

Válasz

Dr. Gunda Tamás a MTA kémiai tudományok doktora opponensi véleményére

Köszönöm Opponensemnek az értekezés alapos áttanulmányozását és megjegyzéseit. Örömmre szolgál Opponensem pozitív véleménye, megjegyzéseire az alábbiakban szeretnék válaszolni.

1. Egyetértek Opponensem “zöld” kémia kapcsán kifejezett azon kételyével, hogy mennyire tekinthető környezetbarát módszernek egy eljárás, amelyet környezetkímélő körülmények között végeznek, azonban a feldolgozás során szerves oldószereket használnak. Az általunk, 45-48. oldalakon “*Nem aktivált karbociklusos β -laktámok gyűrűnyitása oldószer nélkül*” cím alatt bemutatott laktámok enantioszelektív gyűrűnyitását környezetkímélő körülmények között, oldószer nélkül végeztük: a granulált, immobilizált enzimet és jól elporított szubsztrát laktámot összekevertük, majd körkörös mozgást végző, 70 °C-on működő rázó gépbe tettük. Az 50%-os konverzió elérésénél a reakcióelegyhez, az ipar által elfogadott oldószerek közé minősített etil-acetátot (K. Alfonsi; J. Colberg; P.J. Dunn; T. Fevig; S. Jennings; T.A. Johnson; H.P. Kleine; C. Knight; M.A. Nagy; D.A. Perry; M. Stefaniak, *Green. Chem.* **2008**, *10*, 31-36) adtunk. Az enzimet a gyűrűnyílt β -aminosavval együtt kiszűrtük, majd a szűrletet bepároltuk és kaptuk a laktám enantiomert. A kiszűrt enzim felületéről az aminosavat vízzel mostuk le. A termékek további tisztítására nem volt szükség, amennyiben azonban átkristályosításokat végeztünk volna, az EtOH és *t*-BuOMe az ipar által a szintén elfogadott oldószerek közé tartoznak.

Opponensem ráirányítja a figyelmet arra, hogy pont a víz megspórolása jelenti talán a legkevesebb környezeti terhelésbeli változást, amivel szintén egyetértek. Kétségtelen, hogy az enzimes reakciókat kezdetben kizárólag vizes közegben végezték, később azonban, a Klibanov féle áttörés után (A. Zaks; A.M. Klibanov, *Science*, **1984**, *224*, 1249-1251) egyre gyakrabban végeztek enzimes átalakításokat szerves-vizes egy- vagy kétfázisú rendszerekben, majd szerves oldószerben. A szerves közeg használatának számos előnye van, például lehetőséget biztosít vízérzékeny szubsztrátok vagy vízérzékeny terméket eredményező szubsztrátok enzimes rezolválására. Ugyanakkor, a víz jelenléte sok esetben nem kívánt reakciókhoz is vezethet, ezért is különösen fontos bizonyos esetekben, például enzim-katalizált acilezés esetében (hogy ne játszódhasson le a termék észter hidrolízise) a vizet

kizárni. A különböző szerves oldószerekben végzett enzimes reakciók esetében megfigyelték az enzim aktivitására és stabilitására kifejtett jótékony hatás mellett, az enantioszelektivitásra gyakorolt pozitív hatást is, ami szintén a szerves oldószerben végrehajtott enzimes reakciók mellett szól. Következésképpen, a szerves oldószerekben végzett kémiai átalakítások az enzimológia egyik legizgalmasabb területévé vált.

Opponensem azon kérdésére, hogy ismeretesek-e konkrét vizsgálatok az enzim térszerkezeti különbségeire különböző oldószerekben, válaszom, hogy a szerves oldószer molekulák és az enzim térszerkezeti különbségei közötti összefüggések szisztematikus vizsgálatára nem ismerek adatot az irodalomból. A *Burkholderia cepacia* lipáz esetében molekula dinamikai szimulációkkal vizsgálták az *un.* katalitikus triádot elzáró, *ill.* szabaddá tevő enzim szerkezeti részének konformáció változásának dinamikáját (zárt-, nyitott- vagy átmeneti-konformáció) explicit oldószer-modellként víz-toluol rendszer használatával (P. Trodler; R.D. Schmid; J. Pleiss, *BMC Structural Biology*, **2009**, 9, doi:10.1186/1472-6807-9-38).

A 39. oldalon leírt molekulamodellezésnél nem számoltunk a szerves oldószer enzim-szubsztrát tranzíciós állapotát stabilizáló vagy destabilizáló részvételének lehetőségével, a CAL-B laktámok gyűrűnyitása során tanúsított kiváló enantioszelektivitását, valamint a 2-oktanol kritikus szerepét kívántuk megmagyarázni. Megjegyzem, valamennyi vizsgált oldószerben kiváló enantioszelektivitást ($E > 200$), azonban igen különböző reakciósebességeket tapasztaltunk és minden bizonnyal értékes információkként használtuk volna, amennyiben létezik az irodalomban oldószerek enzim térszerkezetére gyakorolt hatásának tárgyalása. Érdekességgént megjegyzem, hogy összehasonlítva a $(\pm)$ -36 β -laktám oldószer nélkül végzett gyűrűnyitási eredményeit (Értekezés, 46. old. 14. táblázat, 2. sor) a $i\text{Pr}_2\text{O}$ -ben végzett gyűrűnyitás eredményeivel (Értekezés, 55. old. 21. táblázat, 13. sor), a CAL-B enzim mindkét esetben kiváló enantioszelektivitással ($E > 200$) és hasonló reakcióidővel (az 50%-os konverzió eléréséhez szükséges ~ 5 h) katalizálta a reakciót. Ugyanitt jegyzem meg, hogy a legalkalmasabb, $\log P > 2,5$ oldószerekként kiemelt közeg használatával szemben, több esetben, mind a PS lipáz, mind pedig a CAL-B használatakor optimális aktivitást és enantioszelektivitást éter típusú oldószerekben ($i\text{Pr}_2\text{O}$, $\log P$ 1,52; t -BuOMe, $\log P$ 1,35) tapasztaltunk.

2. A 26. oldalon, enantiomerfeleslegek reakció előrehaladásával történő csökkenése kapcsán, amit az enzim felületéhez kötődött víznek tulajdonítunk, Opponensem kérdezi, hogy vizsgáltuk-e az oldószerben eleve benne levő esetleges víz hatását és mi a helyzet abszolút vízmentes körülmények között.

A kérdéses munkában olyan reakció körülményeket kellett találnunk, amelyek minimális enzimikus hidrolízist és az enzimikus acilezés maximális enantioszelektivitását biztosítsák. Az optimalizált körülmények között végzett ($\pm$)-**13** butirilezése nem állt le 50%-os konverziónál, az észter és az el nem reagált alkohol termékek enantiomerfeleslegei hirtelen kezdtek csökkenni (Értekezés, 18. ábra). Korábbi tapasztalatok birtokában (P. Csomós; L.T. Kanerva; G. Bernáth; F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 1789-1796) bizonyítottuk, hogy az *ee*-ek drasztikus csökkenéséért az enzim felületén lévő víz volt a felelős, amely mint nukleofil vett részt a termék észter hidrolízisében (E. Forró, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12, 643-649). Jóllehet analitikai tisztaságú *i*Pr₂O-t használtunk (< 0.1% H₂O), való igaz helyesebb lett volna, mint ahogy a későbbiekben gyakran írtuk: az enzim felületén és az oldószerben jelenlévő víz... (pl. E. Forró; F. Fülöp, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 2587-2592) együttes megfogalmazása. Opponensem abszolút vízmentes körülmények használatára irányuló kérdésére válaszolom összetett. Az enzimikus acilezések esetében fontos volt a reakcióelegyben jelenlévő víz mennyiségének minimalizálása, azonban valamennyi, későbbi enzimikus eljárásunkban szerepel nukleofilként a víz, következésképpen nem törekedtünk a reakcióelegy tartalmazta víz mennyiségének a visszaszorítása. Másrésről, az enzim működése feltételezi "néhány" vízmolekula jelenlétét, hiányában teljesen inaktívvá válik (Z. Jang; A.J. Russell, *Fundamentals of non-aqueous enzymology*, In A.M.P. Koskinen, A.M. Klibanov, *Enzymatic reactions in organic media*; Chapman & Hall: Glasgow, 1996; pp. 43-69).

Még egyszer köszönöm Opponensem alapos, sokoldalú bírálatát, dicsérő szavait.

Szeged, 2011. május 20.



(Forró Enikő)