

P 0 2 0 0 2 0 3

ÉTÉTELI
TALÁLMÁNY

55555

A1

ELJÁRÁS PRIMER ALKOHOLOK ÉS ÚJ KARBOHIDRÁT-ALDEHIDEK
SZELEKTÍV OXIDÁLÁSÁRA

Kivonat

A találmány aldehidek és/vagy karbonsavak előállítására vonatkozik, amelynek során egy primer alkoholt, mégpedig szénhidrátot katalitikus mennyiségű nitrozónium-vegyület alkalmazásával oxidálnak, utóbbit nitroxil-származékok oxidálására alkalmas enzim jelenlétében állítják elő. A találmány szerinti eljárással molekulánként legalább egy gyűrűs monoszacharid láncot tartalmazó csoportot tartalmazó oxidáz-szénhidrátokat állítanak elő, amelyek 25 monoszacharid egységre számítva egy karbaldehyd egységet hordoznak.

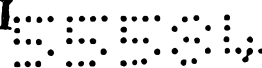
felkészítő és a név: ϕ

Tóth.

2002 FEBR 08

P 02 00 203

ÖZÉTÉTELI
ELDÁNY



AM

ELJÁRÁS PRIMER ALKOHOLOK ÉS ÚJ KARBOHIDRÁT-ALDEHIDEK SZELEKTÍV OXIDÁLÁSÁRA

A találmány nitrozóniumionoknak (oxoammóniumionoknak) nitroxil-gyökök, különösen 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil (TEMPO) oxidációjával történő előállítására vonatkozik. A nitrozóniumionok katalitikus oxidálószerként használhatók primer alkoholok aldehidek-ké történő szelektív oxidálásában.

A TEMPO kémiai úton történő visszaoxidálására vonatkozó eljárás De Nooy összefoglaló munkájából [Synthesis 1153-1174 (1996)] és a WO 95/07303 számú nemzetközi szabadalmi leírásból ismert.

Találmányunk kidolgozása során arra a felismerésre jutottunk, hogy az alkohol-funkciócsoportok, különösen a primer alkohol-funkciócsoportok oxidálása elvégezhető klóralapú oxidálószerrel nélkül, oxidálószerként alapvetően hidrogén-peroxid vagy oxigén alkalmazásával. A találmányunk szerinti oxidációs eljárást enzimek és/vagy fémkomplexek alkalmazásával végezzük. Amikor az oxidációt primer alkoholokon végezzük, ennek eredményképpen meglepő módon aldehidek képződnek, a megfelelő körülmények alkalmazásával kívánt esetben lényegében karboxilcsoportokká történő továbboxidálódás nélkül. Az aldehidek (hemi)acetál és rokon szerkezetű vegyületek formájában lehetnek jelen. A találmányunk szerinti oxidálási eljárás szekunder alkoholok, különösen szénhidrátok ketoszármazékká történő oxidálására is alkalmas. A találmányunk szerinti eljárást a mellékelt igénypontok jellemző részében határozzuk meg.

Az előzőleg nem publikált WO 99/23117 és WO 99/23240 számú nemzetközi szabadalmi leírásokban rendre cellulóz és keményítő oxidációját ismertették, ahol oxidáló enzimeként lakkázt alkalmaztak oxigén és TEMPO közvetítésével. A cellulóz lakkázzal/TEMPO-val

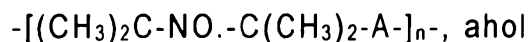
pcv

végzett oxidációjának eredményeképpen kevés és meghatározatlan mennyiségű karboxil- és karbonilcsoport képződött, ezzel szemben a keményítő lakkázzal/TEMPO-val végzett oxidációjában 100 glükóz egységre számítva 1 karboxilcsoport és 3 aldehidcsoport képződött, azonban az aldehidtartalom meghatározására alkalmazott eljárást nem ismertették.

Az alábbi ismertetésben a TEMPO-ra csak az egyszerűség kedvéért hivatkozunk, azonban a TEMPO természetesen más megfelelő nitroxilokkal, például α -hidrogénatomot nem tartalmazó szerves nitroxil-származékokkal is helyettesíthető, mint a 2,2,5,5-tetrametil-pirrolidin-N-oxil (PROXYL), 4-hidroxi-TEMPO, 4-acetamido-TEMPO és ezek származékai, amelyeket a WO 95/07303 számú nemzetközi szabadalmi leírásban ismertettek. Ezek a di-terc-alkil-nitroxil-származékok különösen alkalmasak primer alkoholok aldehid-funkciós-csoporttá történő szelektív oxidálására, különösen olyan szekunder alkohol-funkciós-csoportok jelenlétében, amelyeket nem kell oxidálni. A sztérikusan kevésbé gátolt nitroxilok, például a 4,4-dimetiloxazolidin-N-oxil (DOXYL), előnyösen szekunder alkoholok keto-funkciós-csoporttá történő oxidálására alkalmasak, például keto-cellulóz vagy keto-keményítő előállítása céljából. Az aktív oxidáló species a nitrozóniumion (oxoammóniumion $>N^+=O$), amely a megfelelő hidroxilamin és nitroxil-gyök in situ oxidációjában képződik. Kívánt esetben a reakciót két lépésben végezzük, ahol az első lépés a nitrozóniumion előállítása és a második az alkohol-funkciós-csoport oxidálása.

A nitroxil katalitikus mennyisége a primer alkoholra számítva előnyösen 0,1 tömeg% és 25 tömeg% közötti és a primer alkoholra számítva 0,1 mol% és 25 mol% közötti. A nitroxilvegyület immobilizálható is, például a 4-hidroxi-TEMPO hidroxilcsoportjának

egy megfelelő hordozóhoz történő kapcsolásával vagy nitroxil-polimer formában, mint a következő:



A jelentése alkiléncsoport és/vagy heteroatom és

n értéke például 10 és néhány 100 közötti szám.

A találmányunk szerinti eljárás primer alkoholok megfelelő aldehidekké történő oxidálására alkalmazható. Kivánt esetben a primer termék a megfelelő karbonsavvá továbboxidálható ismert oxidálószer, például hipoklorit, klorit, hidrogén-peroxid alkalmazásával vagy TEMPO által közvetített oxidáció alkalmazásával erélyesebb körülmények között, például magasabb hőmérsékleten, például 40 °C és 80 °C közötti hőmérsékleten vagy a reakciókörülmények hosszabb időn át történő fenntartásával. Egyik változat szerint az aldehid/karbonsav arány viszonylag kis pH érték (például pH 3-7) alkalmazásával, az oxidálószer szabályozott adagolásával, az oxigén koncentráció csökkentésével vagy először a nitrozóniumion oldatának előállításával (kétlépéses eljárás) növelhető.

A találmányunk szerinti eljárás különösen előnyösen alkalmazható a primer alkoholos csoportok mellett szekunder alkoholos csoportokat tartalmazó alkoholok primer hidroxilcsoportjának szelektív oxidálásra, ilyen vegyületek például az 1,6-oktándiol, 1,9-oktadekándiol, szteroid hormonok, cukoralkoholok, glikozidok (ízesítő prekursorok) és különösen primer alkoholos funkciócsoportot tartalmazó szénhidrátok. A szénhidrátok lehetnek monoszacharidok, mint a glükóz, fruktóz, diszacharidok, mint a szacharóz, maltóz, laktóz, oligoszacharidok vagy poliszacharidok. Az oligo- és poliszacharidok bármilyen típusúak lehetnek, például glükánok, mint a keményítő, keményítő komponensek (például amilóz, amilopektin, dextrinek), pullulán (α -1,4- α -1,4- α -1,6-glukán), cellulóz (különösen nem fa ere-

detű), kitin, lichenin és hasonló; furanofruktánok, mint az inulin és leván; galaktánok, arabinogalaktánok, furanoidpentozánok (xilánok), (galakto)mannánok (guar, szentjánoskenyér gumi), bakteriális exopoliszacharidok (EPS) és hasonló, továbbá ezen szénhidrátok származékai, mint hidrolizátumok. Ezek az oligo- és poliszacharidok például heteroszacharidok lehetnek, amelyek különböző szerkezeti egységeket tartalmaznak, még akkor is ha ezek a különböző egységek önmaguk nem tartalmaznak primer hidroxilcsoportokat, mint az uronsav egységek, például a xantánban és az algából származó szénhidrátokban. A találmányunk szerinti eljárással oxidálható szénhidrátok például a glükózidok és más védett szénhidrátok. Ezekre vonatkozó példaként megemlíthetők még a glikonsavak, mint a laktobionsav delta-lakton, amely glicerinsavvá és hasonlókká oxidálható.

A találmányunk szerinti oxidációban alkalmazható vegyületek külön csoportját képezzük a hidroxialkilezett szénhidrátok, ilyenek a hidroxipropil-cellulóz, a hidroxietil-keményítő vagy hidroxietilinulin, amely a formilalkil-szénhidrátok előállításának egyik eljárásváltozatában képződik. Egyéb megfelelő szénhidrát-származékok, amelyekben a (6-)hidrometilcsoportok legalább egy része ép, például a (2- és 3-)karboximetil-szénhidrátok.

A primer hidroxilcsoportokat tartalmazó szénhidrátok oxidációjával a megfelelő, aldehideket és kívánt esetben karbonsavakat tartalmazó szénhidrátok képződnek, amelyek gyűrűrendszere ép. Ezekre példa az α -1,4-glükán-6-aldehidek, a β -1,4-glükán-6-aldehidek, a β -2,1-fruktán-6-aldehidek és a β -2,6-fruktán-1-aldehidek. Ezek a termékek olyan funkciócsoportokat tartalmazó szénhidrátok jól alkalmazható köztitermékei, ahol az aldehidcsoport például egy aminvegyülettel vagy hasonlóval tovább reagál. Ezek jól alkalmazhatók

köztitermékként olyan szénhidrátok térhálósításában, amelyekben az aldehidcsoportok például diamin-reagensekkel továbbreagálnak.

A találmányunk szerinti megoldásban katalizátorként oxidoreduktázok vagy más enzimek használhatók, amelyek egy megfelelő redoxrendszer jelenlétében oxidációra képesek. A találmányunk szerinti eljárásban használható oxidoreduktázok, azaz további redoxrendszer jelenléte nélkül oxidálásra alkalmas enzimek, például a peroxidázok és az oxidázok, különösen a polifenol-oxidázok és a lakkáz. Bizonyos hidrolázok, mint a fitáz és a lipázok, akkor alkalmazhatók, amikor egy további redoxrendszer van jelen, például egy fémkomplex, mint a vanadát. A lipázok hatásos katalizátornak bizonyultak primer alkohol-funkciócsoportok TEMPO/hidrogén-peroxid/réz rendszerrel végzett szelektív oxidációban egy szerves vegyület, különösen 1-6 szénatomos karbonsav (például ecetsav) jelenlétében. A komplett enzimek helyett használhatók „szinzimek”, azaz az enzimek működését utánzó átmenetifém-komplexek. Ezek a komplexek például vanádiumot, mangánt, vasat, kobaltot vagy rezet tartalmaznak egy komplexképző-szerrel, különösen poliaminokkal együtt, mint a 2,2'-bipirridil, a fenantrolin, a tetrametiletiléndiamin, a pentametildietiléndiamin és ezek gyűrűs ellenpárjai, mint az 1,4,7-trimetil-1,4,7-triazonán és a hisztidin, valamint ezek oligomerei. A fémmel ellátott enzimeknél hidrogén-peroxidra, alkil- vagy ar(alk)il-hidroperoxidokra (például terc-butil-hidroperoxidra) vagy kloritra, mint végső elektronmegkötőre van szükség.

A találmányunk szerinti eljárásban alkalmazható peroxidázok (EC 1.11.1.1-1.11.1.11) például kofaktor-független peroxidázok, különösen a klasszikus peroxidázok (EC 1.11.1.7). A peroxidázok bármilyen forrásból származhatnak, beleértve a növényeket, baktériumokat, fonalas és más gombákat és élesztőket. Ezekre példa a tor-

ma-peroxidáz, szójahüvely-peroxidáz, mieloperoxidáz, laktoperoxidáz, *Arthromyces* és *Coprinus* peroxidázok. A kereskedelembe számos peroxidáz beszerezhető. A peroxidázok esetében elektron akceptorként hidrogén-peroxidra van szükség.

Polifenol-oxidázok (EC 1.10.3.1) például a tirozinázok és a katechol-oxidázok, mint az alignin-peroxidáz. Megfelelő polifenol-oxidázok állíthatók elő gombákból, állatokból vagy növényekből. A polifenol-oxidázok esetében elektron akceptorként oxigénre van szükség. A lakkázokat (EC 1.10.3.2) néha a polifenol-oxidázok közé sorolják, azonban külön csoportba is osztályozhatók, amelyeket néha p-difenol-oxidázoknak neveznek. A lakkázok származhatnak növényi forrásokból vagy mikróba, különösen gomba eredetű forrásokból, mint a *Trametes versicolor* fajták. Előnyösen rekombináns lakkázokat használunk. A lakkázok esetében elektron akceptorként oxigénre is szükség van.

A találmányunk szerinti eljárás viszonylag enyhe körülmények között, például 2 és 10 között pH értéken és 15 °C és 60 °C közötti hőmérsékleten végezhető (mindkettő függ az adott enzimtől vagy fémkomplextől). A reakcióközeg lehet vizes közeg vagy homogén kevert közeg, például alkohol/víz vagy éter/víz keverék vagy heterogén közeg, például víz és vízzel nem elegyedő szerves oldószer, például hidrofób éter, szénhidrogén vagy halogénezett szénhidrogén keveréke. Utóbbi esetben az enzim és/vagy a nitroxil és az oxidálószer a vizes fázisban és az alkohol-szubsztrátum és az aldehid vagy keton a szerves fázisban lehet jelen. Kivánt esetben fázistranszfer katalizátor alkalmazható. Az ilyen típusú reakció például szteroidok oxidálására alkalmas, mint a 19-hidroxi-szteroidok szelektív oxidációja és aldehid és/vagy karbonilcsoportok más érzékeny vegyületekbe, például ízesítő vegyületekbe történő bevitele. A reakcióközeg szí-

lárd/folyékony keverék is lehet, különösen amikor a nitroxil enzimét szilárd hordozón immobilizáljuk. Előnyösen heterogén reakcióközeget alkalmazunk, amikor a szubsztrátum vagy a termék viszonylag érzékeny, vagy amikor a terméknek a többi reagenstől való elválasztása nehézséget jelenthet.

Találmányunk kiterjed a szénhidrátok találmányunk szerinti eljárással előállítható új oxidációs termékeire és ezek származékaira is. Ilyenek például azok a poliszacharidok, amelyekben 100, előnyösen 50, sőt 25 monoszacharid egységre számítva legalább egy hidroximetil-csoport karbaldehydcsoporttá van alakítva, amely hemiacetál vagy hasonló formában is lehet, azzal a megkötéssel, hogy mindegyik molekula átlagosan legalább egy karbaldehydcsoportot tartalmaz az oligo- vagy poliszacharid redukáló végén (hemiacetál formában) lévő aldehidydcsoporton kívül. Amikor a szénhidrát egy keményítő, akkor az oxidációfok legalább egy karbaldehydcsoport 25 anhidroglükóz egységre számítva. A karbaldehydcsoport előnyösen a lánc egységekben (alapvázban) van jelen és nem az elágazó egységekben. Ebbe nem számít bele az a 100 (50, 25) egységre számított legalább egy karbaldehydcsoport, amely a terminális laktóz egységből származik, utóbbi galaktóz oxidáz oxidációjával állítható elő. Az új termékek például a glikozid-származékok, azaz olyan termékek, amelyek az acetállá alakított végcsoport mellett legalább egy karbaldehydcsoportot tartalmaznak, utóbbi a nem-galaktóz hidroximetilén-csoportok oxidációjával állítható elő.

A találmányunk szerinti termékekben a karbaldehydcsoportot hordozó monoszacharid gyűrűk túlnyomórészt épek, és az aldehidydcsoportok száma nagyobb, előnyösen kétszer nagyobb, mint a (nem karboxialkil-csoportokkal bevitt) karboxilcsoportok száma. Ezek a termékek a szakirodalomban ismert oxidációs eljárásokkal nem ál-

líthatók könnyen elő, mivel ezek is legalább részben továbboxidálódnak karboxilcsoporttá. Az egyetlen túlnyomórészt aldehidcsoportot tartalmazó közönséges szénhidrát-származék a keményítő, a cellulóz és hasonló perjodát-típusú oxidációs terméke, amelyben az aldehidcsoportot hordozó gyűrűk fel vannak nyílvá. A találmányunk szerinti aldehid-szénhidrátok előnyösen nem cellulóz-típusúak. A találmányunk szerinti eljárással előállítható termékek az aldehidcsoportok mellett más funkciócsoportokat, különösen további oxidációból vagy karboxialkilezésből (például klórecetsavas reakcióból) származó karboxilcsoportokat tartalmazhatnak.

A találmányunk szerinti új származékok jól alkalmazhatók sűrítőszerként, viszkozitást növelő szerként, emulziók stabilizálására és hasonlókra és különösen jól alkalmazhatók kiindulási anyagként további funkciócsoportok bevitele céljából, például egy aldehid-funkciócsoport kapcsolására alkalmas alkoholokkal, aminokkal vagy más anyagokkal. Ezek az anyagok például térhálósítószer (diaminok, diolok és hasonló), amelyek szénhidrátok térhálósítására vagy aminosavak, fehérjék, aktív csoportok és hasonló kapcsolására használhatók.

A találmányunk szerinti eljárás kiterjed biopolimerek, például keményítő vagy pamut-cellulóz, módosítására használható származékok előállítására (például textilszínezés, textilszálak erősítése vagy bolyhosodás gátlása) vagy viszkozitás vagy más fizikai vagy kémiai tulajdonságok megváltoztatására, például ehető rostok, mint a fruktánok, a mannánok, a cellulóz és hasonló módosítására is.

A találmányunk szerinti megoldás kiterjed a fent ismertetett aldehid-szénhidrátok például aminokkal történő kapcsolásával, különösen redukzív aminálásával előállított származékokra, amelyek a mellékelt igénypontokban meghatározott szénhidrátok imino- és amino-

-származékainak előállítására alkalmasak. Az aldehid-karbohidrátok hidroxil-funkcióscsoportokat tartalmazó vegyületekkel, például glikolsavval acetállá alakíthatók további származékok előállítása céljából.

Példák

Általános ismertetés

Az uronsavtartalmat (hexopiranóz egység 6-COOH-csoportja) Blumenkranz és munkatársai által ismertetett eljárás szerint határozzuk meg [Anal. Biochem. 54, 484 (1973)] koncentrált kénsavban 0,0125 mol/l bórsav alkalmazásával, amelyhez 3-hidroxibifenilt adunk és 520 nm-en meghatározzuk az extinkciót.

Az aldehidtartalmat vagy szubsztraktív módszerrel határozzuk meg (az uronsavtartalom meghatározása aldehid-klorittal és hidrogén-peroxiddal végzett oxidáció előtt és után) vagy oly módon, hogy hidroxilamin-hidrokloridot adunk hozzá, így oximot állítunk elő, majd az egyensúly beállta után a sósavat visszatitráljuk vagy ^{13}C NMR spektroszkópiás vizsgálatot végzünk (az aldehid C6 jelének intenzitását az anhidroglükóz egység C1 vagy az oxim C6 (C=N) intenzitásához viszonyítjuk).

1. Példa

6-Aldehid-keményítő előállítása torna-peroxidáz alkalmazásával

2 g keményítőt zselatinizálunk 100 ml vízben 100 °C-on. A kapott oldatot 22 °C-ra hűtjük. Ehhez az oldathoz 25 mg (0,13 mmol) TEMPO-t és 40 mg peroxidázt (HRPO) adunk. A kémhatást 0,1 mol/l-es ecetsavval pH 5 értékre állítjuk be. Cseppenként 2 ml/óra sebességgel 1,5 ml hidrogén-peroxid-oldatot adunk hozzá (30 % 50 ml-ben). A pH beállítására nincs szükség. 25 óra elteltével a mintát hidroxil-ammónium-klorid hozzáadásával analizáljuk. Indirekt analízis szerint 30 % C6-aldehid-keményítő képződik, amelyet ^{13}C NMR

vizsgálattal megerősítünk.

2. Példa

Pullulán lakkázzal végzett oxidációja

1,84 g pullulán (11,5 mmol anhidroglükóz egység), 17 mg *Trametes versicolor* lakkáz VIIIb (*E.coli*-ban expresszáva, Wacker Chemie) és 25 mg TEMPO 100 ml vízzel készült oldatán oxigéngázt buborékoltatunk át. Az oldat kémhatását pH 6,1 értékről 24 óra alatt 4,5 értékre csökkentjük. Az oldat aldehidtartalma hidroxilamin-hidrokloriddal végzett reakcióval meghatározva 1,1 mmol. Az uronsavtartalom 24 %. Az aldehidcsoportok karbonsavcsoportokká történő oxidálása céljából az oldatot nátrium-klorittal és hidrogén-peroxiddal kezeljük. Az uronsavval végzett kezelés után 32 %-ra emelkedik. Az oxidálható csoportok alapján a kitermelés rendre 36 % és 48%. Az oldatot etanolba öntjük. Fehér csapadék képződik, amelyet 1 nap után szűréssel összegyűjtünk és vákuumban szárítunk. Az anyag uronsavtartalma 25 %.

3. Példa

Pullulán lakkázzal végzett oxidációja

1,84 g pullulán (11,5 mmol) 100 mg 4-acetamido-TEMPO és 18 mg lakkáz (*T. versicolor*) felhasználásával oldatot készítünk. Az elegyet 0,05 mol/l nátrium-acetát/ecetsav pufferrel puffereljük. Az oldat kémhatása kezdetben pH 6,1. Ezt az elegyet egy zárt rendszerben oxigéngázzal érintkeztetjük. 1 nap reakcióidő után 24 ml oxigén fogy el. Az eredeti pH érték visszaállítására 2 ml 0,5 mol/l-es nátrium-hidroxidot adagolunk. A reakciót 1 napig tovább folytatjuk, ami 20 ml oxigéngáz fogyasztást eredményez. A végső pH 5,1. A pH-t ismét beállítjuk 1,2 ml 0,5 mol/l-es nátrium-hidroxid adagolásával. 15 mg lakkázt adunk hozzá, és a reakciót 2 napig hagyjuk végbemenni. Ezen időtartam után a kémhatás pH 4,5, és 30 ml oxigén fogy

el. A kémhatás pH 6 értékre történő visszaállítása céljából 0,5 nátrium-hidroxidot kell adagolni. Az oldathoz 0,2 ml 30 tömeg%-os hidrogén-peroxidot és 250 mg nátrium-kloritot adunk. 1 nap reakcióidő után meghatározzuk az uronsavtartalmat. A nátrium-klorittal végzett oxidáció előtt az uronsav kitermelése 550 mg (26 %) és utána 695 mg (33 %).

4. Példa

TEMPO nitrozónium-sójának előállítása lakkáz alkalmazásával

A TEMPO nitrozóniumion oldatát lakkázzal állítjuk elő az alábbiak szerint. 6,9 g TEMPO-t oldunk 1l fél-vízben. 200 mg lakkáz VIIIb-t (T.vesicolor, Wacker) szuszpendálunk 20 ml fél-vízben. Az enzimoldatot 10 percig keverjük, majd a felülúszót 5 percig 1500 x g értéken centrifugáljuk és P6 oszlop alkalmazásával sótlanított. A sótlanított anyagot a TEMPO-oldathoz adjuk. Körülbelül 150 perc alatt statikus pH körülmények között pH 5 értéken szobahőmérsékleten levegőztetjük. A TEMPO 91 %-a nitrozóniummá alakul, amelyet 100,8 ml 0,4 n sósav fogyasztásával határozunk meg, és a sárga szín narancssárgább színűvé válik (az E480/E430 arány körülbelül 0,3-ról 1 értékre nő).

5. Példa

Keményítő oxidálása nitrozónium-só és UF membrán rendszer alkalmazásával

A 4. példa szerint előállított nitrozónium-oldatot 0,2 mol/l-es acetáttal puffereljük pH 4,5 értéken. 2 g természetes burgonyakeményítőt zselatinizálunk 100 ml vízben, és összekeverjük 100 ml pufferelt nitrozónium-oldattal. A keveréket 200 ml keverővel ellátott UF edénybe öntjük (5kD határérték). Az edénybe szobahőmérsékleten 20 °C-on 0,5 ml/perc sebességgel körülbelül 800 ml nitrozónium-

oldatot szivattyúzunk. A permeátum azt jelzi, hogy a nitrozóniumion 50 %-ban visszaalakul TEMPO-vá (E480/E430 arány alapján). Ezen kezelés után a keményítő uronsavtartalma 38 %-nak mutatkozik.

6. Példa

Keményítő konverziója oxigén/lakkáz/TEMPO ciklus alkalmazásával

Lintner burgonyakeményítőt (Sigma S-2630) vízben zselatinizálva keményítő-oldatot állítunk elő. A pH-t 0,2 mol/l borostyánkősav/szukcinát puffer adagolásával beállítjuk. TEMPO-t vagy 4-acetamido-TEMPO-t (4acmT) adunk hozzá. (A TEMPO bizonyos körülmények között a keményítővel csapadékot képez, ami az eljárás során feloldódik.) *E. coli*-ban (Wacker Chemie) expresszált *Trametes versicolor*ból származó lakkáz VIIIb-t szuszpendálunk 10 mg/ml koncentrációban 0,2 mol/l-es borostyánkősav pufferben pH 6 értéken. 5 percig 1500 g értéken centrifugáljuk, majd 1 ml felülúszóra számítva 10 mg lakkázt adunk hozzá. Az oldathoz adagolt oxigén mennyiségét növeljük a nyomás alá helyezett és kevert A és B edényekben. Mindkét edény körülbelül 100 ml-t tartalmaz. A gázfázissal érintkező felület az A edényben 70 cm² és a B edényben 32 cm². A kísérleti körülményeket és a C₆-helyzetben végbemenő oxidációra (aldehid vagy karbonsav) vonatkozó eredményeket az 1. és 2. táblázatban foglaljuk össze. A reakciókörülmények lényeges paraméterei a következők:

az oldathoz adagolt oxigén, pH, hőmérséklet, TEMPO, enzim és keményítő koncentráció.

Az uronsavképződést Blumenkranz szerint követjük. Az aldehidképződést az uronsavvá történő oxidáció után az alábbi körülmények között határozzuk meg: 5 ml mintához (20 g/l keményítő) 0,095 ml 3 %-os hidrogén-peroxidot és 0,5 ml 20 mg/ml koncentráci-



őjű nátrium-kloritot adunk. Az uronsavtartalmat szobahőmérsékleten 16 óra elteltével meghatározzuk.

1-1. Táblázat

Az A edényben vizsgált hatás összefoglalása

levegő (bar)	O ₂ (bar)	Kemé- nyítőpor (Lintner) (g/l)	Lakkáz (mg/100 m)	pH	TEMPO (g/l)	4acmT ¹ (%)	T (°C)	Idő (óra)	%COO H	%ald. vagy hemi ²
2		10	100	6	1		25	45	73,4	nd
1,5		10	100	5		5	25	45	54,2	nd
	4	10	100	6	4		30	15	94,9	nd
2		10	100	6	4		30	15	100,0	nd
	1	10	100*	5,3		6	30	15	78,8	nd
2		10	10	6	4		30	20	60,3	4,9
	1	10	10*	6	4		30	20	50,0	5,1
	4	10	10	5,3		4	30	20	30,5	11,9
	4	20	10*	4,5		4	30	20	19,7	12,0
2		20	10	4		4	30	20	11,5	12,5

* az enzimet az edénybe 20 óra alatt szivattyúzzuk,

¹4acmT=4-acetamido-TEMPO

²aldehid vagy ennek félacetálja

1-2. Táblázat

A B edényben vizsgált hatás összefoglalása

O ₂ (bar)	Keményítőpor (Lintner) (g/l)	Lakkáz (mg/100m)	pH	TEMPO (g/l)	4acmT ¹ (%)	T (°C)	Idő (óra)	%COOH	%ald. vagy hemi ²
4	10	100	6	4		30	15	94,9	nd
4	10	10	5,3		4	30	20	30,5	11,9
6	20	1	6		4	40	20	7,1	4,2

7. Példa

Pullulán TEMPO/Mn/H₂O₂ rendszerrel végzett oxidációja

25 ml vízben 250 mg pullulánt és 20 mg TEMPO-t oldunk. Ehhez az oldathoz 25 mg manganát-nitrátot, majd 100 µl 3 tömeg%-os hidrogén-peroxid-oldatot és 5 ml 0,05 bipyridin-oldatot adunk. A reakciót pH 6,5 értéken végezzük. Az 1. napon 60 mg (1,8 mmol) hidrogén-peroxidot adunk hozzá. 1 nap múlva 25 mg uronsav képződik. A 2. napon 30 mg hidrogén-peroxidot adunk hozzá. Az uronsav mennyisége 50 mg-ra nő. Az aldehidcsoportokat hidrogén-peroxid/nátrium-klorit rendszerrel karbonsavvá alakítjuk át, a tartalom 90 mg-ra emelkedik (D.O. 60 %)

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás primer alkohol oxidálására egy nitroxil-származék és egy oxidálószer alkalmazásával, **azzal jellemezve**, hogy a primer alkoholt egy oxidálásra képes enzim jelenlétében és/vagy egy fém-komplex jelenlétében oxidáljuk vizes közegben vagy víz és egy alkohol, egy éter vagy egy vízzel nem elegyedő szerves oldószer keverékében.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy nitroxil-származékként egy di-terc-nitroxil-származéket, előnyösen 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilt (TEMPO) használunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy oxidációra képes enzimként oxidoreduktázt használunk.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy enzimként egy peroxidázt, különösen torna-, szójabab-, liginin-peroxidázt vagy mielo- vagy lakto-peroxidázt és oxidálószerként hidrogén-peroxidot használunk.

5. A 3. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy enzimként polifenol-oxidázt vagy lakkázt és oxidálószerként oxigént használunk.

6. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy enzimként hidrolázt, előnyösen fitázt vagy lipázt használunk egy fémvegyület jelenlétében.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy egy szénhidrátban lévő primer alkoholt oxidálunk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy szénhidrátként α -glükánt vagy fruktánt vagy ezek származékát használjuk.

9. A 7. vagy 8. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**,

hogy olyan karbonilcsoportot tartalmazó szénhidrátot állítunk elő, amely 25 monoszacharid egységre és egy közepes molekulára számítva legalább egy karbaldehydcsoportot hordozó gyűrűs monoszacharid láncot tartalmazó csoportot tartalmaz.

10. A 7-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy szénhidrátként hidroxialkilezett szénhidrátot vagy glükozidot vagy glükonsavat használunk.

11. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy szteroid-származékban lévő primer alkoholt oxidálunk.

12. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy textilszálakban lévő primer alkoholt oxidálunk.

13. Oxidált szénhidrát, amely szénhidrát olyan glükán, mannán, galaktán, fruktán vagy kitin-típusú diszacharid, oligoszacharid vagy poliszacharid vagy szénhidrát-glikozid vagy ezek kémiai származékai, amelyek 25 monoszacharid-egységre számítva és közepes molekulára számítva legalább egy gyűrűs monoszacharid láncot tartalmazó csoportot tartalmaz.

14. A 13. igénypont szerinti oxidáló szénhidrát, amely közepes molekulára számítva legalább 5 monoszacharid egységet tartalmaz.

15. A 13. vagy 14. igénypont szerinti oxidált szénhidrát, amely 50 monoszacharid egységre számítva és egy közepes molekulára számítva 1 és 50 közötti számú gyűrűs monoszacharid láncot tartalmazó csoportot tartalmaz.

16. A 13-15. igénypontok bármelyike szerinti szénhidrát származék, amely származékban a karbaldehydcsoportok legalább egy része $-\text{CH}=\text{N}-\text{R}$ vagy $-\text{CH}_2-\text{NHR}$ általános képletű csoporttá van alakítva, amely képletekben R jelentése hidrogénatom, hidroxil- vagy aminocsoport vagy R^1 , OR^1 vagy NHR^1 általános képletű csoport,



amely csoportokban R^1 jelentése 1-20 szénatomos alkil-, 1-20 szénatomos acilcsoport, szénhidrát maradék vagy szénhidrát maradékhoz kapcsolódó vagy kapcsolódni képes csoport.

17. A 13-15. igénypontok bármelyike szerinti szénhidrát-származék, amelyben a karbaldehydcsoportok legalább egy része $-CH(OR^3)-O-CH_2-COOR^2$ vagy $-CH(-O-CH_2-COOR^2)_2$ általános képletű csoporttá van átalakítva, amely képletekben R^2 jelentése hidrogénatom, fémkation vagy adott esetben helyettesített ammóniumcsoport és R^3 jelentése hidrogénatom vagy a szénhidrát dehidrogénezett hidroxilcsoportjának oxigénatomjához kapcsolódó kötés.

18. A 13-17. igénypontok bármelyike szerinti szénhidrát, amely egy karboxil- és/vagy egy karboximetil-csoportot is tartalmaz.

Mics. bne.
pny.

2002 FEBR 08

A meghatalmazott:


DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
47.

Dr. Fehérvári Flóra
szabadalmi ügyvivő