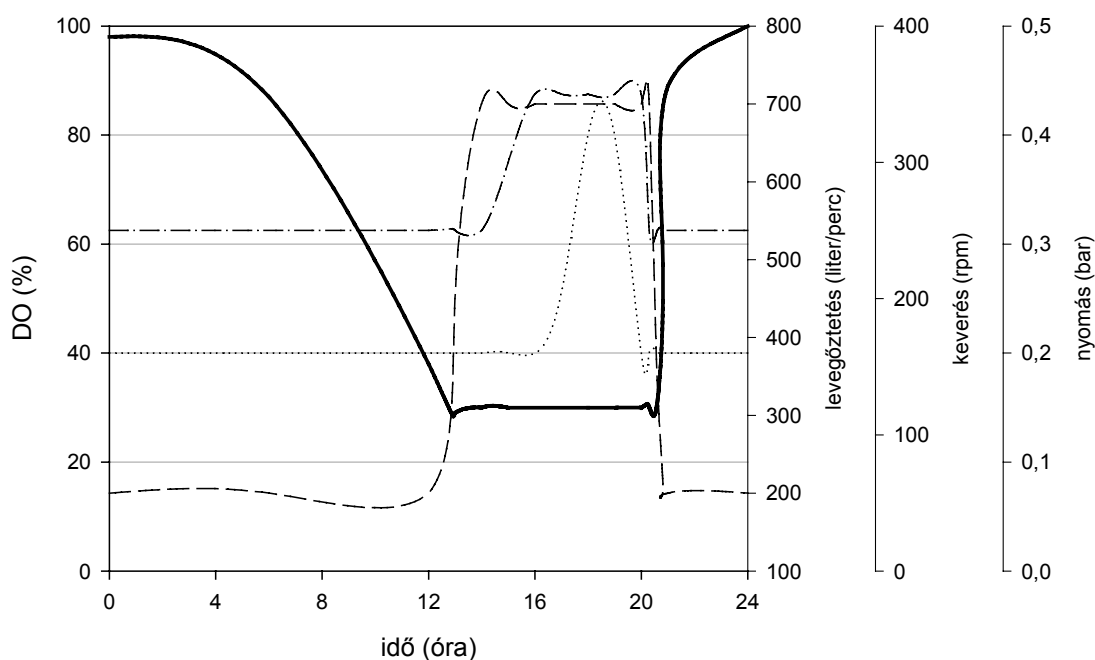
11. táblázat A pH szabályozás hatása a növekedésre és a tenyészet enzimaktivitására

	pH szabályozás ($\geq 6,0$)		
	Ammónia	NaOH	Szabályozás nélkül
A fermentlé sejtszáma (24. óra, sejt/ml)	$(15-22) \times 10^8$	$(18-25) \times 10^8$	$(15-25) \times 10^8$
A bioredukció hozama a 18. órában (%)	75-85	95-100	95-100

4.1.1.6 Az oldott oxigén szabályozási stratégia optimalálása

Az oldott oxigén szabályozásának szükségessége az első léptéknövelt fermentáció során kiderült, hiszen a nem szabályozott fermentációknál beállított alapértékek mellett az oldott oxigén koncentrációja nulláig süllyedt, ezzel megállítva az exponenciális növekedési szakaszt. A levegőztetést viszont nem állíthattuk a fermentáció kezdetén magas térfogatáramra, mert akkor kihabzott volna a táptalaj. A keverést szintén nem célszerű magas fordulatszámra működtetni a fermentáció teljes időtartama alatt. Az alkalmazott folyamatirányító rendszer részeként a gyártó céggel közösen egy oldott oxigén szabályozó algoritmust fejlesztettünk. Két beavatkozási sorrend

közül választhattunk: levegőztetés – keverés – nyomás, vagy keverés – levegőztetés – nyomás. Esetünkben az oldott oxigén hirtelen és gyors zuhanását csak a levegőztetés emelésével tudtuk ellensúlyozni (200 liter/percről 700 liter/percig emeltük), majd amikor elértük a levegőztetés emelésének felső határát, akkor a keverést emeltük 250 rpm-ről 350 rpm-ig, amennyiben ez sem elegendő a belső nyomást emeltük 0,2-ről 0,4 barra. Legelső relatív oldott oxigén szintnek a 30%-ot választottuk. Egy GYKI-1000 literes fermentorban végrehajtott szabályozás trendgörbéit (DO, levegőztetés, keverés, nyomás) mutatja a 27. ábra. A validált folyamatirányító rendszer egy folyamatosan gyűjtött szarzs adatai alapján készült trendgörbéjét a I. mellékletként csatoltam. A 30%-os relatív telítettség alatt már a sejtek nem levegőznek megfelelően, szaporodásuk lelassul. Érdekes eredmény, hogy a rosszul levegőztetett körülmények ($DO \leq 30\%$) között előállított sejtmassza tömege kisebb, de enzimaktivitása megegyezik a jól levegőztetett tenyészetek aktivitásával.



27. ábra Az oldott oxigén szabályozás stratégiája (DO: vastag folytonos; levegőztetés: szaggatott; keverés: pont-szaggatott; nyomás: pontvonal)

4.1.1.7 A növesztés időtartamának hatása a tenyészet ADH enzimaktivására

A 27. ábra relatív oldott oxigén koncentrációjának görbéjéből könnyen kiolvasható, hogy az exponenciális növekedési szakasz a 18-20 óra között fejeződött be, ezután a sejtkoncentráció jelentősen nem növekedett (12. táblázat). Megvizsgáltuk különböző korú tenyészetek enzimaktivitását, és azt tapasztaltuk, hogy az exponenciális szakasz befejezése után 4-6 órával legjobb a tenyészetek enzimaktivitása.

12. táblázat A növesztés időtartamának hatása a tenyészet enzimaktivitására

	20 óra	24 óra	48 óra
A fermentlé sejtszáma (sejt/ml)	(13-25) x 10 ⁸	(18-25) x 10 ⁸	(18-30) x 10 ⁸
A bioredukció hozama 18. órájában (%)	80-90	95-100	90-100

4.1.2 A bioredukció fejlesztése

Az alkalmazott redukciós technológiát a korábbi közleményekben leírt módon nem tudtuk reprodukálni, a paraméterek nem voltak optimalizálva [Vicenzi et al. 1997]. Gyakran tapasztaltunk alacsony hozam mellett megakadt biokonverziót, a klinikai fázisokhoz szükséges mennyiségű hatóanyag gyártását sem tudtuk megkezdeni a bioredukció körülményeinek vizsgálata, a technológia fejlesztése nélkül.

4.1.2.1 A hőmérséklet hatása a redukció hozamára

Megvizsgáltuk a redukció hőmérséklettől való függését, és megállapítottuk, hogy az egyébként is rigid élesztősejt 25-36°C közötti hőmérséklettartományban gyakorlatilag mérhető különbség nélkül végzi el a bioredukciót, sem enzimaktivitásban, sem enantiomer tisztaságban nem tapasztaltunk különbséget. Technológiai szempontból a lehető legalacsonyabb hőmérséklet a kívánatos. A fermentlé fermentorból való kiengedése után nem tudtunk steril körülményeket biztosítani sem a dekantálás, sem a bioredukció során, így a levegőből és az érintkező felületekről szennyező mikroorganizmusok kerültek a sejtmasszába. Ezek közül a gyorsan szaporodó aerob baktériumok voltak veszélyesek a bioredukcióra, amik képesek felszaporodni a redukciós elegyben. Szaporodásuk során a koszubsztrátot felhasználják, a reakcióelegy pH-ját pedig lényegesen csökkentik, amely események bármelyike a termékképződés megakadásához vezet. Az idegen, káros mikroorganizmusok magas hőmérsékleten (>30°C) szaporodnak gyorsan, a 26°C viszont már kifejezetten lassítja szaporodásukat. Az alacsonyabb hőmérséklet alkalmazása óta idegen mikroorganizmus nem okozta a reakció megakadást.

4.1.2.2 A levegőztetés hatása a bioredukcióra

További fontos tapasztalatokhoz vezetett a redukciós elegy levegőztetésének vizsgálata. A reakció függetlenül a levegőztetéstől rendben végigfutott. Egyedüli problémát a szén-dioxid feldúsulása, és az ezzel együttjáró pH csökkenés okozott. Ezt kizárólag légmentesen zárt edényben tapasztaltuk, a legkevésbé intenzív keverés is elegendő a szén-dioxid kilevegőztetésére. A káros baktériumok felszaporodásának elkerülése érdekében azonban levegőbevezetés nem javasolt. A szén-dioxid kihajtására és az aerob baktériumok visszaszorításának érdekében nitrogén bevezetését javaslom a további léptéknövelés reprodukálhatóságának fenntartása céljából. Laboratóriumi léptéknél nem tapasztaltunk semmilyen gátló hatást, és az élő sejtszám pedig egyik esetben sem csökkent. A 13. táblázat foglalja össze a különböző módon levegőztetett rendszerek eredményeit.

13. táblázat A laboratóriumi léptékű bioredukció hozamának függése a különbözőképpen levegőztetett rendszerekben (n=3)

	Levegőztetés módja		
	Aszeptikusan zárt rendszer	Nyitott, kevertetett	Nitrogén bevezetés
A bioredukció hozama (4. óra) (%)	26-38	45-60	45-60
A bioredukció hozama (18. óra) (%)	55-75	95-100	95-100

4.1.2.3 A gyantát tartalmazó elegy keverése

Az alkalmazott gyanta rendkívül hasznos adszorbensként lehetővé tette a bioredukciós elegy koncentrációjának mintegy húszszoros emelését azáltal, hogy mind a terméket, mind a szubsztrátot olyan mértékben adszorbeálja felületén, hogy a sejt által hozzáférhető vizes közegben a reagensek toxikus érték alatti koncentrációtartományban maradnak. Az alkalmazott XAD-7 gyanta viszont könnyen elporlik keverés hatására, miáltal elveszíti előnyös tulajdonságait, és a reagensek koncentrációja a kritikus érték fölé emelkedik, a bioredukció lelassul, majd leáll.

Laboratóriumi léptékben ugyanazon mágneskeverővel különböző fordulatszámokon, valamint különböző méretű keverőelemeket alkalmazva, azonos fordulatszámokon vizsgáltuk a redukció lefutását. Arra természetesen gondosan ügyeltünk, hogy megfelelően átkeveredjen a rendszer. Összehasonlításként keverőelem nélkül, síkrázón, 90 rpm sebességgel is futtattuk a reakciót (14. táblázat). Ez utóbbit vettük az elérhető legjobb reakcióidőnek, mivel itt a gyanta egész biztosan nem sérül. A gyanta nagyobb méretű keverőelem, valamint nagyobb fordulatszámú keverés hatására is

elveszítette adszorbeáló képességét, ezzel megállította a reakció lefutását. A léptéknövelt bioredukció esetében a Rosenmund reaktor speciális keverőeleme 30 rpm keverési sebesség mellett többszöri felhasználás során sem rongálta a gyantát.

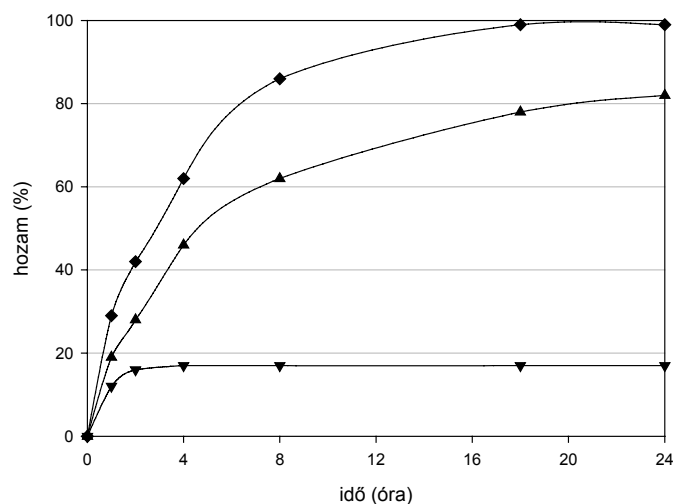
14. táblázat A különböző keverési módok hatása a biokonverzióra

	Keverőelem		
	Síkrázón	Keverőelem	
		3 cm	5 cm
A bioredukció hozama 4. órában (%)	55-60	50-60	21-45
A bioredukció hozama 18. órában (%)	95-100	95-100	38-60
	Keverés sebessége		
	50 rpm	100 rpm	200 rpm
	A bioredukció hozama 4. órában (%)	50-60	45-50
A bioredukció hozama 18. órájában (%)	95-100	55-60	≤15

A síkrázót 90 rpm fordulatszámra, a mágneskeverőt a táblázat felső felében pedig 50 rpm-re állítottuk. A fordulatszám hatását vizsgáló kísérletet pedig a 3 cm hosszú keverőelemmel végeztük el. A síkrázóra felhelyezett reakcióelegyet 100 ml Erlenmeyer lombikba, a keverőelemmel mozgatott elegyeket pedig 100 ml főzőpohárba öntöttük. A főzőpohár átmérője 5,5 cm volt.

4.1.2.4 A gyanta arányának hatása a biokatalizátorra

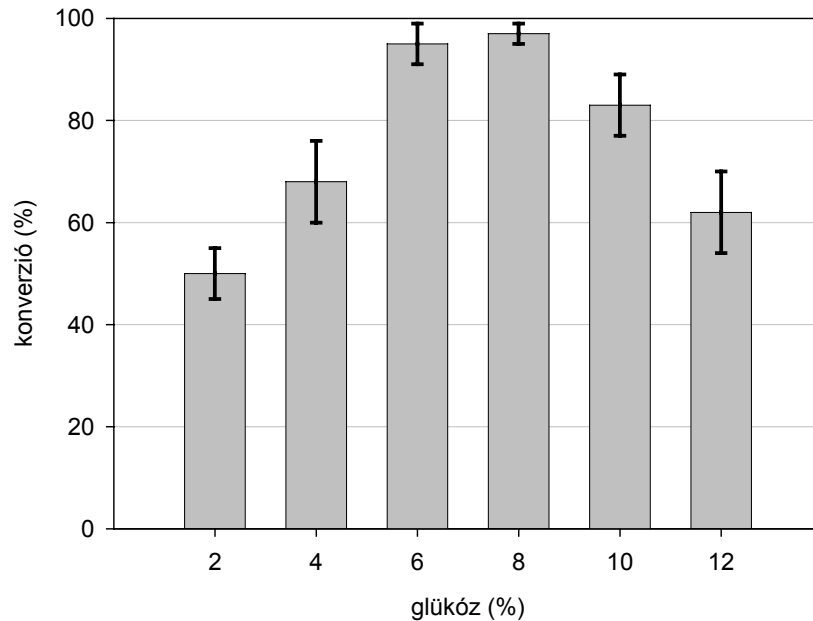
A reakció a reagensok gyanta-vizes fázis megoszlására rendkívül érzékeny. A gyanta/reagens arány optimalizálását már korábban elvégezték [Zmijewski et al. 1997]. Ellenőrzésképpen mi is felállítottunk egy kísérletet, ahol a gyanta mennyiségét 20%-kal csökkentettük, illetve növeltük, miközben a reakcióelegy többi komponensét változatlanul adagoltuk. A 28. ábra mutatja, hogy a gyanta mennyiségének 20%-os csökkentése olyan magas reagenskoncentrációt eredményez, hogy az átalakulás már a 2. órára megáll, míg a 20%-kal több gyanta alkalmazásakor egy időben elhúzódó reakciót kapunk, ugyanis a reaktív vizes fázisban alacsony az átalakítandó keton koncentrációja.



28. ábra A gyanta mennyiségének hatása a redukció lefutására (▲: +20% gyanta, ▼: -20% gyanta)

4.1.2.5 A kozubsztrát mennyiségének vizsgálata

Az egész-sejtes bioredukciós rendszerek nagy előnye az *in vivo* kofaktor regenerálás. A NADP kofaktor redukciójához kozubsztrátra van szükség, melynek lebontása során NADPH keletkezik. Jónéhány cukrot és alkoholt megvizsgáltunk, és megállapítottuk, hogy az alkoholok nem megfelelő kozubsztrátjai a *Z. rouxii* ADH-nak, a cukrok közül a glükóz és a szaharóz alkalmazása vezetett teljes átalakításhoz. Az emelt koncentrációjú, gyantás rendszerhez 2–12% mennyiségű glükózt adagoltunk. A 2 és 4% glükóz adagolása kevésnek bizonyult 8% adagolása mellett kisebb szórással kicsit magasabb átlagértékkel kaptuk az alkoholt, mint 6% adagolása mellett. A 10 és 12% glükóz adagolásakor pedig a képződő etanol lehetett felelős az átalakítás gátlásáért.



29. ábra A különböző glükóz koncentrációk hatása a biokonverzióra

4.1.2.6 A sejtszeparálás módjának hatása a biokatalizátor ADH aktivitására

A biokatalizátor ülepítésének léptéknövelésekor a sejtre számos olyan tényező hatott, amivel laboratóriumi körülmények között nem találkozhattunk. A léptéknövelt sejtmassza előállítását egy 6000 rpm fordulatszámú forgó, 60 cm hosszú, vízszintes tengelyelrendezésű dekanter segítségével oldottuk meg. A laboratóriumi centrifugához képest a tartzkodási idő a 20 percről 5 percre csökkent, a 16-18°C-ra visszahűtött fermentlé hőmérséklete 38-42°C-ra melegedett a szeparálás során, a sejtmasszát pedig egy dobon belüli csiga terelte a kiömlő nyílás irányába. Tapasztalataink alapján egyik tényező sem rontotta a sejt életképességét és enzimaktivitását. Egyedüli különbségként a sejtmassza eltarthatóságát jegyeztük fel. Míg a laboratóriumi mennyiségű sejtmasszát egy steril, lezárt Petri csészében egy hétig is tárolhattuk enzimaktivitásának romlása nélkül, addig a 60 kg körüli sejtömeget 24 órán belül fel kellett használni. Ennek oka az, hogy nagyon lassan hül át a nagy tömeg, és a sejtmassza belsejében kedvezőtlen folyamatok játszódhatnak le, a massa száradó felületén pedig több alkalommal figyeltünk meg penészgomba növekedést.

4.1.2.7 A tisztított sejtmassza vizsgálata

A dekantálás során a különböző szennyeződések (a táptalaj komponensei, különböző metabolittermékek) a sejtmasszával együtt kiülepedtek (30. ábra). Azokban az esetekben, mikor a gyanta nem volt sérült és fertőzést sem regisztráltunk, a szennyezést tettük felelőssé a reakció megakadásáért. Ezt oly módon bizonyítottuk, hogy ugyanazt a sejtmasszát átmostuk desztillált vízzel, majd ezután lefuttatva a reakciót már nem tapasztaltuk a reakció megakadását. A jelenség oka a gyanta adszorpciós tulajdonságának csökkenésében keresendő: a szennyezések eltömítették a gyantát, így az folyamatosan kevesebb reagenst tudott megkötni. A vizes fázisban a keton/alkohol koncentráció elkezdett növekedni, majd a kritikus koncentrációt elérve megállította a redukciót, mivel az elpusztult sejtek nem regenerálták a NADP kofaktort.



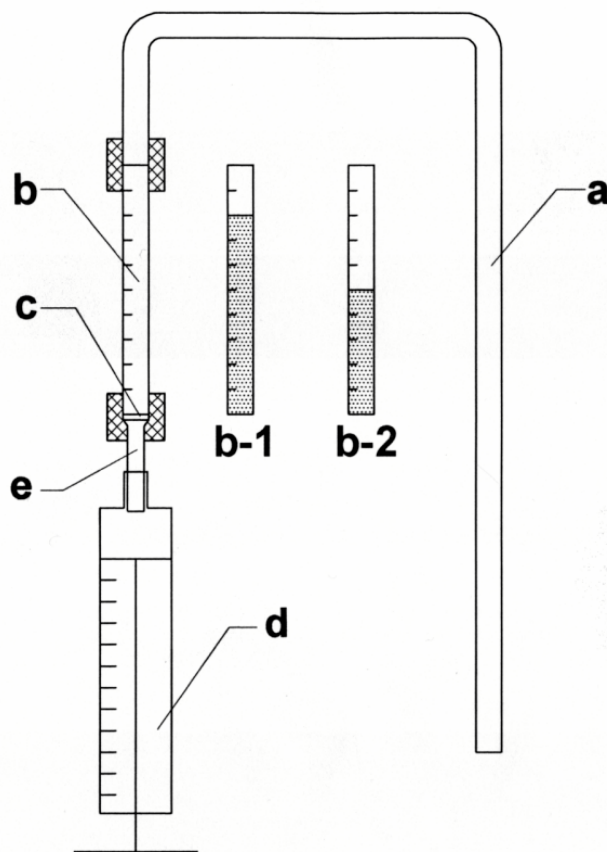
30. ábra Bal oldalon a tisztítás nélküli, míg jobb oldalon a tisztított sejtmassza látható

Mivel ez a probléma csak ritkán jelentkezett, ezért mint kiváltó okra, a sterilizálás közbejött túllejedésre gondoltunk. A sterilizálás alatti hőmérséklet-lengés csökkentésével a gyanta eltömődéséért felelős szennyezők eliminálódtak, így nem volt szükség az idő és energiaigényes sejtmassza tisztításra.

4.2 Multi-funkcionális mintavevő berendezések gyantát alkalmazó reakcióegyhez

4.2.1 A mintavevő berendezés működésének bemutatása

Kifejlesztésre került egy olyan mintavevő berendezés, amelyik önmagában alkalmas a nedves (31. ábra, b-1), és a száraz (b-2) gyanta mennyiségének meghatározására, továbbá a gyanta felületén adszorbeált terméket/szubsztrátot szerves oldószerrel le is oldhattuk [Erdélyi et al. 2003].



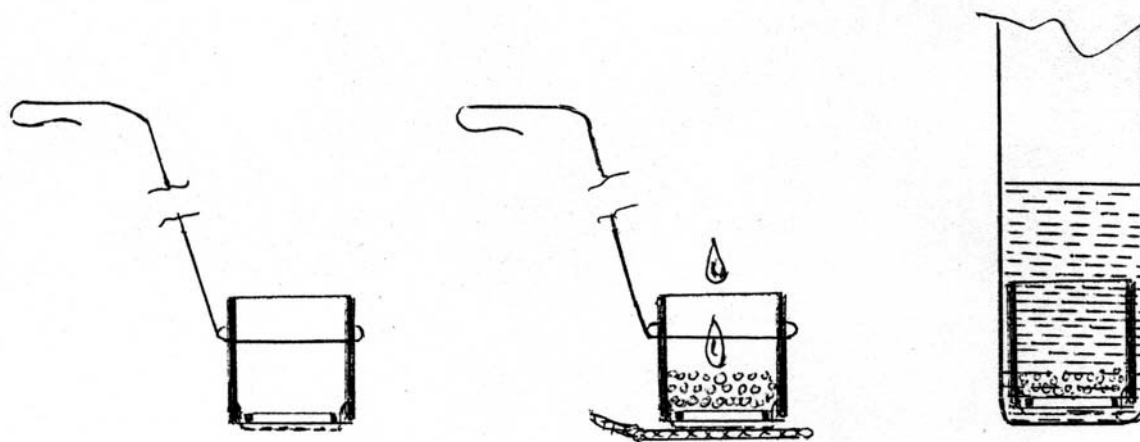
31. ábra Multifunkcionális mintavevő berendezés elemei: (a) hajlított üvegcső; (b) osztott (ml) üvegcsődarab; (c) 150 μm -es szűrőszita rozsdamentes acélból; (d) 10 ml-es fecskendő; (e) szűkítő közdarab

Az eszköz használata egyszerű: a fecskendő segítségével 6-8 ml nedves gyantát szívunk fel, ami a szűrő feletti osztott üvegcsőben megül. Ekkor leolvasható a térfogat, majd desztillált vizet kétszer a gyantán átszívva lemoshatóak a vízoldható fermentációs szennyeződések. Ezután 10 ml acetont átszívva a gyantán leoldhatóak a komponensek.

4.2.2 A mintavevő berendezés egyszerűsített változata

A mintavevő berendezés egyszerűsített változatát használtuk az optimalizációs munkáink során [Erdélyi et al. 2004]. Működésének lényege megegyezik a multifunkcionális mintavevő berendezésével, de felépítése egyszerűbb, használata gyorsabb, ahogy azt a 32. ábra szemlélteti. A mintavevő egy vékony üvegcsődarabból áll, amit alulról egy 150 μl -es szűrőszita zár le. A mintavevőt a gyantát tartalmazó reakcióelegybe merítve mintát vettünk, majd pár csepp desztillált vízzel mostuk, végezetül egy ismert mennyiségű acetont, vagy más szerves oldószert tartalmazó kémcsőbe ejtettük.

Természetesen ez a módszer a csak konverzió százalékos követésére alkalmas, pontos kvantitatív eredményhez a korábban bemutatott eszközt alkalmaztuk.

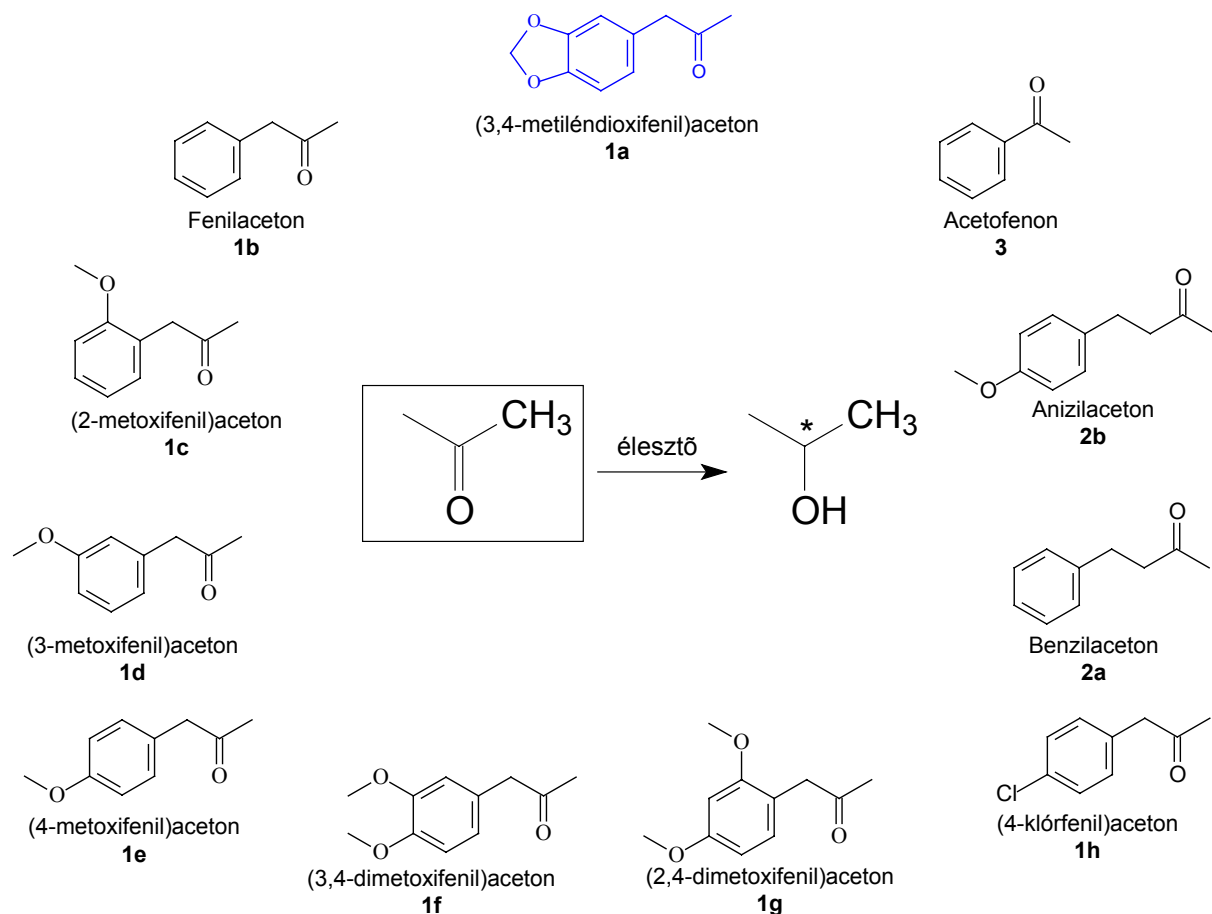


32. ábra Az egyszerűsített mintavevő berendezés működésének vázlata

4.3 A *Z. rouxii* karbonil reduktáz aktivitásának jellemzése

A Talampanel utódmolekuláinak szintézise, valamint az alkalmazott élesztő ADH rendszerének jellemzése céljából különböző aromás metil ketonok sztereoselektív bioredukcióját végeztük el laboratóriumi körülmények között (Anyagok és módszerek 3.5.1).

A különböző fenilaceton származékok sztereoselektív redukciója a Talampanel követők szintézise miatt volt lényeges, az acetofenon, benzilaceton, illetve annak származéka az anizilaceton pedig a lánchossz növekedése és a hozam, optikai tisztaság közötti összefüggés miatt volt érdekes számunkra (33. ábra).



33. ábra A bioredukció sematikus ábrája, valamint a vizsgált ketonok és számozásuk

Valamennyi keton/alkohol abszorpciós spektrumát felvettük, és a maximumot adó hullámhosszon végeztük el a méréseket. A 15. táblázatban a mérési hullámhosszok mellett feltüntettem a R_f értékeket is, melyekből egyértelműen kiténik, hogy megfelelő elválasztást sikerült elérnünk egy egyszerű és gyors VRK módszerrel. Az **1c**, **1d**, **1e**, **1f**, **1g** és a **2a** ketonok és belőlük képzett alkoholok abszorbancia maximumai különböző értéket vettek fel. Annak érdekében, hogy a hozam értékeket ezek a különbségek ne torzítsák, bevezettünk egy korrekciós tényezőt (ξ), mellyel szorozva az alkohol integrált területét egy olyan értéket kapunk, amelyik összevethető a keton által adott integrált területtel.

15. táblázat Néhány keton - alkohol pár abszorpciós maximumai (λ_{\max}) és R_f értékei

Jele	Keton		Alkohol		ξ
	R_f	λ_{\max} (nm)	R_f	λ_{\max} (nm)	
1b	0,79	190	0,50	190	-
1a	0,72	285	0,48	285	-
1h	0,78	220	0,48	220	-
1f	0,50	277	0,33	277	0,90
1e	0,92	272	0,60	272	0,81
2a	0,81	221	0,46	221	0,86
2b	0,73	207	0,41	207	-

A királis oszlopon elválasztott enantiomer párok retenciós időit tartalmazza a 16 .táblázat.

16. táblázat Néhány királis alkohol enantiomereinek retenciós idői (R_t). Az E1 a rövidebb, az E2 jelölés pedig a hosszabb retenciós idővel eluálódott enantiomert jelöli.

Jele	R_t (perc)	
	E1	E2
1a	(<i>S</i>) 11,57	(<i>R</i>) 12,91
1c	2,13	2,69
1f	(<i>S</i>) 9,67	(<i>R</i>) 10,31
1g	1,89	2,09
2a	5,21	7,42
2b	10,63	12,66
3	3,86	4,71

A *Z. rouxii* sejtrel különböző ketonokon elvégzett bioredukció eredményeit tartalmazza a 21. táblázat tartalmazza. Az alacsony terhelés mellett (10 mmól) a 60% alatti konverziót gyengének minősíthetjük. Az ilyen eredményt adó ketonok esetében (**1c**, **1f**, **1g**, **2a**, **2b**, **3**) más biokatalizátort kell keresni, amennyiben szükség lesz a belőlük képzett alkoholokra valamely hatóanyag szintézise során. Nem meglepő módon a szubsztituátlan fenilacetont (**1b**) jobb konverzióval alakította át a törzs, mint amire egy nagyszámú baktérium-, fonalas gomba- és élesztőtörzset áttekintő screen során szelektálták (**1a**) [Zmijewski et al. 1997]. A fehérjekötést és az átalakítást jobban befolyásolja a szubsztitúciós csoport helye, mint a csoport minősége. A 4. szénatomon halogénezett (**1h**) és a metoxi csoportot tartalmazó (**1e**) fenilacetont átalakítása is jó konverzióval és enantiomer szelektivitással, míg a 2. szénatomon szintén metoxi csoportot tartalmazó származék (**1c**) átalakítása rossz. Mivel a dimetoxi származékoknál (**1e**, **1g**) ugyanezt figyelhetjük meg,

megállapíthatjuk, hogy a 2. szénatomon lévő szubsztituens gátolja az enzim-szubsztrát kapcsolat kialakulását, ilyen származékok esetében más biokatalizátort kell találnunk.

Az általános elvárásoktól eltérő eredményt kaptuk a szénlánc hossza és az enantiomer felesleg közötti összefüggés tekintetében. A szénlánc növelése (**2a**) alacsonyabb enantiomer tisztaságot, míg a rövidebb szénláncú acetofenont (**3**) tökéletes optikai tisztasággal állította elő a *Z. rouxii* ADH enzimrendszere. A konverzió értékek viszont ezzel ellentétesek; az acetofenont rossz konverzió mellett alakította át optikailag tiszta alkohollá, ami ritka, bár ipari szempontból nem hasznos eredmény. A hosszabb szénláncú benzilaceton esetében is láthatjuk, hogy a 4. szénatom szubsztituense segíti az enantiomer irányultságot, akárcsak a fenilaceton esetében, a benzilacetonnál is magasabb enantiomer értéket kaptunk a 4-metoxi származékok esetében (**1b** vs **1e** és **2a** vs **2b**).

A 17. táblázatban látható, hogy az **1c**, **1g**, **1h** és a **2b** ketonokból képzett alkoholok szerkezetazonosítása még nem történt meg. Az abszolút konfigurációk megállapítása és a nem bizonyított szerkezetek azonosítása folyamatban vannak.

17. táblázat A királis alkoholok szerkezetazonosítása irodalmi hivatkozásai

Szubsztrát jele	Termék neve	Irodalmi hivatkozás
1a	(S)-(+)-1-(3,4-metiléndioxifenil)propán-2-ol	Zmijewski et al. 1997.
1b	(S)-(+)-1-fenilpropán-2-ol	Burgess et al. 1991
1c	(S)-(+)-1-(2-metoxifenil)propán-2-ol	Zu-Yun et al. 1985
1d	(S)-(+)-1-(3-metoxifenil)propán-2-ol	n.a.
1e	(S)-(+)-1-(4-metoxifenil)propán-2-ol	Ferraboschi et al. 1990
1f	(S)-(+)-1-(3,4-dimetoxifenil)propán-2-ol	Itoh et al. 2002
1g	(S)-(+)-1-(2,4-dimetoxifenil)propán-2-ol	n.a.
1h	(S)-(+)-1-(4-klórifenil)propán-2-ol	n.a.
2a	(S)-(+)-4-fenilbután-2-ol	Park et al.
2b	(S)-(+)-4-(4-metoxifenil)bután-2-ol	n.a.
3	(-)-1-feniletanol	Goering et al. 1970

4.4 A *D. hansenii* karbonil reduktáz aktivitásának jellemzése

Az irodalomból ismert, a *Z. rouxii* ADH enzimaktivitásához hasonló aktivitású törzssel is elvégeztük laboratóriumi körülmények között a 33. ábraán bemutatott ketonok redukcióját. Irodalmi hivatkozás szerint [Zmijewski et al. 1997] a *Debaryomyces hansenii* anamorf változata a *Candida famata* azonos körülmények között alacsony keton terhelés mellett a *Z. rouxii*-hoz hasonlóan végzi el a redukciót, különbséget csak a keton koncentrációjának növelése során tapasztaltak.

4.4.1 A koszubsztrát kiválasztása

Ennél a törzsnél is megvizsgáltunk egy sor koszubsztrátot, hogy kiválasszuk a törzs enzimrendszerének legmegfelelőbbet. A kísérletet a 3.5.1 pont alatt leírtak szerint végeztük el. Az **1a** mellett kiválasztottunk egy hosszabb szénatomláncú ketont is (**2**). A glicerin és a szorbit ennek a törzsnek sem megfelelő koszubsztrátja, a glükóz és a szaharóz pedig hasonló hozam értékeket biztosított (18. táblázat). A primer alkoholok egyike sem, míg a szekunder alkoholok közül a rövidebb 2-propanol kiemelkedő, mindkét keton esetében teljes átalakítást eredményezett. További vizsgálatainkhoz a 2-propanolt alkalmaztuk a *D. hansenii* koszubsztrátjaként.

18. táblázat Az adagolt koszubsztrát hatása a *D. hansenii* ADH aktivitására

Koszubsztrát	1a	2
	Hozam (%)	
Glükóz	78	76
szaharóz	76	78
glicerin	54	32
szorbit	33	33
metanol	32	23
etanol	30	15
propanol	20	11
2-propanol	100	86
butanol	5	7
2-butanol	5	9

A kiválasztott koszubsztráttal (2-propanol) és a glükózzal, a fenti két szubsztráton gyantás közegben, a 3.5.2 pontban leírtak szerint elvégeztük a redukciót. A bioeredukciók hozamait a 19. táblázat foglalja össze. Megnövelt koncentrációnál már egyik ketont sem tudta visszamaradó szubsztrát nélkül redukálni, sőt visszaalakulás (oxidáció) figyelhető meg a transzformáció 4. órája

után. A *Z. rouxii* sejtek aktivitásával összevetve megállapítható, hogy a reakció első 4 órájában egy gyorsabb enzimműködést figyelhetünk meg, majd a redukció megakad.

Vizsgálataink során megállapíthattuk, hogy az alkalmazott törzsek esetében a koszubsztrát minősége a konverzióra nagy mértékben, míg az enantiomer tisztaságra nincs hatással.

19. táblázat Emelt szubsztrátkoncentráció melletti hozam eredmények *D. hansenii*-vel

Keton	1a				2			
	Glükóz		2-propanol		Glükóz		2-propanol	
	Hozam (%)	ee (%)	Hozam (%)	ee (%)	Hozam (%)	ee (%)	Hozam (%)	ee (%)
2 óra	53		70		42		74	
4 óra	66		74		53		73	
16 óra	75		68		57		79	
24 óra	75	>99(S)	68	>99(S)	58	57(E2)	82	59(E2)

4.4.2 Kísérletek nagyobb hozam elérésére

Két kísérletet végeztünk el a *D. hansenii*-vel történő redukció teljessé tételére (100% konverzió): csökkentett ketonkoncentráció mellett vizsgáltuk az átalakítás hozamát (20 g/liter), valamint a redukció 4. órájában ismételt koszubsztrát (2-propanol, 125 µl) adagolással próbáltuk a reakciót továbbvinni. A 20. táblázatot áttekintve láthatjuk, hogy egyik kísérleti felállítás sem vezetett eredményre. Bár a keton kezdeti koncentrációjának csökkentése emelte a hozamot, teljes átalakítást mégsem kaptunk. A 2-propanol ráadagolás szintén nem vezetett teljes átalakításra.

20. táblázat A bioredukció hozam értékei csökkentett keton (1a) terhelés, illetve 2-propanol ráadagolás mellett

	20 g/liter	2-propanol ráadagolás
2 óra	79	70
4 óra	82	74
16 óra	79	77
24 óra	79	77

4.4.3 A szubsztrát tolerancia vizsgálata

A vizsgált ketonok mindegyikén elvégeztük a bioredukciót és összevetettük a *Z. rouxii* alkalmazása során kapott eredményekkel (21. táblázat). Az alkalmazott *D. hansenii* törzs ADH enzimrendszere kevésbé szubsztráttoleráns, mint a *Z. rouxii*-é. A vizsgált 11 aril metil ketont 57-99% hozam értékek mellett alakította át, a 2. szénatomon szubsztituált fenilacetone származékokat (**1c**, **1g**) is megfelelő hozammal és magas enantiomer tisztasággal redukálta. A *D. hansenii* alacsonyabb hozam érték mellett redukálta a 4-metoxi (**1e**), magasabb hozammal a 3-4-dimetoxi származékot (**1f**), hasonlóan magas ee értéket produkálva. Akárcsak a *Z. rouxii* esetében a *D. hansenii* is gyenge enantiomer tisztasággal redukálta a benzilacetont (**2a**), a 4-metoxi származéka (**2b**) viszont szintén jelentősen javította az optikai tisztaságot, de a reakció hozama itt is alacsony maradt. Ugyanezt a „térbeli beállítás segítést” tapasztaltuk a fenilacetone (**1b**) és a (4-metoxifenil)acetone esetében is (**1g**). A halogénezett származékot (**1h**) megfelelő hozammal és szintén tökéletes optikai tisztasággal redukálta a második törzs is. Nagy különbséget az acetofenon (**3**) redukciója során mértünk, szintén tökéletes optikai tisztaság mellett kétszeres hozammal állította elő az alkoholt.

21. táblázat A *Z. rouxii* és a *D. hansenii* specifikus enzimaktivitásának összehasonlítása

Szubsztrát	<i>Z. rouxii</i>		<i>D. hansenii</i>	
	Hozam (%)	ee (%)	Hozam (%)	ee (%)
1a	90	>99 (S)	>99	>99 (S)
1b	>99	82 (E1)	78	77 (E1)
1c	15	7 (E1)	63	88 (E1)
1d	85	87 (E1)	71	93 (E1)
1e	82	>99 (E1)	67	95 (E1)
1f	31	>99 (S)	58	>99 (S)
1g	17	80 (E1)	58	>99 (E1)
1h	84	>99 (E1)	78	>99 (E1)
2a	28	66 (E2)	57	59 (E2)
2b	33	82 (E2)	58	80 (E2)
3	37	>99 (S)	63	>99 (S)

4.5 A liofilizált biokatalizátorok ADH aktivitása

A sejtmassza liofilizátumkénti tárolására, majd egy rövid és egyszerű regenerálási szakasz utáni biokatalizátorként történő felhasználására vonatkozó vizsgálataink megkezdésének három oka volt:

- (i) a sejtmassza tárolhatósága nehézkes, és a tárolás körülményeitől erősen függő mértékben csökken a enzimaktivitás,
- (ii) amennyiben a biokatalizátor előállítás és a szintézis földrajzilag eltérő helyen történik, úgy a könnyű, liofilizált sejtmasszát egyszerűen szállíthatjuk,
- (iii) Molinaria és társai [1999] liofilizált biokatalizátor alkalmazásával remek eredményeket értek el sztereoszelektív bioredukciós kísérleteik során.

4.5.1 A fagyasztás módjának hatása a biokatalizátorra

Első lépésként megvizsgáltuk, hogy a különböző lehütési módszerek milyen hatással vannak a liofilizátum későbbi életképességére és enzimaktivitására (22. táblázat). Azt tapasztaltuk, hogy lassú lehűtés, illetve a -200°C hőmérsékletig hűtés során az élő sejtszám csökkenése jelentős, valamint a sejtek enzimaktivitása is hasonló mértékben esett vissza. Az acetonos szárazjégben történő fagyasztás, majd szárítás után kapott por tömege 65-70%-kal kevesebb, mint a bemért sejtmasszáé. Amennyiben a sejtmasszát megtisztítottuk a szárítási művelet előtt, úgy fehér színű port kaptunk.

22. táblázat A különböző fagyasztási módok hatása a liofilizált sejtmassza enzimaktivitására

Fagyasztás módja	Élő sejtszám (a fagyasztás előtti %-ában)	Hozam (%)	ee (%)
Acetonos szárazjég (ca. -79°C)	85-90	90	>99 (S)
Folyékony nitrogén (-200°C)	60-70	85	>99 (S)
Lassú fagyasztás (-80°C)	40-50	67	>99 (S)

4.5.2 A liofilizált *Z. rouxii* és a friss sejtmassza ADH enzimaktivitásának összehasonlítása

A liofilizált, majd regenerált biokatalizátor hasonló hozammal végezte el a bioredukciókat, mint a nyugvó sejtmassza. Az enantiomer felesleg értékek között viszont van magasabb érték, mint a nyugvó sejtmasszával végzett redukciónál. A (3,4-dimetoxifenil)aceton (**1g**), illetve az anizilaceton (**2b**) esetében kifejezetten magas enantiomer tisztaságot értünk el liofilizált sejtekkel (23. táblázat).

23. táblázat A friss és a liofilizált *Z. rouxii* sejtek enzimaktivitásának összehasonlítása

<i>Z. rouxii</i>	Friss sejt		Liofilizált sejt	
	Hozam (%)	ee (%)	Hozam (%)	ee (%)
1a	90	>99 (<i>S</i>)	87	>99 (<i>S</i>)
1b	>99	82 (E1)	90	85 (E1)
1c	15	7 (E1)	9	5 (E1)
1d	85	87 (E1)	69	87 (E1)
1e	82	>99 (E1)	80	>99 (E1)
1f	31	>99 (<i>S</i>)	31	>99 (<i>S</i>)
1g	17	80 (E1)	14	>99 (E1)
1h	84	>99 (E1)	87	>99 (E1)
2a	28	66 (E2)	27	57 (E2)
2b	33	82 (E2)	29	93 (E2)
3	37	>99 (<i>S</i>)	30	>99 (<i>S</i>)

4.5.3 A liofilizált *D. hansenii* és a friss sejtmassza ADH enzimaktivitásának összehasonlítása

Ugyanezt a kísérletsort elvégeztük a *D. hansenii* liofilizált, majd hasonlóképpen regenerált sejtmasszájával is. Azt tapasztaltuk, hogy a hozam értékek is javultak (kivétel az acetofenon, **3**). Szembetűnő javulást jegyezhetünk föl a hozam értékekben fenil- és benzilaceton esetében (**1b**, **2a**), a (4-metoxifenil)aceton (**1e**) és (4-metoxibenzil)aceton (anizilaceton, **2b**) redukciótermékének pedig enantiomer tisztasága javult jelentősen (24. táblázat).

24. táblázat A friss és a liofilizált *D. hansenii* sejtek enzimaktivitásának összehasonlítása

<i>D. hansenii</i>	Friss sejt		Liofilizált sejt	
	Hozam (%)	ee (%)	Hozam (%)	ee (%)
1a	>99	>99 (S)	77	>99 (S)
1b	78	77 (E1)	93	79 (E1)
1c	63	88 (E1)	75	93 (E1)
1d	71	93 (E1)	75	93 (E1)
1e	67	95 (E1)	77	>99 (E1)
1f	58	>99 (S)	64	>99 (S)
1g	58	>99 (E1)	67	>99 (E1)
1h	78	>99 (E1)	88	>99 (E1)
2a	57	59 (E2)	84	79 (E2)
2b	58	80 (E2)	63	95 (E2)
3	63	>99 (S)	58	>99 (S)

A *D. hansenii* esetében általánosan elmondható, hogy a liofilizálás javított a biokatalizátor ADH rendszerének tulajdonságain, míg a *Z. rouxii* enzimaktivitása nem változott jelentősen, az aktivitás enyhe csökkenését figyeltük meg.

4.6 Új tudományos eredmények

1. Új táptalajt dolgoztunk ki a biokatalizátor előállítására, optimalizáltuk az oltóanyag előállításának körülményeit. Egy olyan fermentációs technológiát fejlesztettünk ki, amelyik ipari körülmények között is reprodukálhatóan alkalmas a biokatalizátor gazdaságos előállítására.
2. A kofaktor *in vivo* regenerálásához nélkülözhetetlen koszubsztrát mennyiségét optimaltuk a gyantás közegű bioredukcióhoz. A *D. hansenii* hatékony koszubsztrátjának a 2-propanolt választottuk.
3. Új mintavevő és mintaelőkészítő eszközt fejlesztettünk, amely alkalmas gyantát tartalmazó reakcióelegyből való analitikai célú mintavételre.
4. A *Z. rouxii* ketoreduktáz aktivitását különböző aril- és aralkil-metil ketonok sztereoselektív redukciójával jellemeztük.
5. A *Z. rouxii* ketoreduktáz aktivitását összehasonlítottuk a *D. hansenii* enzimaktivitásával, és legfontosabb eredményként megállapítottuk, hogy az utóbbi szélesebb szubsztráttoleranciával rendelkezik, valamint a vizsgált ketonok nagy részén magas ee érték mellett végezte el a redukciót.
6. A liofilizálás megfelelő módszer a biokatalizátorként használt élesztősejtek tárolási idejének növelésére, valamint szállítható állapotba hozására. A liofilizált sejtek enzimaktivitása jelentősen nem csökkent, néhány esetben pedig magasabb ee értéket kaptunk, mint friss sejtek alkalmazásakor.
7. Az általunk tesztelt élesztőtörzsek és ketonok esetében megdőlt az általános nézet, miszerint a szénlánc hosszúságával nő az ee érték. Esetünkben az acetofenont nagyobb ee érték mellett redukálták a vizsgált élesztők, mint a hosszabb szénláncú benzilacetont.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A törzs fenntartása és az oltóanyag enzimaktivitásának folyamatos ellenőrzése szakképzett, megbízható mikrobiológiai háttérrel igényel. Kísérleti eredményeink bizonyítják, hogy a jó enzimaktivitással rendelkező tenyészet liofilizált készítménye megfelelő oltóanyag az inokulum fermentor oltásához. Így lehetséges az ellenőrzött minőségű oltóanyag készítésének, valamint a sejtermelő fermentációnak időben és térben történő szétválasztása.

A Talampanel előállításának első lépcsőjét az általunk kifejlesztett technológiával ipari léptékben is megoldhatónak gondoljuk. A további léptéknövelésnél problémát okozhat a sejtmassza szeparálása. Az általunk alkalmazott Flottweg dekanterrel 6 óra alatt tudtuk az 1000 liter fermentléből a sejtmasszát kiülepíteni. Mivel szilárd szennyező részecskét nem tartalmaz a fermentlé, ezért egy ipari léptékű tányéros szeparátort javaslok a nagyobb térfogatú fermentlevek ülepítéséhez. Emellett szól, hogy a budafoki élesztőgyárban is tányéros szeparátorral végzik a sejtmassza sűrítését.

További léptéknöveléssel kapcsolatos feladat a gyantát tartalmazó reakcióelegy átmozgatása. Mivel már laboratóriumi körülmények között is megfigyeltük a gyanta mechanikai hatásokra történő porlódását, a reaktorban a lehető leglassabb fordulatszámú keverést választottuk. Elképzelhetőnek tartjuk, hogy további léptéknövelés során már keverőelemmel nem megoldható az elegy átmozgatása, mert a ránehezedő hidrosztatikai erő hatására a gyanta saját magát őrölheti fel. A bioredukció további léptéknövelésénél elképzelhető, hogy más rendszerű bioreaktort kell választani.

A bioredukciót célszerű a lehető legalacsonyabb hőmérsékleten futtatni, ezáltal az idegen mikroorganizmusok felszaporodását lassítani. A nitrogén bevezetése gátolja a káros, aerob baktériumok növekedését, míg a bioredukció anaerob körülmények között is végbemegy.

A *Z. rouxii* és a *D. hansenii* ADH enzimaktivitását összehasonlítva megállapítottuk, hogy a *D. hansenii* egy jó alternatívát jelenthet a *Z. rouxii* kiváltására számos prokirális keton esetében. A *D. hansenii* szélesebb szubsztráttoleranciájú enzimrendszerrel rendelkezik, valamennyi vizsgált ketont elfogadható hozammal redukálta, magas ee értékek mellett.

A liofilizált sejtmassza nemcsak oltóanyagként került felhasználásra. Egy rövid regenerációs idő után kiváló biokatalizátort kaptunk, amelyik hasonló aktivitással, néha jobb enantiomer tisztasággal állította elő a királis alkoholokat. Amennyiben a biokatalizátor előállítása és a Talampanel szintézise időben/térben elkülönül, úgy érdemes megvizsgálni a porlasztva szárított sejtmassza ADH aktivitását is.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A mikrobiológiai átalakításokat alkalmazó szintézisutak száma ugrásszerűen megnőtt az elmúlt 20 esztendőben. Különösen a gyógyszerhatóanyagok és finomvegyszerek előállítása során jelent meg az optikai tisztaság utáni igény. Ezt számos racemát készítmény alkalmazásának szomorú tapasztalatai tették szükségessé. A sztereoizomereket jelenleg már külön molekulaként kezeli a hatóság (FDA). Példaként említem meg a Penicillinamint, melynek *S* abszolút konfigurációjú izomerje gyulladáscsökkentő, míg az *R* abszolút konfigurációjú molekula toxikus hatású. Olyan eset is van, mikor az optikailag tiszta forma előállítása és alkalmazása sem oldja meg a problémát: a thalidomide a vérbe kerülve racemizálódik, így a szervezetben mindenképpen létrejön a teratogén hatású abszolút konfigurációjú molekula is.

A Talampanel az epilepszia hatékony kezelésére fejlesztett hatóanyag, melynek eddig lezárult klinikai vizsgálatai során biztató eredményekről számoltak be. A Talampanel gazdaságos, hétlépéses szintézisének első lépése egy sztereoszelektív bioredukció. A (3,4-metiléndioxifenil)aceton bioredukciója során optikailag tiszta alkoholt kellett előállítanunk. Erre a feladatra a *Zygosaccharomyces rouxii* élesztő volt a legalkalmasabb, mert nemcsak optikailag tiszta formában állította elő a termék alkoholt – amit több más élesztőfaj is megtett -, hanem a legmagasabb koncentrációban (6 g/l) tolerálta a szubsztrátot, illetve a terméket. Továbbá ez a faj GRAS (Generally Recognized as Safe) besorolású, ami a mindennapos, rutinszerű munkát egyszerűvé tette. Az egész-sejtes bioredukció legfontosabb előnye, hogy a dehidrogenázok működéséhez szükséges kofaktor (NADP) regenerálása *in vivo* megtörténik.

A *Zygosaccharomyces rouxii* sejtmassza előállításához szükséges táptalajt kidolgoztuk, majd 1000 literes fermentóban is megfelelő enzimaktivitású sejtmasszát termeltünk. Megállapítottuk, hogy a táptalajok összetétele, a növesztés során az oldott oxigén koncentrációja, valamint a növesztés ideje hatással van a sejt specifikus reduktáz aktivitására. Míg az enantiomer arány nem változott a különböző kísérleti gyártások során, a sejtmassza által katalizált reakciók hozama jelentősen különbözött.

A gyanta bevezetése lehetővé tette a koncentráció 40 g/liter értékre történő emelését, amely érték mellett már gazdaságosan állíthatjuk elő a Talampanel szintézisének kulcsintermedierét. A gyantát is alkalmazó reakcióelegy újabb kihívások elé állított minket, többek között meg kellett oldanunk a kvantitatív analitikai méréshez (VRK) az ellenőrzött mintavételt. Erre a célra egy új mintavevőt dolgoztunk ki, amely alkalmas a gyantát tartalmazó reakcióelegyből történő mintavételre, a termék, illetve a szubsztrát leoldására, valamint a gyanta mennyiségének meghatározására is. A CAMAG

denzitometriás VRK rendszerrel rutinszerűen tudtuk kiértékelni a mintákat, de az enantiomerek elválasztására HPLC módszert kellett alkalmaznunk.

Megállapítottuk, hogy a *Zygosaccharomyces rouxii* által katalizált bioredukció hozamára a hőmérséklet 25-36°C között nincs hatással. Továbbá a levegőztetéstől is bizonyos mértékig független a rendszer. Amennyiben a szénsav feldúsul a vizes fázisban, és azt a kevertetéssel, illetve levegő/nitrogén átáramoltatással nem hajtjuk ki, úgy a pH esése gátolja az enzimszisztéma működését. Amikor a léptéknövelt bioredukciót 32°C-on és levegőátáramoltatással végeztük, a bioredukció aerob bakteriális kontamináció miatt megakadt. Ennek esélyét nitrogén átáramoltatással, és alacsonyabb hőmérséklet választásával lecsökkenthetjük.

A Talampanel utódmolekuláinak szintézise, valamint a *Zygosaccharomyces rouxii* ADH enzimaktivitásának jellemzése miatt további 1-ariletanonok redukcióját végeztük el. Az alkalmazott élesztő és egy hasonló bioredukcióban alkalmazott élesztő ADH szubsztrátspecifitását hasonlítottuk össze. A *Debaryomyces hansenii* ADH enzimszisztéma meglepő módon az általánosan alkalmazott glükóz, illetve szaharóz helyett 2-propanol jelenlétében adta a legmagasabb hozamú átalakításokat. A *Debaryomyces hansenii* a 11 vizsgált ketont 57-99% hozam értékekkel redukálta. A 2. szénatomon szubsztituált fenilacetone származékokat is megfelelő hozammal és magas enantiomer tisztasággal állította elő. A *Debaryomyces hansenii* alacsonyabb hozammal redukálta a 4-metoxi, magasabbal a 3,4-dimetoxi származékot, magas ee értéket produkálva. Akárcsak a *Zygosaccharomyces rouxii*, a *Debaryomyces hansenii* is gyenge enantiomer tisztasággal redukálta a benzilacetont. A 4-metoxi származék viszont szintén jelentősen javította az optikai tisztaságot, de a konverzió itt is gyenge maradt. Ugyanezt a „térbeli beállítás segítést” tapasztaltuk a fenilacetone és a (4-metoxifenil)acetone esetében is. A halogénezett származékot jó hozammal és tökéletes optikai tisztasággal redukálta mindkét törzs. Nagy különbséget az acetofenone redukciója során tapasztaltunk, a *Debaryomyces hansenii* tökéletes optikai tisztaság mellett kétszer magasabb hozammal állította elő az alkoholt.

A biokatalizátor tárolhatósága, valamint szállíthatósága nem megoldott a friss sejtmassza alkalmazása mellett. Ezért egy egyszerű módszert kellett kidolgoznunk, melynek segítségével a sejttermelés és a bioredukció időben és/vagy térben egymástól elválaszthatóak legyenek. A fagyasztva szárított mikroorganizmusokkal rövid regenerációs szakasz után jó eredményeket értünk el. Sem a bioredukció hozama, sem az ee értékek nem különböztek jelentősen a friss sejtmasszával elvégzett reakciók eredményeitől. A liofilizálás tehát egy megfelelő módszer a sejtmassza hosszabb tárolhatóságára, de az karbonil redukáz enzimek jelentősen egyik élesztőben sem változtak meg a fagyasztva szárítás hatására.

7. ABSTRACT

The number of the synthetic pathways applying microbial transformation increased rapidly in the past 20 years. A high demand on the optical purity appeared in the field of fine chemicals and drugs production. A few tragic stories have drawn the attention to the racem mixtures. Nowadays the stereoisomers are regarded as two different molecules by FDA. Generally mentioned examples are the penicillinamine and the thalidomide. The *S* isomer of penicillinamine has an anti-inflammatory effect, and the *R* isomer is toxic. More dangerous agent is the thalidomide: the optical clear isomer is racemized in the blood and affects its teratogen effect.

Talampanel is a new drug candidate developed for the efficient treatment of epilepsy. Nowadays finished the second clinical trial and the results were hopefully. The rational production of Talampanel is a synthesis containing seven steps. The first step is a stereospecific bioreduction of 3,4-methylenedioxy-phenylacetone to its *S*-alcohol product. The most suitable biocatalysator is the yeast *Zygosaccharomyces rouxii*, which produces the alcohol not only in optical clear form, but it tolerated the ketone/alcohol in the highest concentration (6 g/l) among the strains investigated. This species is classified as GRAS (Generally Recognized As Safe), so the everyday work with this yeast is easy, and it does not require any special equipment. The most important advantage of the whole-cell bioreduction system is the *in vivo* cofactor (NADP) regeneration.

A new, cost-effective production medium was developed and cell paste with appropriate enzyme activity was produced in 1000-l fermentor. It was established, that the enzyme activity is highly dependent on the composition of production medium, on the required dissolved oxygen concentration in the fermentation broth and on the harvesting time of the cells. While the enantiomeric excess was independent on the circumstances of the production, the yields of the bioconversions highly differed.

The resin-added bioconversion mixture provided new challenges for us. While the total concentration could be increased to 40 g/litre, we should develop an analytical method for the quantitative tracking of the bioconversion. A novel sampling device was created, which is suitable to separate the resin from the fermentation mixture and for elution of the reduced product and the unchanged starting material from the resin. For tracking the rate of bioconversion a thin layer chromatography method was applied, but the determination of the enantiomeric excess was made by HPLC method.

The yield of the whole-cell bioreduction with *Z. rouxii* cells is independent on the temperature between 25-36°C and on the aeration to some extent. If the concentration of carbon dioxide increased in the bioconversion mixture, the pH value can drop and stop the bioreduction. That is why we should blow out the carbon dioxide from the mixture with air/gas flow and agitation. When

the bioreduction run in 32°C and air flows through the reaction mixture, the chance of a bacterial contamination is high. Bacterial infection could stop the reduction of the ketone or by-product may produce. Choose of nitrogen flow and lower temperature eliminated these contretemps.

The synthesis of the followers of Talampanel and the characterization of *Z. rouxii* alcohol dehydrogenase enzyme system additional aryl methyl ketones were transformed. The substrate specificity of the applied yeast was compared to a species used such bioreductions by American researchers. Amazing results were received during the investigation of the quality of the co-substrate. The generally used glucose and sacharose was not efficient, but 2-propanol was a suitable co-substrate of *D. hansenii*. Eleven methyl ketones were reduced by *D. hansenii* with conversion values between 57-99%. The 2-substituted phenylacetones were also successfully reduced with high ee values. The 4-methoxy derivative was transformed with lower conversion, the 3,4-dimethoxy-phenylacetone was converted with high conversion rate and ee value. Both *Z. rouxii* and *D. hansenii* reduced the benzylacetone with pure enantiomer excess, the 4-methoxy derivative improved the ee values, but the yield stayed poor. The same „spatial support” was observed when phenylacetone and its 4-methoxy derivative were converted to alcohol. Halogenized aromatic ketone was also reduced resulted high conversion and ee with both species. The highest difference between the two species was observed when acetophenone was reduced. *D. hansenii* produced optically clear alcohol with efficient conversion.

The storage and the carriage of the cell paste is not solved, so that the production of the cell paste and the bioreduction is bound in time and place. Efficient results were obtained when lyophilised yeasts were applied as biocatalyst after a short regeneration period. Nor the conversion rates not the ee values did not changed compared to the enzyme activities of resting cells. The lyophilisation might be an efficient method to elongate the enzyme activity of yeast cells, but significant improvement in the reduction activity was not observed.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Abraham D. J. (2003): Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery 6th Edition, Volume 1: Drug Discovery, Chapter 18, Chirality and Biological Activity 781-826.
2. Ahern T.J., Klibanov A.M. (1985): The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100°C. *Science*, 228 1280-1284.
3. Ahmad K., Koul S., Taneja S. C., Singh A. P., Kapoor M., Riyaz-ul-Hassan, Verma V., Qazi G. N. (2004): Enzyme directed diastereoselectivity in chemical reductions: studies towards the preparation of all four isomers of 1-phenyl-1,3-butanediol. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15 1685-1692.
4. Aida K., Chibata I., Nakayama K., Takinami K., Yamada H. (szerk.), *Biotechnology of Amino Acid Production*, Elsevier, Amsterdam (1986).
5. Ambrus G. (2001): Microbiological research for the Hungarian pharmaceutical industry. *Pharmazie*, 56 S34-S41.
6. Anderson B., Hansen M., Harkness A., Henry C., Vicenzi J., Zmijewski M. (1995): Application of a Practical Biocatalytic Reduction to an Enantioselective Synthesis of the 5H-2,3-Benzodiazepine LY300164. *Journal of the American Chemical Society*, 117 12358-12359.
7. Andrásfi F. (1991): Talampanel. *Drug of the Future*, 26 754-756.
8. Andrade L. H., Keppler A. F., Schoenlein-Crusius I. H., Porto A. L. M., Comasseto J. V. (2004): Evaluation of acetophenone monooxygenase and alcohol dehydrogenase activities in different fungal strains by biotransformation of acetophenone derivatives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 31 129-135.
9. Bérdy J., Kádár-Pauncz J., Méhesfalvi-Vajna Zs., Horváth Gy., Gyimesi J., Koczka I. (1977): Metabolites of gentamicin-producing *Micromonospora* species. I. Isolation and identification of metabolites. *Journal of Antibiotics*, 30 945-954.
10. Bintsis T., Vafopoulou-Mastrojiannaki A., Litopoulou-Tzanetaki E., Robinson R. (2003): Protease, peptidase and esterase activities by lactobacilli and yeast isolates from Feta cheese brine. *Journal of Applied Microbiology*, 95 68-77.
11. Bódai V., Orovecz O., Szakács G., Novák L., Poppe L. (2003): Kinetic resolution of trans 2-acetoxycycloalkan-1-ols by lipase-catalysed enantiomerically selective acylation. *Tetrahedron: Asymmetry*, 14 (17) 2605-2612.
12. Bojarski J., Aboul-Enein H., Ghanem A. (2005): What's new in chromatographic enantioseparations. *Current Analytical Chemistry*, 1 59-77.

13. Bornscheuer U. (2000): Industrial Biotransformations, in Rehm H. et al (eds.) Biotechnology Series Vol. 8b, Wiley-VCH, Weinheim, 277-294.
14. Breslow R., Artificial Enzymes and Enzyme Models Vol58, Wiley (1986) 1-60.
15. Bruni V., Curto R., Patone R., Russo D. (1983): Yeasts in the straits of Messina. *Italian Biology of Marine and Ocean*, 8 65-78.
16. Burgess K., van der Donk W. A., Jarstfer M.B., Ohlmeyer M. J. (1991): Enantioselective esterification of unsaturated alcohols mediated by a lipase from a *Pseudomonas sp.* *Journal of American Chemical Society*, 113 6129-6139.
17. Cerniglia C., Crow S. (1981): Metabolism of aromatic hydrocarbons by yeasts. *Archives of Microbiology*, 129 9-13.
18. Chartrain M., Lynch J., Choi W., Churchill H., Patel S., Yamazaki S., Volante R., Greasham R. (2000): Asymmetric bioreduction of a bisaryl ketone to its corresponding (S)-bisaryl alcohol, by the yeast *Rhodotorula pilimanae* ATCC 32762. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 8 285-288.
19. Cheetham P. (2000): Case studies in the application of biocatalysts for the production of (bio)chemicals. In Applied Biocatalysis, edn 2. Edited by Straathof A., Adlercreutz P., Amsterdam: Harwood Scientific Publishers; 93-152.
20. Chen C., Tseng C. W. (1997): Effect of high hydrostatic pressure on the temperature dependence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces rouxii*. *Process Biochemistry*, 32 (4) 337-343.
21. Cheng C., Ma J-H. (1996): Enantioselective synthesis of S-(-)-1-phenylethanol in *Candida utilis* semi-fed-batch cultures. *Process Biochemistry*, 31 (2) 119-124.
22. Clark, D.S. (1994): Can immobilization be exploited to modify enzyme activity? *Trends in Biotechnology*, 12 439-443.
23. Cooke R., Kuntz I. D. (1974): The properties of water in biological systems. *Annual Review in Biophysics and Bioengineering*, 3 95-126.
24. Costello C. A., Payson R. A., Menke M. A., Larson J. L., Brown K. A., Tanner J. E., Kaiser R. E., Herschbereger C. L., Zmijewski M. J. (2000): Purification, characterization, cDNA cloning and expression of a novel ketoreductase from *Zygosaccharomyces rouxii*. *European Journal of Biochemistry*, 267 5493-5501.
25. De Camp W.H. (1989): The FDA perspective on the development of stereoisomers. *Chirality*, 1 2-6.
26. Deák T. (1999): Élesztőgombák, Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó 119-122.
27. Dewar M.J.S. (1986): New ideas about enzyme reactions. *Enzyme*, 36 8-20.

28. Donzelli F., Fuganti C., Mendoza M., Pedrocchi-Fantoni G., Servi S., Zucchi G. (1996): On the stereochemistry of the Baeyer-Villiger Degradation of Arylalkyl-ketones Structurally Related to Raspberry Ketone by *Beauveria bassiana*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 7 (11) 3129-3134.
29. Douzou P. (1977): *Cryobiochemistry*; Academic Press, London
30. Easwar S, Argade N. P. (2003): Amano PS-catalysed enantioselective acylation of (\pm)- α -methyl-1,3-benzodioxole-5-ethanol: an efficient resolution of chiral intermediates of the remarkable antiepileptic drug candidate, (-)-Talampanel. *Tetrahedron: Asymmetry*, 14 333-337.
31. Eliel E. L., Wilen S. H., Doyle M. P. (2001): *Basic Organic Stereochemistry*, Wiley: New York
32. Ema T., Yoshii M., Korenaga T, Sakai T. (2002): Mechanism-based enzymatic method for reliable determination of absolute configuration of chiral 1-substituted ethanols: combination with NMR method. *Tetrahedron: Asymmetry*, 13 (11) 1223-1229.
33. Ensley D.B., Ratzkin J.B., Osslund D.T., Simon J. M. (1983): Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science*, 222 167-169.
34. Erdélyi B., Birincsik L., Szabó A. (2003): TLC method for quantitation of methylenedioxyphenylacetone and its derivative formed in a resin-added bioreduction process. *Journal of Planar Chromatography*, 16 246-248.
35. Erdélyi B., Szabó A., Birincsik L., Seres G., Salát J., Ivanics J., Kónya A. (2004): TLC/HPTLC methods for monitoring microbial transformation processes. *Journal of Planar Chromatography*, 17 132-136.
36. Erdélyi B., Szabó A., Birincsik L., Hoschke Á. (2004): Process development of methylenedioxyphenyl-acetone chiral bioreduction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 29 195-199.
37. Faber K. (2004): *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin 3-8.
38. Ferraboschi P., Grisenti P., Manzocchi A., Santaniello E. (1990): Baker's Yeast-mediated Preparation of Optically Active Aryl Alcohols and Diols. *Journal of Chemical Society Perkin Transaction 1*, 9 2469-2474.
39. Ferreira A., Viljoen B. (2003): Yeast as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 86 131-140.
40. Fischer E. (1894): Einfluss der Configuration auf die Wirkung den Enzyme. *Berichte der Deutsche Chemie Gesichte*, 27 2985-2993.
41. Fleet G. (1990): Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, 68 199-211.

42. Flickinger M. (1999): Encyclopedia of Bioprocess Technology, Wiley: New York, 423.
43. Fuhshuku K., Funa N., Akeboshi T., Ohta H., Hosomi H., Ohba S., Sugai T. (2000): Access to Wieland-Miescher in an enantiomerically pure form by a kinetic resolution with yeast-mediated reduction. *Journal of Organic Chemistry*, 65 129-135.
44. Fuhshuku K., Tomita M., Sugai T. (2003): Enantiomerically pure octahydronaphthalenone and octahydroindenone: elaboration of the substrate overcome the specificity of yeast-mediated reduction. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 345 766-774.
45. Gadd G., Edwards S. (1986): Heavy-metal-induced flavin production by *Debaryomyces hansenii* and possible connections with iron metabolism. *Journal of British Mycological Society*, 87 533-542.
46. Gross M. (1989): Significance of Drug Stereochemistry in Modern Pharmaceutical Research and Development. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 25 (34) 323-331.
47. Gutfreund H. (Ed.) Enzymes: One Hundred Years, FEBS Lett., 62 Suppl., 1976.
48. Gutierrez A., Caramelo L., Prieto A., Martinez M. J. (1994): Anisylaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus *Pleurotus*. *Journal of American Society for Microbiology*, 60 1783-1788.
49. Gutte B., Merrifield R. B. (1969): The total synthesis of an enzyme with ribonuclease A activity. *Journal of American Chemical Society*, 91 501-502.
50. Hallinan K. O., Crout D. H. G., Hunt J. R., Carter A. S., Dalton H., Murrell J. C., Holt R. A., Crosby J. (1995): Yeast catalysed reduction of β -keto esters (2): optimisation of the stereospecific reduction by *Zygosaccharomyces rouxii*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 12 179-191.
51. Hara A., Nakayama T., Deyashiki Y., Kariya K., Sawada H. (1986): Carbonyl reductase of dog liver: purification, properties, and kinetic mechanism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 244 238-247.
52. Hecquet L., Sancelme M., Bolte J., Demuyne C. (1996): Biosynthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3-(2H)furanone by *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Agriculture and Food-Chemistry*, 44 1357-1360.
53. Homann M. J. (2004): Rapid identification of enantioselective ketone reductions using targeted microbial libraries. *Tetrahedron*, 60 789-797.
54. <http://www.japanese-food-for-health.com/miso.html> kulcsszavak: miso, rouxii, japan, food.
55. Itoh N., Matsuda M., Mabuchi M., Dairi T., Wang J. (2002): Chiral alcohol production by NADH-dependent phenylacetaldehyde reductase coupled with *in situ* regeneration of NADH. *European Journal of Biochemistry*, 269 2394-2402.

56. Jansen M., Veurink J. H., Euverink G.-J. W., Dijkhuizen L. (2003): Growth of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in microtiter plates: effects of NaCl, pH and temperature on growth and fusel alcohol production from branched-chain amino acids. *FEMS Yeast Research*, 3 (3) 313-318.
57. Jornvall H., Persson B., Krook M., Atrian S., Gonzalez-Duarte R., Jeffery J., Ghosh D. (1995): Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, 34 6003-6013.
58. Kashyap P., Sabu A., Pandey A., Szakács G., Soccol C. R. (2002): Extra-cellular L-glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 38 (3) 307-312.
59. Kataoka M., Kita K., Wada M., Yasohara Y., Hasegawa J., Shimizu S. (2003): Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62 437-445.
60. Kenessey A., Gráf L., Páldi-Haris P., Láng T. (1987): Interaction of 2,3-benzodiazepines with peripheral benzodiazepine receptors. *Pharmacology Resource Communication*, 19 1-14.
61. Klivanov A. M. (1986): Enzymes that work in organic solvents. *CHEMTECH*, 16 354-359.
62. Kluver A. J., de Leeuw F. J. (1924): *Acetobacter suboxydans*, een merkwaardige azijnbacterie. *Tijdschreef Vergeedige Geneeskunde*, 10 170-175.
63. Kometani T., Yoshii H., Kitatsuji E., Nishimura H., Matsuno R. (1993): Large-Scale Preparation of (S)-Ethyl 3-Hydroxybutanoate with a High Enantiomeric Excess through Baker's Yeast-Mediated Bioreduction, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76 33-37.
64. Konitsiotis S., Blanchet P. J., Verhagen L., Lamers E., Chase T. N. (2000): AMPA receptor blockade improves levodopa-induced dyskinesia in MPTP monkeys. *Neurology*, 54 1589-1595.
65. Koshland D.E., Neet K.E. (1968): The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Annual Review in Biochemistry*, 37 359-410.
66. Kühne W (1876): Über das Verhalten verschiedener organisierter und sogenannter ungeformter Fermente. Über das Trypsin (Enzym des Pankreas). *Verhandlungen des Heifelberger Naturhistorischen und Medizinischen Vereins*, N.S.I3.
67. Krozowski Z. (1994): The short-chain alcohol dehydrogenase superfamily: variations on a common theme. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 51 125-130.

68. Laidler K. J. (1997): A brief history of Enzyme kinetics 127-133. In: Cornish-Bowden A. (ed.): *New Beer in an Old Bottle: Eduard Buchner and the Growth of Biochemical Knowledge*. Valencia: University of Valencia.
69. Larone H., Murray M., Zinchuk R. (2003): BBL CHROMagar Candida as the sole primary Medium for the isolation of yeasts and as a source medium for the rapid assimilation of trehalose (RAT) test. *103rd General Meeting of the American Society for Microbiology, Washington, DC*.
70. Larsson C., Morales C., Gustafsson L., Adler L. (1990): Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Dabaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *Journal of Bacteriology*, 172 1769-1774.
71. Liese A, Filho V. M. (1999): Production of fine chemicals using biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 10 595-603.
72. Liese, A; Seelbach, K; Wandrey, C. *Industrial Biotransformations*; Wiley-VCH: Weinheim - New York, 2000.
73. Lye G. J., Woodley J. M. (1999): Application of *in situ* product-removal techniques to biocatalytic processes. *Trends in Biotechnology*, 17 395-402.
74. Mandal D., Ahmad A., Khan M. I., Kumar R. (2004): Enantioselective bioreduction of acetophenone and its analogous by the fungus *Tricothecium* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 27 61-63.
75. Michaelis L., Menten M. L. (1913): Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49 333-369.
76. Milton R. C., Milton S. C. F., Kent S. B. H. (1992): Total chemical synthesis of a D-enzyme: the enantiomers of HIV-1 protease show reciprocal chiral substrate specificity. *Science*, 256 1445-1448.
77. Molinaria F., Gandolfia R., Villaa R., Occhiato E. G. (1999): Lyophilised yeasts: easy-to-handle biocatalysts for stereoselective reduction of ketones. *Tetrahedron: Asymmetry*, 10 3515-3520.
78. Mork A., Kreilgaard M., Sánchez C. (2003): The R-enantiomer of citalopram counteracts escitalopram-induced increase in extracellular 5-HT in the frontal cortex of freely moving rats, *Neuropharmacology*, 45 167-173.
79. Nakamura K., Kitano K., Matsuda T., Ohno A. (1996): Asymmetric reduction of ketones by the acetone powder of *Geotrichum candidum*. *Tetrahedron Letters*, 37 1629-1632.

80. Nakamura K., Yamanaka R., Matsuda T., Harada T. (2003): Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry*, 14 2659-2681.
81. Ni Y., Xu J. (2002): Asymmetric reduction of aryl ketones with a new isolates of *Rhodotorula* sp. AS.2241. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 18 (4-6) 233-241.
82. Ogston A. G. (1948): Interpretation of experiments on metabolic processes, using isotopic tracer elements. *Nature*, 162 963.
83. Panke S., Held M., Wubbolts M. (2004): Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, 15 1-8.
84. Park K., Sim W-J., Park J. (1997): Asymmetric Induction by β -Cyclodextrins in NaBH₄ Reduction of Ketones. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 27 41-48.
85. Patel R. N. (2004): Enantioselective microbial reduction of substituted acetophenones. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15 (8) 1247-1258.
86. Patel. R. N. (2000): Stereoselective biocatalysis, Marcel Dekker, New York.
87. Peng Y., Yashpee J., Demain A. L. (1997): Biotransformation of Compactin to Pravastatin by *Actinomadura* sp. 2966. *The Journal of Antibiotics*, 50 (12) 1032-1035.
88. Perham R. N. (1976): The protein chemistry of enzymes, in: Enzymes: One Hundred Years, Gutfreund H. (eds.) *FEBS Letters*, 62 E20-E28.
89. Peters J. (1998): Biotechnology 2nd edn. Vol. 8a, Rehm H., Reed S. (eds.), Wiley-VCH, Weinheim, 391-474.
90. Peterson D., Murray H. (1952): Microbiological oxygenation of steroids. I. Introduction of oxygen at carbon-11 of progesterone. *Journal of American Chemical Society*, 74 5933-5936.
91. Petsko, G. (1992): On the other hand... *Science*, 256 1403-1404.
92. Pike V. W., „Synthetic Enzymes” in Biotechnology, Vol 7a: Enzyme Technology, VCH, Weinheim (1987) 465-487.
93. Poppe L., Novák L. (1992): Selective Biocatalysis, Wiley-VCH, Weinheim.
94. Poppe L. (2002): Ipari biokatalízis. *Magyar nyelvű szakelőadások a 2001-2002-es tanévben*. Erdélyi Magyar Műszaki Tudományos Társaság, 3-18.
95. Rasor J. P., Voss E. (2001): Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. *Applied Catalysis A: General*, 221 145-148.

96. Reichstein T., Grüssner H. (1934): Eine ergiebige Synthese der L-Ascorbinsäure (Vitamin C). *Helvetica Chimia Acta*, 17 311-328.
97. Rétey J., Robinson J. A. (1982): Stereospecificity in Organic Chemistry and Enzymology (Monographs in Modern chemistry, Vol. 13), VCH, Weinheim.
98. Rhodes V. (2002): Chiral pharmaceuticals. *Chemistry Today*, 10 37-39.
99. Rosi I., Vinella M., Domizio P. (1994): Characterization of beta-glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *Journal of Applied Bacteriology*, 17 19-27.
100. Schmid A., Dordick J. S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Witholt B. (2001): Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409 258-268.
101. Sheldon R. A. (1993): Chirotechnology. Marcel Dekker: New York 105.
102. Solntseva L., Vinogradova G., Nagornaya S., Kvasnikov E. (1987): Yeast flora of fish from the upper and middle Volga reservoirs. *USSR Microbiology*, 49 31-41.
103. Straathof A., Panke S., Schmid A. (2002): The production of fine chemicals by biotransformation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13 548-556.
104. Strauss, U. T., Felfer U., Faber, K. (1999): Biocatalytic transformation of racemates into chiral building blocks in 100% chemical yield and 100% enantiomeric excess, *Tetrahedron: Asymmetry*, 10 107-117.
105. Taylor, J. H. (Ed.) Selected Papers on Molecular Genetics, Academic Press: New York, 1965.
106. Tokuoka K., Ishitani T., Goto S., Komagata K. (1985): Identification of yeasts isolated from high-sugar foods. *Journal of Applied Microbiology*, 31 411-428.
107. Tornai-Lehoczki J., Péter G., Dlačny D. (2003): CHROMagar Candida medium as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of yeast species isolated from salads. *International Journal of Food Microbiology*, 86 189-200.
108. Török T., King A. D. (1991): Comparative study on the identification of food-borne yeasts. *Applied Environmental Microbiology*, 57 1207-1212.
109. Trevan, M. D. (1980): Immobilized Enzymes. An Introduction and Applications in Biotechnology, Wiley: New York.
110. Vicenzi J., Zmijewski M., Reinhard M., Landen B., Muth W., Marler P. (1997): Large-scale stereoselective enzymatic ketone reduction with *in situ* product removal via polymeric adsorbent resins. *Enzyme and Microbial Technology*, 20 494-499.
111. Warshel A., Aqvist J., Creighton S. (1989): Enzymes work by solvation substitution rather than by desolvation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 86 5820-5824.

112. Watson J. D., Crick F. H. C. (1953): Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171 737-738.
113. Williams K. M., Day R. O. (1989): Clinical applications of enantiomeric drugs. *Australian Prescriber*, 12 (1) 22-25.
114. Wix Gy., Albrecht K. (1959): A new method for the microbiological oxidation of steroids. *Nature*, 183 (4670) 1279-80.
115. Wix Gy., Albrecht K. (1961): Microbiological production of delta 1,4-androstadienedione from steroids of different structure. The interaction of steroids. *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 8 339-356.
116. Zaks A. (2001): Industrial Biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5 130-136.
117. Zappalá M., Grasso S., Micale N., Polimeni S., De Micheli C. (2001): Synthesis and structure-activity relationship of 2,3-benzodiazepines as AMPA receptor antagonists. *Mini Reviews Medicinal Chemistry*, 1 243-253.
118. Zemplén, G. (1914): Az enzimek és gyakorlati alkalmazásuk. Magyar Kémiai Társaság: Budapest.
119. Zmijewski M., Vicenzi J., Landen B., Muth W., Marler P., Anderson B. (1997): Enantioselective reduction of 3,4-methylene-dioxyphenylacetone using *Candida famata* and *Zygosaccharomyces rouxii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47 162-166.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni *Dr. Maráz Annának*, hogy megszeretette velem a mikrobiológiát és bevezetett a mikroorganizmusok világába,

Albrecht Károlynak a fermentációs műveletek alapos megismerését és a fokozatszerzés szükségességének egyértelműsítését.

Dr. Ambrus Gábornak és *Dr. Simay Antalnak* akik feletteseimként feltétlenül támogatták fokozatszerzési törekvéseimet.

A *Fermentációs Kísérleti Üzem* dolgozóinak odaadó munkájukat,

Dr. Ivanics Józsefnek és *munkatársainak* pedig a léptéknövelt bioredukcióhoz szükséges adatokat.

Dr. Seres Gábornak enantiomerek arányainak meghatározásáért (HPLC) tartozom hálával.

Dr. Hoschke Ágoston témavezetőm folyamatosan mellettem állt, minden találkozásunk után lendületet kaptam feladataim elvégzéséhez.

Dr. Szabó Antalnak hálával tartozom az analitikai feladatok megoldásáért és sikeres publikálásáért.

Köszönöm *feleségemnek* folyamatos támogatását, ötleteit és szakmai megjegyzéseit.

I. Melléklet

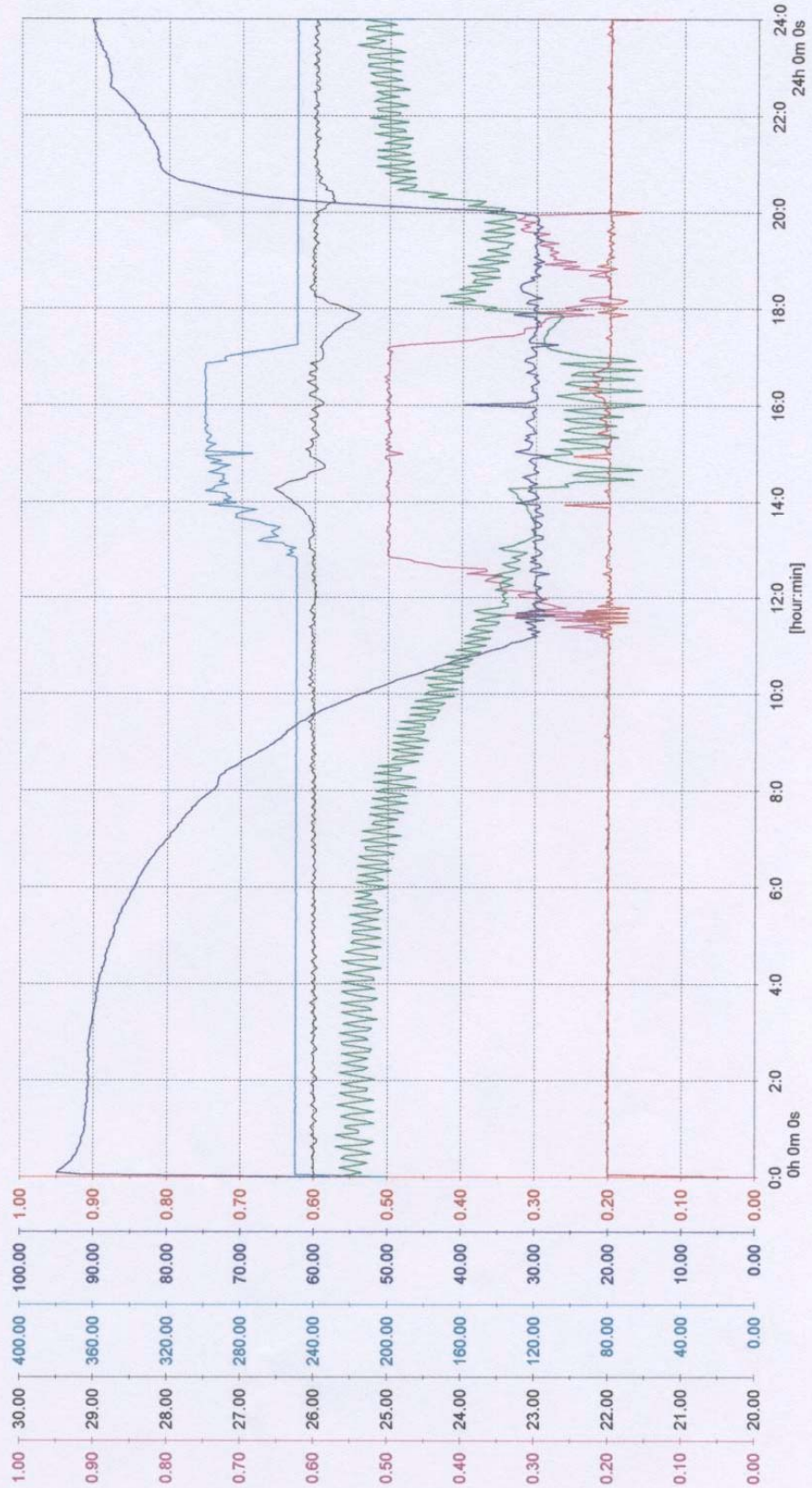
A *Zygosaccharomyces rouxii* sejtmassza előállítás oldott oxigén szabályozásának bemutatása egy kiválasztott sarzs eredeti trendgörbéjén keresztül (validált rendszer)

C:\Balazs\ZR-1641.dwg

ZR-1641

3/2/05, 10:39:21

FC_0441/PID1/PV.CV TC_0401/A11/PV.CV TC_0401/A12/PV.CV KS_0431/AO1/PV.CV QC_0452/PID1/PV.CV PC_0411/PID1/PV.CV
Sm²/m °C RPM % bar
ZR-1641 ZR-1641 ZR-1641 ZR-1641 ZR-1641 ZR-1641



II. Melléklet

TLC Method for Quantitation of Methylenedioxyphenylacetone and its Derivative Formed in a Resin-Added Bioreduction Process

Journal of Planar Chromatography, **16** (2003) 246-248.

Impact factor (2003): 1,047

TLC Method for Quantitation of Methylenedioxyphenylacetone and its Derivative Formed in a Resin-Added Bioreduction Process

Balázs Erdélyi*, László Birincsik, and Antal Szabó

Key Words:

Keto-bioreduction
Sampling of resin-added bioreaction
Reaction control
In-process TLC scanning

1 Introduction

A novel class of orally active 2,3-benzodiazepines has recently been discovered and patented by Hungarian researchers [1]. Biological activity studies led to the discovery of (8*R*)-7-acetyl-

5-(4-aminophenyl)-8,9-dihydro-8-methyl-7*H*-1,3-dioxolo[4,5-*h*]-[2,3]benzodiazepine (Talampanel; structure 1 in **Figure 1**) a new drug, under investigation, with antiepileptic, neuroprotectant and skeletal muscle relaxant effects, as described in a review by *F. András* [2].

The first stage of the synthesis of talampanel is the enantioselective keto-reduction of 3,4-methylenedioxyphenyl acetone (MDPA) to (*S*)-*d*-methyl-1,3-benzodioxole-5-ethanol (MBDE),

B. Erdélyi, L. Birincsik, and A. Szabó, Fermentation Pilot Plant, IVAX Drug Research Institute Ltd, P.O. Box 82, Budapest, Hungary.

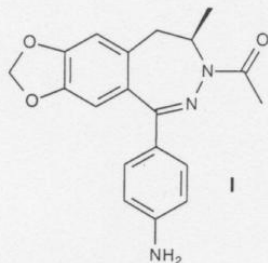


Figure 1
The structure of talampel (I).

as shown in **Figure 2** (structures II and III, respectively). The improved bioreduction process was performed with *Zygosaccharomyces rouxii* yeast cells [3–7], and yield was increased by using Amberlite XAD-7 resin. Because the resin bound most of the MDPA and MBDE, their concentrations could be kept below the toxic level (6 g L^{-1}) in the water phase where the in-vivo reduction was conducted [8].

This paper describes a quantitative TLC method developed to support yield-optimization in the bioreduction experiments running in our laboratories [9].

2 Experimental

2.1 Sampling

The resin content was first separated from the bioreaction mixture. In test-tube experiments, resin separation was performed using the whole content of each tube. In experiments with large-scale bioreactor technology, homogeneous aliquots were sampled at different intervals with the sampling device presented here for the first time (**Figure 3**). The sampler is easily assembled from its component parts. After sampling approximately 10 mL from the fermentation mixture with the syringe the resin content (0.6–0.8 mL) was collected on the screen. Its wet volume (**Figure 3**, b-1) can be estimated by inspection of the calibrated tube (0–1.0 mL). On this basis the volume of acetone needed for elution can be calculated (1.0 mL per milligram MDPA and/or MBDE expected). After elution, which is followed by air suction, the volume of the resin is reduced (**Figure 3**, b-2). The quantity of MDPA and MBDE in the fermentation tank can be calculated by considering the dried resin volume, the results from TLC analysis of the eluate, and the volume of

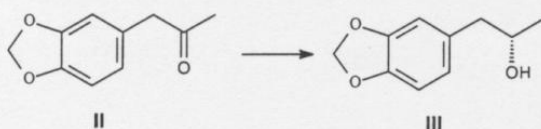


Figure 2
Reduction of MDPA (II) to MBDE (III).

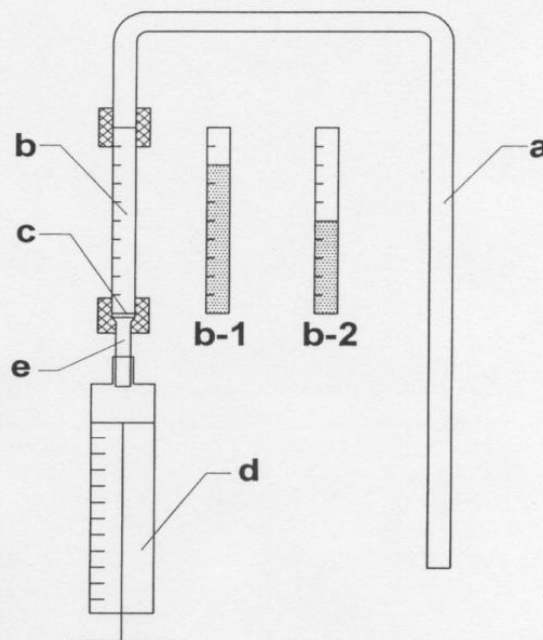


Figure 3
Sampling device developed for resin-added bioconversions. A glass suction pipe (a) graduated at the shorter side (b) and tightly attached to a 100-mesh (ca $150 \mu\text{m}$) screen of stainless steel (c) is fitted with a 10 mL syringe (d) via a small piece of polypropylene tubing (e).

the resin used in the fermentation tank. The ratio of dried resin volume [mL] to weight [g] was 2.52.

2.2 Densitometric Determination

TLC was performed on 10 cm \times 20 cm precoated silica gel 60 F_{254} plates (Merck, #5729) with hexane–ethyl acetate, 7:3 (v/v), as mobile phase. Before use the plates were prewashed by development with the same mobile phase, then dried in a vacuum chamber. Samples of methylenedioxyphenylacetone solution ($2 \times 4 \mu\text{L}$, separately) and an alcoholic solution of reference MDPA ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$; five spots – 1, 2, 4, 8, 16 μL) were applied as 3-mm bands by means of the Camag (Switzerland) Linomat IV sample applicator. Plates were then developed in a Camag twin trough chamber. Quantitation was performed by scanning densitometry at $\lambda = 278 \text{ nm}$, by means of a computer-controlled Camag TLC Scanner II. Substrate and product quantities were calculated by determining the respective sample peak-area-to-standard peak area ratios in the linear region of a calibration plot between two reference points.

3 Results and Discussion

This simple and rapid densitometric TLC method provided quantitative information about the large number of samples generated

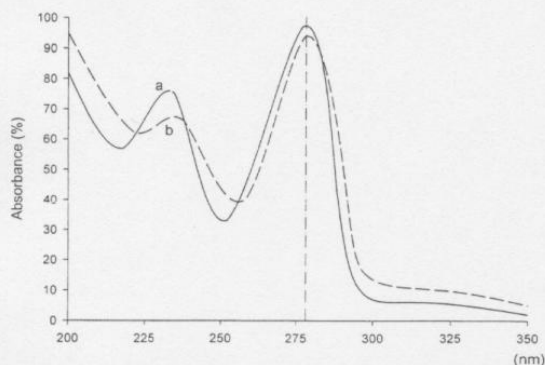


Figure 4
Absorption spectra of MDPA (a) and MBDE (b).

during the keto-reduction biofermentation process. In the first stage of the analysis the resin content was isolated from the bioreaction mixture by filtration. In earlier experiments it had been found that high percentages of the substrate and product were adsorbed by the resin, and that they were readily eluted with a variety of organic solvents, for example acetone. A special sampling device was used to separate the resin from the fermentation mixture and for elution of the reduced product (MBDE) and the unchanged starting material (MDPA) from the resin.

From comparison of the reflectance spectra of MDPA and MBDE (Figure 4) it is apparent that the positions of λ_{\max} (278 nm) and the specific reflectance values at these maxima are almost the same for both compounds. As a result, one reference compound (e.g. MDPA) can be used for calibration.

Research was performed to find an efficient mobile phase. The best results were obtained with *n*-hexane-ethyl acetate, 7 + 3 (v/v). By use of this mixture MDPA and MBDE were well separated both from each other (R_{MDPA} 0.69, R_{MBDE} 0.52) and also from potential interfering components in the fermentation medium. Prewashing the plate with the mobile phase, as specified in Section 2, was effective in substantially reducing the effect of the background on the evaluation. Figure 5 shows a scan obtained from a fermentation mixture at a time approximately half way through the fermentation process. The process of bioreduction is shown in Figure 6, in which conversion values are plotted as a function of time.

In summary, a TLC method with densitometric scanning has been developed for quantitative monitoring of a bioreduction fermentation process, with special regard to the recently used resin-addition fermentation techniques. We have built a simple device for sampling such fermentation mixtures.

Acknowledgments

The authors wish to thank István Barta, Dr József Ivanics, and Dr Lajos Ila for providing the reference compounds. Thanks are also due to György Máté and Géza Keresztúri for their help in collecting professional literature.

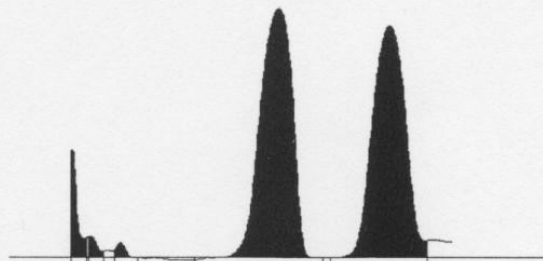


Figure 5
Scan obtained from a fermentation mixture.

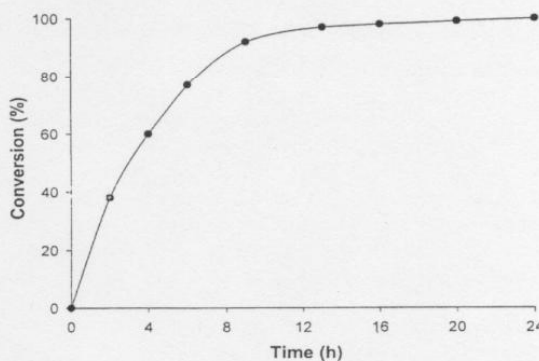


Figure 6
Conversion of MDPA to MBDE during a typical bioreduction.

References

- [1] EP 0492485 (1991); JP 1993070463 (1993); US 5519019 (1996); US 5521174 (1996); US 5536832 (1996); US 5604223 (1997); US 5639751 (1997).
- [2] F. Andrási, *Drug Future* **26**(8) (2001) 754–756.
- [3] B.A. Anderson, M.M. Hansen, A.R. Harkness, C.L. Henry, J.T. Vicenzi, and M.J. Zmijewski, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 12358 (Suppl., p. 1).
- [4] C.A. Costello, R.A. Payson, M.A. Menke, J.L. Larson, K.A. Brown, J.E. Tanner, R.E. Kaiser, C.L. Herschberger, and M.J. Zmijewski, *Eur. J. Biochem.* **267** (2000) 5493–5501.
- [5] B.A. Anderson, M.M. Hansen, J.T. Vicenzi, and M.J. Zmijewski, In: K.Cr. Cradamasetti (Ed.) *Process Chemistry in the Pharmaceutical Industry*, Marcel Dekker, New York, 1999.
- [6] UP 5919954; EP 0699676A1.
- [7] M.J. Zmijewski, J.T. Vicenzi, B.E. Landen, W.L. Muth, P.G. Marler, and B.A. Anderson, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47** (1997) 162–166.
- [8] J.T. Vicenzi, M.J. Zmijewski, M.R. Reinhard, B.E. Landen, W.L. Muth, and P.G. Marler, *Enzyme. Microb. Technol.* **20** (1997) 494–499.
- [9] B. Erdélyi, A. Szabó, L. Birincsik, and G. Keresztúri, in preparation.

Ms received: February 18, 2003
Accepted by SN: March 26, 2003

III. Melléklet

Process development of methylenedioxyphenyl-acetone chiral bioreduction

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **29** (2004) 195-199.

Impact factor (2003): 1,475



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic xxx (2004) xxx–xxx

www.elsevier.com/locate/molcatb

Process development of methylenedioxyphenyl-acetone chiral bioreduction

Balázs Erdélyi^{a,*}, Antal Szabó^a, László Birincsik^a, Ágoston Hoschke^b^a *IVAX Drug Research Institute Ltd., Berlini u. 47-49, H-1325 Budapest, Hungary*^b *Department of Brewing and Distilling, Szent István University, Ménési út, H-1118 Budapest, Hungary*

Received 3 July 2003; received in revised form 22 September 2003; accepted 14 October 2003

Abstract

Talampanel is a non-competitive antagonist of AMPA receptor, and it is a drug studied for the treatment of epilepsy and cerebrovascular ischemia. The first step of an efficient synthesis of talampanel is the reduction of 3,4-methylenedioxyphenyl-acetone (MDA) to (S)- α -methyl-1,3-benzodioxole-5-ethanol (MBE) accomplished with the use of *Zygosaccharomyces rouxii* in the presence of XAD-7 resin. *Z. rouxii* was chosen for its resistance to higher substrate and product concentrations (<6 g/l) and its higher reductase activity in comparison to other yeasts. Application of the moderately polar adsorbent resulted in low and non-toxic concentration of both the substrate and product in water phase.

A low cost fermentation medium without any component of animal origin was elaborated to produce *Z. rouxii* biomass. The control of pH and dissolved oxygen concentration, temperature, antifoam system, the time of harvest, the rate of inoculations and the number of inoculation steps were also studied. The fermentation process in 1000 l fermentor provided cell paste, possessing satisfactory ketoreductase activity (95–99%) with excellent enantioselectivity.

A method was developed to measure enzyme activity and to determine the key parameters of bioreduction. Excellent enantioselectivity was found under all conditions studied. The yield was very sensitive to the quality of cell paste. In a rather wide range temperature and aeration did not affect the results of bioreduction.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Corn steep liquor supernatant (CLS); *Zygosaccharomyces rouxii*; Stereoselective bioreduction; In vivo co-enzyme regeneration; Multi-functional sampler

1. Introduction

A novel class of orally active 2,3-benzodiazepines was recently discovered and patented by Hungarian researchers [1]. Biological activity studies led to the discovery of (8R)-7-acetyl-5-(4-aminophenyl)-8,9-dihydro-8-methyl-7H-1,3-dioxolo[4,5-h]-[2,3]benzodiazepine (talampanel), an investigational new drug with antiepileptic, neuroprotectant and skeletal muscle relaxant effects, as it was described in a review by Andrási [2].

The first stage of talampanel synthesis is a microbial stereospecific reduction of 3,4-methylenedioxyphenyl-acetone (MDA) to (S)- α -methyl-1,3-benzodioxole-5-ethanol (MBE,

Fig. 1). In addition to excellent enantioselectivity, another advantage is the in vivo regeneration of the oxidized NAD(P)⁺ co-enzyme, which is essential for the action of carbonyl reductase enzyme [3,4].

The scale-up of bioreduction in a Rosenmund-agitated filter dryer was published by Vicenzi et al. [5]. Our paper deals with an economical method of cell paste production on pilot plant scale and with further laboratory scale experiments on bioreduction.

The key parameters, from the stock culture to the application of cell pastes, were optimized experimentally. It has been found that the reductase activity of *Zygosaccharomyces rouxii* was very sensitive to the following factors: nitrogen source of fermentation medium, cultivation conditions in the bioreactor, method of cell separation, storage conditions of cell pastes and the parameters of bioreduction.

* Corresponding author. Tel.: +36-1-399-3330; fax: +36-1-399-3321.
E-mail address: balazs.erdelyi@tdri.hu (B. Erdélyi).

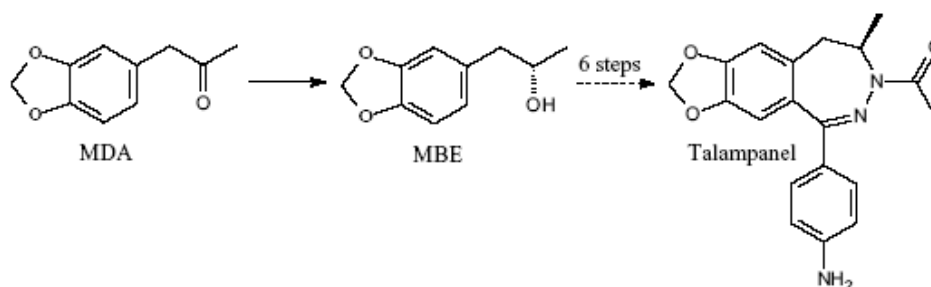


Fig. 1. Abbreviated synthetic scheme.

2. Experimental

2.1. Microorganism and growth conditions

Z. rouxii (ATCC 14462) is a generally recognized as safe (GRAS) type strain and was maintained on YM agar in a 1.2 l culture flask bottle. The cultures were cultivated for 3 days at 28 °C. In these experiments cultures not older than 1 month were used.

Seed cultures were grown in a bioreactor of 10 l working volume. The medium (4 × YM) consisted of 1.2% malt extract (Fluka), 1.2% yeast extract (Fluka), 2.0% vegetable peptone (Oxoid no. 1.) and 4.0% glucose. The following conditions were chosen: 28 °C temperature, 0.5 vvm bottom air flow, 450 rpm agitation and 0.2 bar overpressure. The seed culture was suitable for the inoculation of 1000 l fermentation medium after 22 h cultivation, when cell concentration reached 7×10^8 cells/ml and pH value was between 5.8 and 6.5.

In order to achieve optimal conditions, we conducted fermentations in a bioreactor of 10 l working volume. The following media seemed to be suitable for cultivating yeast cells with satisfactory reductase activity: the RR-1 medium consisted of 6.0% corn steep liquor with 50% dry matter content (Hungara), 0.5% Gistex, 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5% CaCO_3 , 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% PPG-2000 (Neuber) and 6.0% glucose. The RR-2 medium contained 1.0% corn steep liquor powder (Roquette, SolulyS HPP) instead of 6.0% corn steep liquor. In the RR-3 medium the corn steep liquor was exchanged for 18% corn steep liquor supernatant (CLS) with 15% dry matter content. The CLS was prepared as follows: raw corn steep liquor was warmed up to 60 °C, the pH was adjusted to 8.5, then the liquor was heated up to 95 °C and was maintained at this temperature for 10 min. Sedimentation was carried out at 6000 rpm in a Flottweg Z1 type fast decanter. The supernatant was used as a component of the RR-3 medium.

In the 1000 l fermentor dissolved oxygen level was kept above 30% by means of bottom air inlet (0.2–1.0 vvm), agitation (200–300 rpm) and overpressure (0.2–0.4 bar). Optimal temperature was 26 °C. The pH value was not controlled. The reactor was inoculated with 10 l of 22 h old seed culture. The exponential phase continued up to the 16th hour

of cultivation. The broth was harvested in the 24th hour of fermentation when the concentration of cells was between 2×10^9 and 3×10^9 cells/ml. The yeast biomass was separated from the fermentation broth in the Flottweg Z1 type fast decanter. From 1000 l broth, 65–70 kg biomass with 25–28% dry matter content could be obtained.

2.2. Resin-based bioreduction on laboratory scale and in a 250-l filter dryer

The conditions of laboratory scale bioreduction for testing the activity of cell pastes: 7.5 g resin (Amberlite, XAD-7), 1.0 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solution (10%) and 1.00 g MDA were added into a 100 ml Erlenmeyer flask. This mixture was agitated for 30 min in an orbital shaker. An aliquot from the 24 h old fermentation broth was centrifuged at 4000 rpm for 20 min, then 4.00–5.00 g cell paste was diluted with equal quantity of distilled water. After the addition of 7.5 g diluted cell paste and 2.0 g glucose, the mixture was shaken at 100 rpm. Samples were taken in the 2nd, 4th and in the 18th hour.

Reduction in the Rosenmund filter dryer was already reported [4,8], a mixture of 100 l XAD-7 resin, 8 kg MDA, 30 kg *Z. rouxii* paste and 14 kg glucose was raised to 200 l by the addition of tap water and maintained at 30 °C. The pH was kept above 7.0 with $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solution. Bioreduction was completed in the filter dryer at low agitation speed (30–50 rpm) during a period of 16–42 h.

2.3. Sampling from resin-based bioreduction

A sampling device was developed (Fig. 2), suitable (i) for sampling from a reaction mixture with resin content, (ii) for separation of the resin and (iii) elution of the target compounds from the resin [6].

2.4. Determination of glucose concentration

Glucose concentration is of considerable importance upon the completion of fermentation. We also determined glucose concentration during the bioreductions by applying the widely used Somogyi–Nelson method [7].

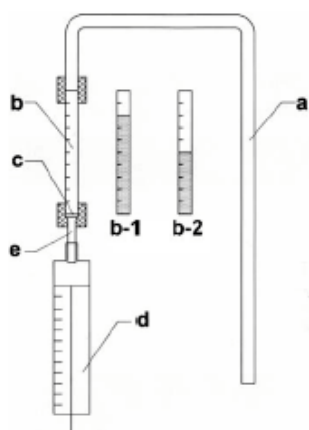


Fig. 2. Parts of sampler: (a) glass suction pipe, (b) graduated pipe, (c) stainless steel mesh, (d) PP syringe, and (e) small PP pipe, connection between the mesh and the syringe. Operation of this device: (i) sucking from a resin-added mixture, (ii) wet resin estimation by graduated pipe (b-1), (iii) elution the linked components by an organic solvent, (iv) air suction for drying up the resin to estimate the dry volume of it (b-2).

2.5. Thin layer chromatography (TLC) analysis of MDA and MBE

A quantitative TLC method was developed and recently published [6] in order to monitor the biotransformation during the bioreduction process. TLC was performed on 10 cm × 20 cm precoated plates (Merck Kieselgel 60 F₂₅₄, Art No. 5729). For mobile phase, a solvent mixture of hexane-ethyl acetate (7:3 v/v) was employed. Quantitation was performed by densitometry by scanning at 278 nm, using a computer controlled CAMAG TLC Scanner II.

Stereoselectivity was checked only in the first few experiments since *R* isomer was not produced in detectable amount. This result is in agreement with data published elsewhere [3].

3. Results and discussion

3.1. Optimisation of cell paste production

The cultures grown in a Roux-type culture flask were stored at 4 °C for a month without any loss of reductase activity. No degradation in enzyme activity was observed after 30 transfers of the original stock culture [8].

The 22 h old seed culture proved to be best for inoculation of the fermentation medium. Inoculation was also attempted with 16 and 36 h old seed cultures. The fermentation broth, inoculated with seed cultures cultivated for long time, reached the expected cell concentrations, the reductase activity of cell pastes was, however, not satisfactory (Table 1).

The effect of two-stage seed culture production was studied using the same seed medium under identical fermenta-

Table 1
The effect of different age seed cultures on reductase activity

	Propagation time of seed culture (h)		
	16	22	36
Cell concentration in the seed culture (cells/ml)	(3–4) × 10 ⁸	(7–11) × 10 ⁸	(10–15) × 10 ⁸
Cell concentration in the 24th hour of fermentation (cells/ml)	(6–9) × 10 ⁸	(18–25) × 10 ⁸	(15–25) × 10 ⁸
Conversion rate in the 18th hour of bioreduction (%)	60–76	95–99	84–89%

tion conditions. Inoculation rate of the second stage seed culture medium was 1%, and 22 h propagation time proved to be most effective. The cell paste obtained from a fermentation broth inoculated with a seed culture of the second stage showed sufficient reductase activity.

The seed culture medium published earlier contained peptone of animal origin [5]. It was found that the same amount of vegetable peptone no. 1 (purchased from Oxoid) resulted in a seed culture of same quality. Efforts were made to reduce the amount of expensive components, but no suitable seed culture could be obtained. Under the conditions described in the Section 2, dissolved oxygen level was kept over 40% in the 101 bioreactor.

The cost of fermentation medium without component of animal origin could be reduced to 1/10th of the amount given in an earlier publication [5]. Initially, raw corn steep liquor was applied (RR-1), which led to contamination of the resin by corn steep liquor sediments. Later corn steep liquor powder was examined, which did not contaminate the XAD-7 resin, but the yield of reduction was not satisfactory. Finally, all problems have been solved by the use of CLS.

During the exponential phase ammonia and sodium hydroxide solution was used to maintain the pH value above 6.0. No significant difference was observed related to cell growth in a fermentation medium without pH control. Cell concentrations were similar in all cases, but lower enzyme activities were measured with yeast cells cultivated in a medium containing ammonia solution (Table 2). The pH value decreased to 4.2–4.8 in the exponential phase without control, which did not cause any loss in the reductase activity of yeast cells.

The control of dissolved oxygen level in a 10001 bioreactor was optimized. Up to the 6th hour airflow was kept low (0.2 vvm) because of intensive foaming. In the course of exponential growth, aeration rate could be raised up to 1.0 vvm without intensive foaming.

Cell concentration did not increase significantly after the 20th hour of cultivation, but higher reductase activity was measured using 24 h old cells for the bioreduction. Similar enzyme activity was measured in the process of cultivation up to the 48th hour (Table 3).

Table 2
The effect of pH control on enzyme activity

	pH control (≥ 6.0)		
	With ammonia	With NaOH	Without control
Cell concentration in the 24th hour of fermentation	$1.5\text{--}2.2 \times 10^9$ cells/ml	$1.5\text{--}2.5 \times 10^9$ cells/ml	$1.5\text{--}2.5 \times 10^9$ cells/ml
Conversion rate in the 18th hour of bioreduction	75–85%	95–99%	95–99%

Table 3
The effect of cultivation time on enzyme activity.

Propagation time	20h	24h	48h
Cell concentration in fermentation broth (cells/ml)	$1.3\text{--}2.5 \times 10^9$	$1.8\text{--}2.5 \times 10^9$	$1.8\text{--}3.0 \times 10^9$
Conversion rate in the 18th hour of bioreduction (%)	80–90	95–99	80–99

The cell concentrations are more similar to each other, contrary to reductase activities.

3.2. Optimisation of the bioreduction process

Complete reduction was achieved between 25 and 36 °C independently of aeration conditions. The accumulation of carbon dioxide could lead to a lower rate of bioreduction, owing to a decrease in pH values. In addition to the quality of cell paste, the amount of resin applied also had a definite effect on the yield attained. Different amounts of resin were added to the reaction mixture. Optimal resin amount was determined experimentally [5]. By addition of 20% more or less resin than the optimal amount, lower conversion rates were measured. The decrease in conversion was due to a change in substrate and/or product concentration in the supernatant.

The resin was also affected by the method of stirring, the shape of impellers as well as to the rate of agitation. A magnetic stirrer at 100 rpm led to disintegration of the resin, which in turn caused the conversion to cease at approximately 55% conversion. On the other hand, agitation at the same rpm by use of a rolling tube or orbit shaker led to complete conversion within 18 h. The living cell number in the reaction mixture never decreased during the bioreduction.

Since the proportion of the results obtained by the different pathways of glucose catabolism is not known in this case, the amount of reduced co-factors formed during the glucose metabolism cannot be exactly calculated. For this reason, the amount of glucose required had to be determined experimentally. Glucose in 2, 4, 6, 8, 10 and 12% was added to the reaction mixture. Independently of the concentration of glucose, yeast cells consumed all amount of glucose in each case. If the reaction mixture contained 2 or 4% of glucose, the reduction was incomplete. By the addition of 10–12% glucose, ethanol production might be responsible for the interruption. An amount of 6–8% glucose was sufficient to attain complete reduction (Fig. 3).

In the initial experiments, contamination by different bacterium species caused repeated interruption in bioreduction in consequence of multiplication of aerobic bacteria in the reaction mixture. It could be avoided by applying lower temperatures and by the use of continuous nitrogen inlet.

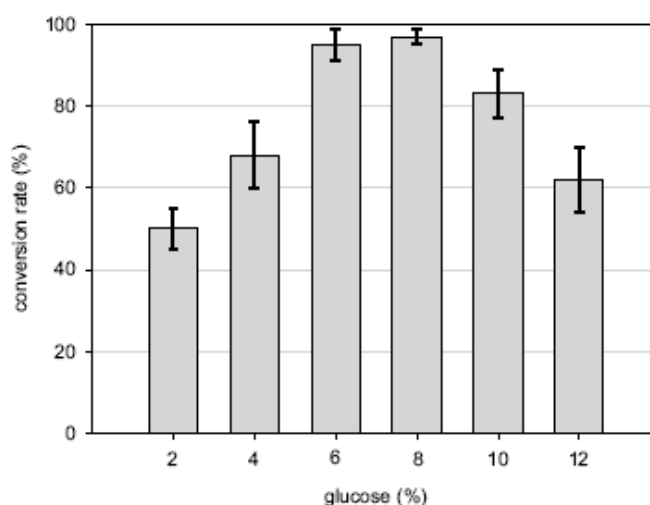


Fig. 3. The effect of different glucose concentrations on the rate of bioconversion.

4. Conclusions

An economical procedure was applied to produce yeast cell paste of excellent reductase activity in a 1000 l fermentor. Further scale-up of the fermentation process may not cause difficulties. Further steps of seed cultures did not lead to lower enzyme activity.

Investigation of this resin-based bioreduction gave further interesting results. Relative independence of the temperature and aeration facilitates further scale-up of the procedure. For closer information on the sensitivity of resin to the method of stirring, however further investigations are required. Resin can be floated by filtered air or nitrogen inlet on a larger scale however periodic agitation may offer an efficient method for preserving the adsorbing capacity of the resin.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge K. Albrecht for his support in the fermentation procedures, and I. Barta, J. Ivanics

and L. Ila for providing the reference compounds. Thanks are also due to Gy. Máté and G. Keresztúri for their help in collecting professional literature.

References

- [1] EP 0492485, Chem. Abstr. 117 (1992) 171479b.
- [2] F. András, *Drugs Future* 26 (8) (2001) 754–756.
- [3] B.A. Anderson, M.M. Hansen, A.R. Harkness, C.L. Henry, J.T. Vicenzi, M.J. Zmijewski, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 12358–12359.
- [4] M.J. Zmijewski, J.T. Vicenzi, B.E. Landen, W.L. Muth, P.G. Marler, B.A. Anderson, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47 (1997) 162–166.
- [5] J.T. Vicenzi, M.J. Zmijewski, M.R. Reinhard, B.E. Landen, W.L. Muth, P.G. Marler, *Enzyme Microb. Technol.* 20 (1997) 494–499.
- [6] B. Erdélyi, L. Birimesik, A. Szabó, *J. Planar Chromatogr.* 125 (2003) 267–269.
- [7] N.A. Nelson, *J. Biol. Chem.* 153 (1944) 375–380.
- [8] B. Erdélyi, G. Keresztúri, in: *Proceedings of the Symposium on Power of Microbes in Industry and Environment*, Paper No. 57, Opatija, 7–9 June 2002.

IV. Melléklet

TLC/HPTLC and HPLC Methods for Monitoring Microbial Transformation Processes

Journal of Planar Chromatography, **17** (2004) 132-136.

Impact factor (2003): 1,047

TLC/HPTLC and HPLC Methods for Monitoring Microbial Transformation Processes

Balázs Erdélyi*, Antal Szabó, László Birincsik, Gábor Seres, János Salát, József Ivanics, and Attila Kónya

Key Words:

Biotransformation
Resin-content medium sampling
HPLC chiral analysis
HPTLC
Enantioselective reduction
Compactin hydroxylation

This paper is based
on an oral presentation at the
International Symposium for
Thin-Layer Chromatography,
Lyon, France, October 15–18th, 2003

Summary

TLC methods have been developed for monitoring microbial enantioselective reduction and regioselective oxidation. The work discussed in this paper focused on preparation of aromatic chiral alcohols by bioreduction of their respective acetone derivatives by biocatalysis using yeast strains in medium containing added resin. A simple method and suitable device were developed for sampling from such heterogeneous fermentation media. Methods and chromatograms are presented for quantitation by TLC and for enantiomer ratio determination by HPLC. With regard to oxidation procedures, a TLC method was established for monitoring compactin hydroxylation during fermentation processes – as a representative example. Improvement of the method and use of HPTLC plates resulted in high resolution and separation capacity equal to that of the HPLC method. By means of the method by-products usually formed as minor components in the biotransformation could also be detected. Repeated clogging of the HPLC column as a result of impurities usually present in considerable amounts in fermentation samples is another reason for using TLC for analysis of microbial media.

1 Introduction

Most of the compounds used as drugs contain one or more chiral centers in which the configuration of a substituent determines the selectivity of biological activity [1–3]. Stereospecific synthesis is usually performed by use of enzyme catalysis-aided technology, and whole-cell biotransformation is often realized on an industrial scale. Whole-cell biotransformation involving redox processes is usually conducted by yeast fermentation [4, 5]. Development of microbial fermentation methods usually focuses on determining optimum conditions; this requires use of

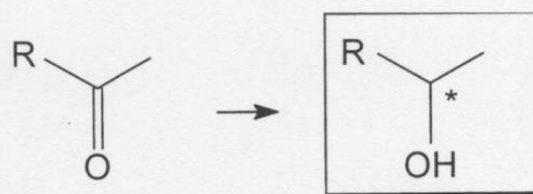


Figure 1
Schematic diagram of the bioreduction studied.

comprehensive analytical methods to obtain quantitative information at short intervals during the course of such a process.

A TLC method for monitoring stereospecific reduction of methylenedioxyphenylacetone to the (*S*) alcohol, mediated by yeast cells in the presence of Amberlite XAD-7 resin, has recently been described. A sampler device specially developed for resin-containing fermentation liquors has also been reported [6].

Bioreduction has been used to reduce aromatic ketones with the aim of obtaining enantiomerically pure alcohols (Figures 1 and 2). Reductions were conducted in the presence of XAD-7 resin using *Zygosaccharomyces rouxii* cells. Rather simple methods for sampling and analysis were needed for analysis of many biological samples. An HPLC method was also developed to measure the enantiomeric excess of different chiral alcohol mixtures.

The second part of the paper deals with a rapid method suitable for monitoring regio- and stereospecific oxidation (hydroxylation) of compactin by microbial fermentation (Figure 3) [7–9]. The hydroxylated product, pravastatin, is a member of the statin group (lovastatin, pravastatin, and simvastatin) used in the treatment of hypercholesterolemia [10]. To obtain information about the presence of impurities and by-products (minor

B. Erdélyi, A. Szabó, L. Birincsik, G. Seres, J. Salát, J. Ivanics, and A. Kónya, IVAX Drug Research Institute Ltd, P.O. Box 82, Budapest, Hungary.

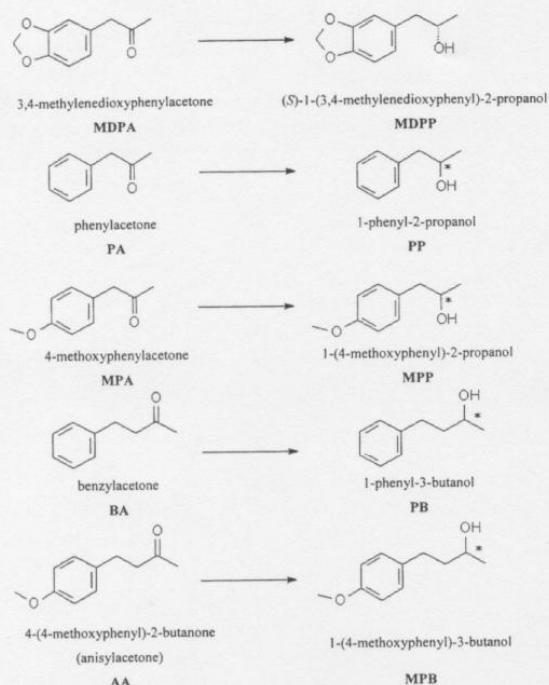


Figure 2
Structures and chemical names of the substrates and products studied in the bioreduction experiments, with the abbreviations used for the compounds.

components) formed during the fermentation processes we established an HPTLC method of high resolution and compared the results with data obtained by means of an HPLC method. The resolving power of the column was less than that of the TLC method, probably because of impurities in the fermentation broth.

2 Experimental

2.1 Solvents and Chromatography Plates

All solvents were of analytical grade. Rapid analysis was performed on 10 cm × 20 cm silica gel 60 F₂₅₄ TLC plates (Merck #1.05729); high-performance analysis was performed on 20 cm × 10 cm silica gel 60 F₂₅₄ HPTLC plates (Merck #1.15696).

2.2 Instrumentation

2.2.1 TLC

Samples were applied with a Camag Linomat IV instrument equipped with a 100-μL syringe (#695.0014). Plates were developed in Camag twin-trough chambers (140 and 240 mm high for short and long runs, respectively). Quantitation was performed with a Camag TLC Scanner II controlled by CATS software.

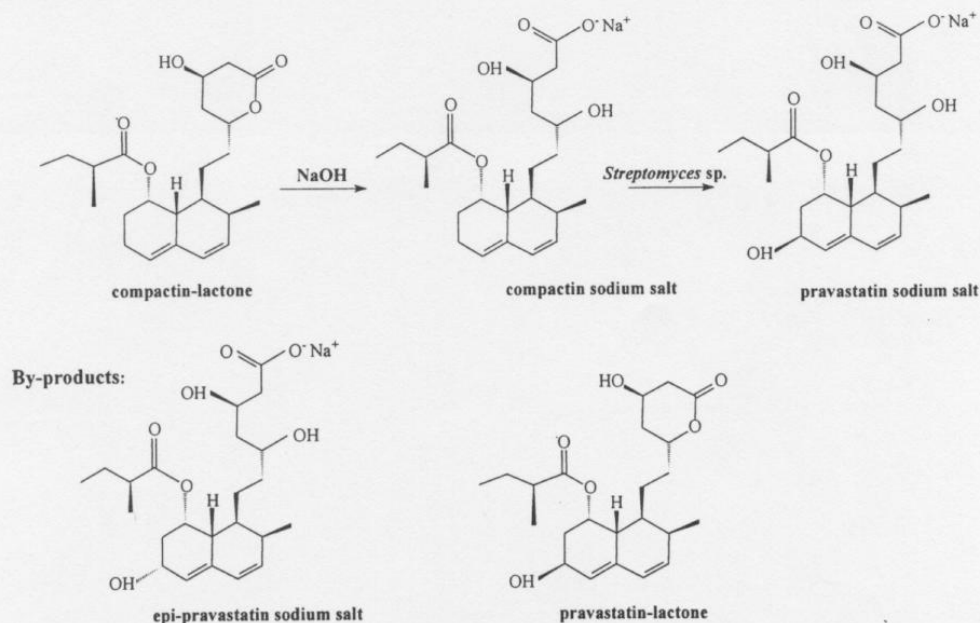


Figure 3
Schematic diagram of compactin hydroxylation, with by-products often formed during the fermentation process.

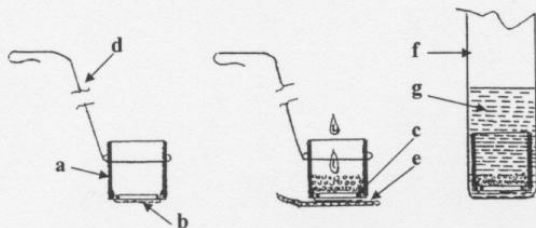


Figure 4

Device for sampling from resin-containing fermentation media. a, small plastic tube; b, stainless wire screen, 100 mesh; c, screen binding ring; d, steel wire handle; e, filter paper; f, test tube; g, acetone.

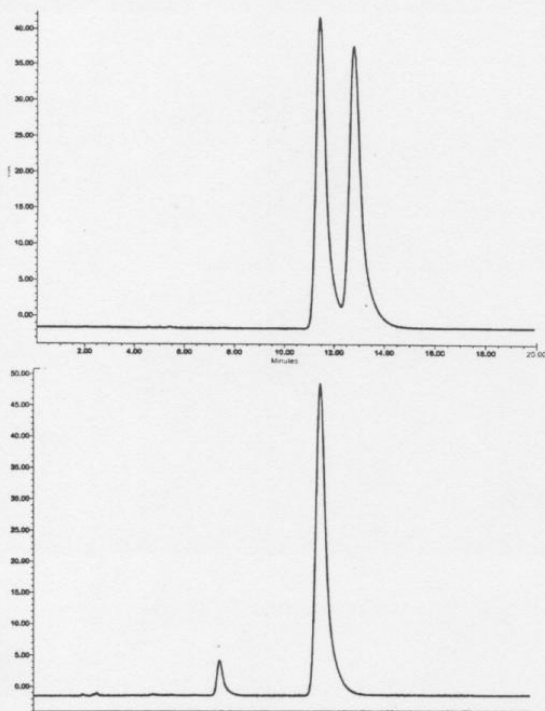


Figure 5

Chromatograms obtained by chiral HPLC. Racemic MDPP (above) and MDPP from the bioreduction mixture (below). The (S) alcohol only was formed.

2.2.2 HPLC

HPLC was performed with a Waters 510 pump and a Waters 486 detector. The volumes injected were 5 μ L for chiral applications and 20 μ L for achiral ones. A Chiralcel OD-H column (Daicel) was used for determination of the enantiomer ratio of aromatic alcohols. The mobile phase was a hexane-2-propanol mixture containing 2–5% 2-propanol. For monitoring compactin hydroxylation a 10 μ m Nucleosil C₁₈ column (BST) was

used with gradient elution. HPLC data were acquired by means of Millennium³² software.

2.3 Preparation of Fermentation Samples

2.3.1 Resin-Containing Media

Samples of heterogeneous fermentation liquor were taken with the aid of a small tube fitted with a screen (Figure 4). The aqueous phase with the microorganisms was removed by absorption on filter paper; this was repeated after washing the resin with a few drops of water. The small tube was then

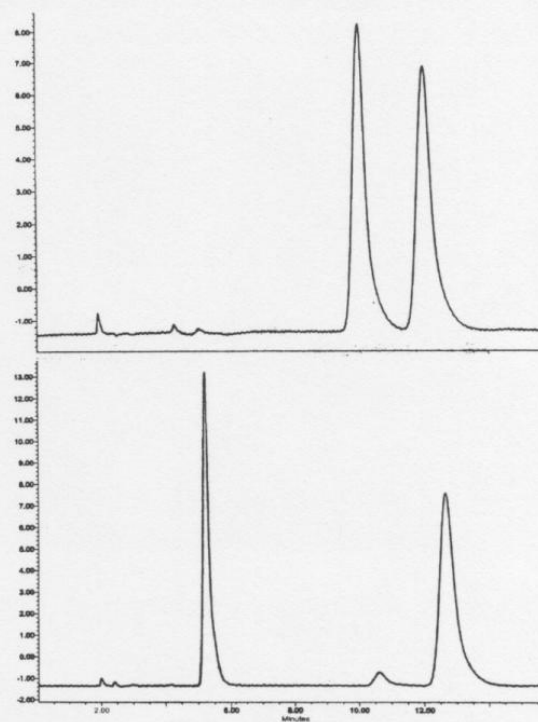


Figure 6

Chromatograms obtained by chiral HPLC. Racemic PB (above) and PB produced by yeast (below).

dropped into a test tube containing acetone, the volume of which depended on the expected concentration of the compounds to be determined.

2.3.2 Resin-Free Media

Homogeneous fermentation broth (5 mL) was sampled, acetonitrile (5 mL) was added, and the mixture was homogenized.

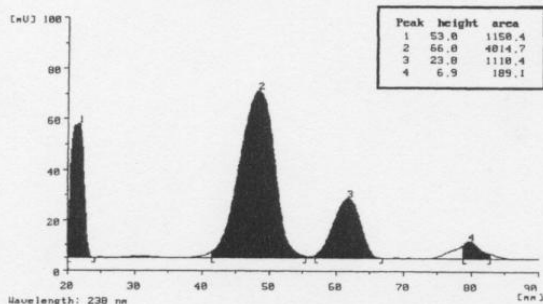


Figure 7

Chromatogram obtained by rapid TLC of sample from microbial hydroxylation of compactin approximately half way through the transformation process (1, impurities; 2, pravastatin; 3, compactin; 4, by-products).

After a few minutes the clear supernatant was used in subsequent steps.

2.4 Sample Application

Samples (2, 4, 8 μL) and reference alcohol solutions (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 2, 4, 8 μL) were applied to the plate as 3 mm bands with a distance of 9 mm between the bands.

2.5 Development, Evaluation

Plates were developed in a Camag twin trough chamber with toluene-dichloromethane-tetrahydrofuran, 92 + 4 + 4 (v/v), as mobile phase for samples from ketone reduction and toluene-acetone-glacial acetic acid, 20 + 30 + 4 (v/v), as mobile phase for samples from compactin hydroxylation. The migration distance was 70 mm for the so-called rapid method and 160 mm in HPTLC. After evaporation of the mobile phase in a vacuum chamber, plates were scanned in reflectance mode at $\lambda = 275$ nm for samples from ketone reduction and at $\lambda = 238$ nm for samples from compactin hydroxylation.

2.6 Determination of Conversion Rate During Biotransformation

Concentrations of the substrates (*S*) and the products (*P*) were obtained from a three-point calibration plot constructed after

Table 1

R_f values of the ketones and alcohols studied.

Ketone	Substrate			Product		
	Abbreviation	R_f	Alcohol	Abbreviation	R_f	
3,4-Methylenedioxyphenylacetone	MDPA	0.72	(<i>S</i>)-1-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2-propanol	MDPP	0.48	
Phenylacetone	PA	0.79	1-Phenyl-2-propanol	PP	0.50	
4-Methoxyphenylacetone	MPA	0.92	1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanol	MPP	0.60	
4-(4-Methoxyphenyl)-2-butanone (anisylacetone)	AA	0.73	1-(4-Methoxyphenyl)-3-butanol	MPB	0.41	
Benzylacetone	BA	0.80	1-Phenyl-3-butanol	PB	0.46	

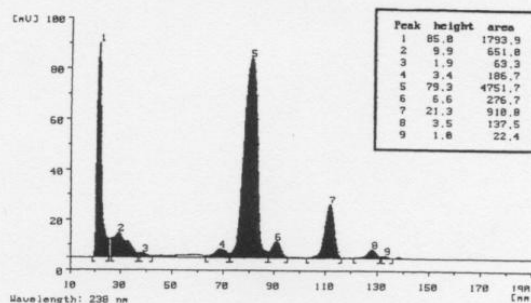


Figure 8

Chromatogram obtained by HPTLC of sample from compactin hydroxylation (1-3, impurities from the fermentation broth; 4, by-product; 5, pravastatin; 6, epipravastatin; 7, compactin; 8, 9, by-products).

chromatography of reference samples. Conversion rates [%] were determined from the formula $P/S \times 100$.

3 Results and Discussion

3.1 Ketone Biotransformation

3.1.1 Thin-Layer Chromatographic (TLC) Monitoring of Ketone Reduction

Figure 1 shows the general reaction scheme. The structure of the substrates, the products formed in the experiments, and the names of the chemicals and the abbreviations (given by us) are shown in Figure 2. The R_f values obtained by TLC for the five pairs of compounds given in Figure 2 are summarized in Table 1. Substantial differences were obtained between the R_f values obtained for all pairs of compounds.

3.1.2 Chiral Analysis by High Performance Liquid Chromatography

At the end of the transformation the compounds were extracted from the fermentation broth by shaking with an equal volume of ethyl acetate. After separation the organic phase was dried over sodium sulfate. Figures 5 and 6 show the chromatograms obtained from chiral analysis of MDPP and PB. The *S* enantiomer only was obtained by bioreduction of MDPA to the alco-

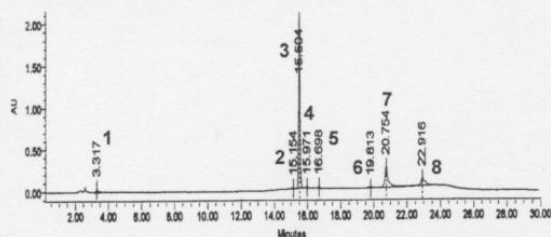


Figure 9

Chromatogram obtained by HPLC of the sample shown in Figure 8 (1, impurity; 2, by-product; 3, pravastatin; 4, epi-pravastatin; 5, 6, by-products; 7, compactin; 8, by-product).

hol. The PB sample of microbial origin contained both the alcohol and the substrate ketone (BA; Figure 6).

3.2 Compactin Hydroxylation

3.2.1 TLC for Monitoring Microbial Transformation Processes

Figure 7 shows a chromatogram obtained by the rapid method (development time only 15 min). Because the sample was taken before biotransformation was complete, both substrate and product are apparent in the chromatogram. The significant difference between the R_F values of substrate and product enabled determination of the rate of transformation and rational prediction of a reaction harvest time for low substrate and high product levels.

3.2.2 High-Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

A chromatogram obtained by HPTLC analysis of a sample from a pravastatin fermentation is presented in Figure 8. It is apparent that in addition to compactin and pravastatin the chromatogram contains other peaks including those of impurities in the fermentation broth and minor components not detected in the previous chromatogram (rapid method). The number of peaks was practically the same as obtained by HPLC (Figure 9).

3.3 Column Clogging

In the course of monitoring compactin transformation by HPLC analysis of fermentation broth extracts a decrease in column efficiency was observed (chromatograms in Figure 10). It was assumed this was caused by irreversible adhesion of impurities to the adsorbent. This assumption was supported by comparison of TLC and HPLC chromatograms (Figures 8 and 10) – components partially or completely absent from the HPLC chromatogram appeared on the HPTLC plates and, because they could not be eluted, spoiled the column. The columns must, therefore, be changed frequently.

4 Conclusion

Rapid TLC methods are suitable for monitoring microbial transformation processes at short intervals. Analytical standardiza-

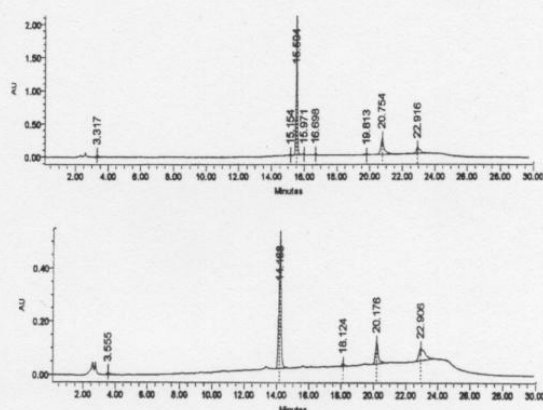


Figure 10

Chromatograms obtained from a sample of microbial transformation by HPLC with new (above) and used (below) columns.

tion in monitoring of microbial transformation is more secure than in HPLC because of the use of intact adsorbent for every run. The HPTLC method affords the opportunity to obtain more detailed information about minor components formed as by-products during biotransformation than can be obtained by use of the rapid TLC method. HPLC proved suitable for determination of enantiomeric excess for samples of aromatic non-ionic alcohols produced during these investigations.

Acknowledgments

The authors wish to thank György Máté for literary research. Thanks are due to Dr Sándor Solyom, Érszéné Ildikó Szakovics, Dr Éva Ilkőy, and István Barta for preparing and providing reference materials used in the experiments.

References

- [1] I. Agrant, H. Caner, and J. Caldwell, *Nature Rev/Drug Discovery* **1** (2002) 753–768.
- [2] R.N. Patel, *Enzyme Microb. Tech.* **31**(6) (2002) 804–826.
- [3] T. Kometani, H. Yosii, and R. Matsuno, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **1** (1996) 45–52.
- [4] M.J. Burk, *Adv. Synth. Catal.* **345** (2003) 647–648.
- [5] W.-D. Fessner, *Adv. Synth. Catal.* **345** (2003) 649.
- [6] B. Erdélyi, L. Birincsik, and A. Szabó, *J. Planar Chromatogr.* **16** (2003) 246–248.
- [7] Y. Peng and A.L. Demain, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **10** (2000) 151–156.
- [8] J. Park, J. Lee, T. Kwon, D. Yi, Y. Kim, S. Moon, H. Suh, S. Kang, and Y. Park, *Biotechnol Lett.* **25** (2003) 1827–1831.
- [9] N. Serizawa, *Biotechnol Annu Rev.* **2** (1996) 373–389.
- [10] R.F. Reinoso, A. Sánchez Navarro, M.J. Garcia, and J.R. Prous, *Method Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **9** (2002) 593–613.

Ms received: January 19, 2004
Accepted by SN: April 7, 2004