HU000229651B1

(19) **HU**

(11) Lajstromszám: **229 651**

(13) **B1**

MAGYARORSZÁG
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 02 01850**
(22) A bejelentés napja: **2000. 06. 17.**

(40) A közzététel napja: **2002. 09. 30.**
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlöny és Védjegyértesítőben: **2014. 03. 28.**

(51) Int. Cl.: ***C12N 15/55*** *(2006.01)*
C12N 9/80 *(2006.01)*
C12P 13/04 *(2006.01)*
C12P 41/00 *(2006.01)*
C12N 11/08 *(2006.01)*

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:
PCT/EP 00/05586
(87) A nemzetközi közzétételi szám:
WO 0105982

(30) Elsőbbségi adatok:
199 33 362.9 **1999. 07. 20.** **DE**

(72) Feltaláló(k):
Bartsch, Klaus, Königstein (DE)

(73) Jogosult(ak):
Bayer CropScience AG, Monheim (DE)

(74) Képviselő:
DANUBIA Szabadalmi és Jogi Iroda Kft., Budapest

(54) **Eljárás L-aminosavak előállítására racém N-acetil-D,L-származékaikból izolált rekombináns enzimek segítségével végzett enzimes rezolválás útján**

(57) Kivonat

A találmány tárgya eljárás L-PPT előállítására racém N-acetil-D,L-PPT-ből, oly módon, hogy
a) az N-acetil-L-PPT-t Stenotrophomonas sp. mikroorganizmusból izolált rekombináns hippurát-hidroláz deac1 enzim segítségével szelektív módon dezacetilezzük, míg az N-acetil-D-PPT nem dezacetileződik,
b) a racém N-acetil-D,L-PPT nagyobb, mint 50 mmól - 1500 mmól koncentrációban fordul elő,
c) a kapott dezacetilezett L-PPT-t a nem dezacetilezett N-acetil-D-PPT és/vagy a nem teljesen dezacetilezett N-acetil-L-PPT mellől preparatív úton elválasztjuk, és ahol
d) a dezacetilezett L-PPT tér/idő-hozama 55 óra reakcióidőnél legalább 69 mg dezacetilezett L-PPT/g biokatalizátor/h.

ELJÁRÁS L-AMINOSAVAK ELŐÁLLÍTÁSÁRA RACÉM N-ACETIL-D,L-SZÁRMAZÉKAIKBÓL IZOLÁLT REKOMBINÁNS ENZIMEK SEGÍTSÉGÉVEL VÉGZETT ENZIMES REZOLVÁLÁS ÚTJÁN

Az L-PPT (L-foszfinotricin) nem-proteinogén aminosav rezolválás útján történő, nagy tisztaságot és nagy hozamot biztosító előállítását eddig csak fenacetil--foszfinotricin *Escherichia coli*-ból származó penicillin-G-acilázzal végzett bontásával írták le (DE-A-3048612). A fenacetil-PPT szintézise azonban az N-Ac-PPT-hez viszonyítva bonyolult és költséges. A penicillin-G-aciláznak viszont nincs fajlagossága alifás acilcsoportokra, így N-Ac-PPT-re sem. Más ismert acilázok szintén nem vagy csak csekély mértékben fajlagosak az N-Ac-PPT szubsztrátumra, eddig csak mikrobiológiai transzformációkban alkalmazták azokat, az enzimek tisztítása nélkül (például DE-A-2939269). Emiatt csak nagyon csekély tér/idő-hozamok voltak elérhetők. Az EP-A-0382113 szabadalmi bejelentésből ismert az N-Ac-PPT-karbonsavészterek aciláz I segítségével végzett L-fajlagos bontása. Azonban ennek az enzimnek sincs fajlagossága a szabad karbonsavra, ezért a szubsztrátum előállításában külön szintézislépésként észterezést kell végezni. Az EP 0 358 418 kizárólag a 2-izomer átalakítását ismerteti N-szubsztituált karbonil-D,L-aminosavaknál a szubsztituált karbonilcsoport aciláz-aktivitással rendelkező mikroorganizmusokkal végzett sztereoszelektív eliminálásával, ahol a reakció csekély tér/idő-hozammal valósítható meg.

A WO 98/27201 N-acetil-aminosavakra, előnyösen N-acetil-foszfinotricinre (N-Ac-PPT) fajlagos mikróbás dezacetilázok talajmintákból történő izolálását, valamint a *Stenotrophomonas sp.* és *Comamonas acidovorans* mikroorganizmusokból származó megfelelő gének klónozását írja le.

A talált szekvencia homológiák és a szubsztrátum fajlagossággal kapcsolatos kísérletek alapján bebizonyosodott, hogy a leírt dezacetilázok a hippurát-hidrolázok (EC 3.5.1.32) csoportjához tartoznak, amelyek természetes szubsztrátuma az N-benzoil-glicin, azaz egy, aromás N-acilcsoportot tartalmazó aminosav-származék. Ezért volt érdekes, hogy ezek az enzimek N-acetilezett aminosavakat, különösen N-acetil-foszfinotricint is elfogadnak szubsztrátumként, azaz alifás N-acilcsoportot tartalmazó aminosav-származékokat. A GB 2 031 896 és DE-A-2717440 szabadalmi bejelentésekből ismert, hogy a racém foszfinotricin herbicid hatása csak az L-enantiomertől (L-PPT) származik. Ezzel összefüggésben érdekes volt, hogy a talált dezacetilázok csak az N-acetil-PPT-nek, valamint néhány proteinogén aminosav N-

-acetil-származékainak L-enantiomerjét bontják nagy fajlagossággal. Ezért az említett enzimek kiválóan alkalmasak L-aminosavak, különösen az L-foszfinotricin herbicid hatóanyag előállítására racém N-acetil-származékaikból a rezolválás elvén, ahogy ezt például az EP-A-0304021, GB 2 031 896 és DE-A-3048612 szabadalmi leírások tárgyalják. A három említett publikációból leírt eljárások lényeges hátrányai azonban, hogy (1) a szubsztrátum koncentrációja csak csekély lehet (DE-A-2939269 szerint 0,5 %), így a műszaki alkalmazhatóság megkérdőjelezhető, hogy (2) nem izolált enzimek kerülnek alkalmazásra, amiért a mellékreakciók és a tisztitási lépések problémája nem vagy csak magas költségek árán oldható meg, végül (3), hogy költséges kiindulási anyagok szükségesek (DE-A-3048612 esetén).

A találmány feladata egy új dezacetiláz (mint a WO 83/27201 leírásban már jellemezett) alkalmas formában és mennyiségben történő exprimálása, majd ezen enzim segítségével L-PPT nagy hozammal és nagy enantiomer tisztasággal történő előállítása volt a kémiailag igen egyszerűen hozzáférhető racém N-acetil-D,L-PPT rezolválása útján.

Amennyiben az enzimes aktivitás már megközelítően ismert, és az enzimet kódoló nukleinsav-szekvenciát már klónozták, az első tevékenység abban áll, hogy a nukleinsav fragmenst alkalmas vektorba juttatjuk, majd vagy alkalmas baktériumtörzzsel túltermelést végezünk és/vagy a túlexprimálás után kapott proteint izoláljuk. Az így elkülönített enzimet vagy közvetlenül az enzimes reakcióban használhatjuk fel vagy alkalmas kapcsolócsoportokkal mátrixhoz rögzítjük.

Egy első enzimes teszt ajánlatos annak megerősítésére, hogy a kívánt reakció lezajlik-e avagy sem. Az összes további lépés a paraméterek, így a reakciófajlagosság (kiindulási anyagra és termékre vonatkoztatva), a reakciósebesség, reakcióhatékonyság, az alkalmazott enzim felezési idejének és a lehetséges szubsztrátum-koncentráció optimálását szolgálja. Amennyiben egyes paraméterek nem felelnek meg pontosan a követelményeknek, alkalmas változtatásokat lehet eszközölni az enzimet kódoló nukleinsav-szekvencián, aminek következménye a természetes enzim további optimálása.

Az alkalmazott dezacetiláz klónozását a WO 98/27201 már leírta. A megfelelő deac1 dezacetilázt kódoló nukleinsav fragmenseket az 1. példában leirtak szerint megfelelő expressziós vektorokba átklónozták, így az egyértelmű szubsztrátum-fajlagosság kellő mértékét és a mellékreakciók hiányát biztosítva.

A találmány tárgya eljárás L-PPT előállítására racém N-acetil-D,L-PPT-ből. Az eljárásra jellemző, hogy

a) az N-acetil-L-PPT-t izolált rekombináns hippurát-hidroláz deac1 enzim segítségével szelektív módon dezacetilezzük, míg a megfelelő N-acetil-D-PPT nem dezacetileződik,

b) a racém N-acetil-D,L-PPT nagyobb, mint 50 mmól – 1500 mmól koncentrációban fordul elő,

c) a kapott dezacetilezett L-PPT-t a nem dezacetilezett N-acetil-D-PPT és/vagy a nem teljesen dezacetilezett N-acetil-L-PPT mellől preparatív úton elválasztjuk, és ahol

d) a dezacetilezett L-PPT tér/idő-hozama 55 óra reakcióidőnél legalább 69 mg dezacetilezett L-PPT/g biokatalizátor/h.

A találmány különösen eljárás L-foszfinotricin (L-PPT) előállítására N-acetil--D,L-foszfinotricinből izolált rekombináns enzimek segítségével végzett enzimes racemát bontás útján.

A találmány továbbá az előállított rekombináns deac1 biokatalizátorként alkalmazására vonatkozik. Ezzel a biokatalizátorral a megfelelő reakciókat nagy tér/idő-hozam és nagy szubsztrátum-koncentráció mellett lehet lejátszatni, különösen ha a rekombináns deac1 immobilizált formában alkalmazzuk.

A találmány továbbá a fenti eljárás mintegy 25 °C és 65 °C, előnyösen mintegy 30 °C és 45 °C, különösen előnyösen mintegy 35 °C és 40 °C közötti hőmérsékleten történő megvalósítására vonatkozik.

A találmány továbbá a fenti eljárás mintegy 10 mmól és 1500 mmól közötti, előnyösen 50 mmól-nál nagyobb, különösen előnyösen 250 mmól-nál nagyobb, a legelőnyösebben 500 mmól-nál nagyobb szubsztrátum-koncentráció mellett történő megvalósítására vonatkozik.

A találmány továbbá a fenti lépések segítségével előállított L-PPT elválasztására is vonatkozik a megfelelő N-acetil-D-PPT-től és a nem teljesen reagált N-acetil-L-PPT-től.

Az elválasztás történhet például savas ioncserélőn végzett kromatografálással vagy az N-acetil-D,L-PPT szerves oldószerrel, például metil-izobutil-ketonnal végzett extrahálásával, amelynek során az előállított L-PPT átmegy a vizes fázisba és annak szárításával koncentrálható.

Példák

1. A *deac*-enzim mint rekombináns protein termelése *Escherichia coli*-ban

A *Stenotrophomonas sp.* mikroorganizmusból származó, N-Ac-PPT-re fajlagos dezacetilázt kódoló *deac*-1 szerkezeti gént 1,4 kb BamHI/SalI-fragmensként (WO 98/272001) a pQE30 His-Tag expressziós vektor [gyártja: Quiagen cég; Quiaexpress Kit, IV. típus, 32149. katalógusszám, Stüber és mtsai (1990): Immunological Methodes c. gyűjtőmunkában, Lefkovits, I. és Pernis, B. kiadók, IV. Bd., Academic Press, New York, S. 121-152] *Bam* HI/*Sal* I-vágóhelyébe klónoztuk.

A molekulabiológiai műveleteket szabvány jegyzőkönyvek szerint végeztük, mint például Ausubel és mtsai (1995): Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons, New York. Az így előállított szerkezetet a Quiagen által ajánlott *E. coli* M15 baktériumtörzsbe transzformáltuk, és a rekombináns klónokat 100 µg/ml ampicillin és 25 µg/ml kanamicin mellett szelektáltuk. A rekombináns fuziós protein expresszióját a mmól IPTG adagolásával indítottuk. Indukálás után 4-5 órával a sejteket elkülönítettük és a protein feldolgozásáig –20 °C-on tároltuk.

Az indukált klónok sejtoldatának SDS/poliakrilamin-elektroforetikus feldolgozásával a His-Tag-*deac*-1 fúziós proteint 49 kDa járulékos sávként sikerült kimutatni.

A dezacetiláz fúziós protein enzimes aktivitását radioaktív assay segítségével mutattuk ki [^{14}C]-N-acetil-L-PPT-t szubsztrátumként alkalmazva. Az indukált tenyészetek 200-200 µl-jéhez 0,5 % toluolt és 0,5 % etanolt adunk és a sejteket 37 °C-on 30 percen keresztül permeábilizáljuk. A sejtpelleteket (pelletként) 25 µl 0,1 mmól [^{14}-N-acetil-L-PPT, 10 mmól NaCl, 10 mmól Na-foszfát, pH = 7,5 elegyében szuszpendáltuk és 37 °C-on 1 órán át inkubáltuk. A keletkezett [^{14}C]-L-PPT mennyiségének meghatározására mindegyik mintából 5 µl felülúszót HPTLC-cellulóz-lemezen (Merck) n-propanol és 25 %-os ammónia 3:2 arányú elegyével vékonyréteg-kromatográfiásan elemeztük. A radioaktív sávokat autoradiográfiásan röntgenfilmen jelenítettük meg.

Az enzimreakció mennyiségi felmérésére a kísérleti mintákat radio-HPLC segítségével Spherisorb® SAX elválasztó oszlopon mértük (futtatóelegy: 5 mmól KH_2PO_4, 10 % metanol, pH = 1,92, áramlási sebesség: 0,5 ml/perc). E között a körülmények között a [^{14}C]-L-PPT 4,5 percnél, [^{14}C]-N-acetil-L-PPT 6,5 percnél eluálódik.

A legnagyobb N-acetil-L-PPT-fajlagos dezacetiláz-aktivitással rendelkező expressziós klón a dezacetiláz-proteint - félig kvantitatív meghatározás szerint - az összprotein kb. 10 %-os részeként termeli. Ezt a klónt az enzimtisztításra és a később leírandó biotranszformációra használtunk.

2. A dezacetiláz affinitáskromatográfiás tisztítása

Az 1. példában leírt klónozás után pQEDEAC-nak átkeresztelt expressziós törzsből származó dezacetiláz-proteint a Quiagen jegyzőkönyv (Quiaexpress-Kit) szerint nikkel-nitrilotriacetát-mátrixon (Ni-NTA) natív körülmények között végzett affinitáskromatográfiás módszerrel különítettük el a következők szerint. A pQEDEAC expressiós törzs 800 ml tenyészetét az 1. példa szerint fermentáltuk, majd indukáltuk. Az elkülönített sejtpelletet (4 g) 20 ml lízis-pufferben szuszpendáltuk, majd ultrahanggal feltártuk. Centrifugálás után a tiszta proteinlizátumhoz (120 mg összprotein) 4 ml 50 %-os Ni-NTA-szuszpenziót adtunk a His-Tag fúziós protein megkötése céljából, utána az anyagot enzimes oszlopra juttattuk. Az affinitásmátrixot 10 térfogatnyi mosópufferrel mostuk, majd 4 ml eluáló pufferrel eluáltuk. Az affinitástisztítás ellenőrzésére a sejtfeltárás, a mosóoldat és az eluátum felülúszóját SDS/poliakrilamidgél elektroforetikus módszerrel elemeztük. A különböző proteintartalmú frakciók dezacetiláz-aktivitását az 1. példában leírt radioaktív assay segítségével határoztuk meg (9 µl proteinoldat + 1 µl 1 mmólos [^{14}C]-N-acetil-L-PPT, reakciókörülmények: a fentiek). Az enzim mennyiségi meghatározásához a proteinfrakcióhoz 50 mmól N-acetil-D,L-PPT-t (9 µl proteinoldat + 1 µl 500 mmólos N-acetil--D,L-PPT) adtunk és a mintát 37 °C-on 30 percen át inkubáltuk. A keletkezett PPT-t utána az aminosav-analizátorban (Biotronic LC 5001) mértük.

A sejtfeltárás után kapott nyers extraktumban a protein fajlagos dezacetiláz-aktivitása 3 nkat/mg protein volt (1 nkat = 1 nmól szubsztrátum/másodperc). Az expressziós törzs 800 ml tenyészetéből affinitáskromatográfiásan 10 mg His-Tag *deac* fúziós proteint sikerült elkülöníteni, amelynek fajlagos aktivitása 20 nkat/mg protein, tisztasága kb. 80 %-os volt.

3. A dezacetiláz szubsztrátum fajlagossága és sztereoszelektivitása

A *deac*1-protein szubsztrátum- és sztereo-fajlagosságának vizsgálatára 5-5 µg tisztított enzimet 20 µl-es mintákban (10 mmól NaCl, 10 mmól Na-foszfát, pH = 7,5) az 1. táblázatban felsorolt N-acetil-L-aminosavak, ill. a megfelelő D-enantiomerek 25-25 mmól-jával inkubáltuk. Összehasonlításként hippursavat (N-benzoil-glicin), a dezacetiláz természetes szubsztrátumát alkalmaztuk. A mintákat 1 órán át 37 °C-on

inkubáltuk, utána az aminosav-analizátorban (Biotronic LC 5001) megmértük a keletkezett szabad aminosavat. Az 1. táblázat a különböző szubsztrátumok L-enantiomerje esetén mért aktivitásokat tartalmazza. Hippursav és N-Ac-L-PPT mellett a *deac*1-enzim természetes aminosavak egész sorának az N-acetil-származékait bontja, így különösen N-Ac-L-glutaminsavat, N-Ac-glicint, N-Ac-L-hisztidint, N-Ac-L-ornitint, N-Ac-L-leucint, N-Ac-L-glutamint és N-Ac-L-fenilalanint. Mindegyik esetben az enzim csak az L-enantiomerrel szemben volt aktív, a D-vegyületet egy esetben sem bontotta. A fentiekben fel nem sorolt aminosavak esetén az N-acetil-L--származék bontása csekély volt vagy egyáltalán nem következett be (lásd 1. táblázat).

1. táblázat: a *deac1*-enzim szubsztrátum fajlagossága

Szubsztrátum[1]	**Relatív aktivitás**[2] **[%]**
Hippursav	100
N-Ac-L-foszfinotricin	43
N-Ac-L-ornitin	37
N-Ac-L-metionin	0
N-Ac-L-triptofán	0,4
N-Ac-L-fenilalanin	24
N-Ac-L-tirozin	11
N-Ac-L-glutaminsav	100
N-Ac-L-glutamin	30
N-Ac-glicin	59
N-Ac-L-hisztidin	43
N-Ac-L-leucin	33
N-Ac-L-valin	2
N-Ac-L-szerin	4
N-Ac-L-prolin	0

[1] Mindegyik vegyület esetén az L-enantiomer

[2] A hippursavval mért fajlagos aktivitást [nmól glicin $perc^{-1}$ x mg^{-1}] 100-nak tekintettük és a többi értéket erre vonatkoztattuk.

4. N-acetil-D,L-foszfinotricin rezolválása a *deac1*-termelőtörzs sejtjeivel végzett biotranszformáció útján

A pQEDEAC expressziós törzs 400 ml tenyészetét az 1. példában leírtak szerint fermentáltuk és indukáltuk. Az elkülönített sejteket 10 mmól NaCl-t tartalmazó 10 mmólos Na-foszfát-oldattal (pH = 7,5) mostuk és egy éjszakán át liofilizáltuk. Az így kezelt sejteket több héten keresztül 4 °C-on tároltuk, aminek során nagy fajlagos dezacetiláz-aktivitásuk megmaradt. A sejteket az alábbi kísérletekben biokatalizátorként alkalmaztuk.

A liofilizált sejtek 2-2 mg-ját az alábbi szubsztrátum-oldatokban (1 ml) szuszpendáltuk:

(1)	10 mM	N-acetil-D,L-PPT, dinátriumsó	(0,3 %)
(2)	50 mM	„	(1,3 %)
(3)	100 mM	„	(2,6 %)
(4)	250 mM	„	(6,7 %)
(5)	500 mM	„	(13,3 %)

A reakciópuffert (10 mM NaCl, 10 mM Na-foszfát, pH 8,0) tartalmazó mintákat rázógépen 100 $perc^{-1}$ frekvencia mellett 37 °C-on 48 órán át inkubáljuk. A hidrolízis reakció során keletkezett szabad PPT-t az aminosav-analizátorban (Biotronic LC 5001) határoztuk meg. Az eredményeket a 2. táblázatban adjuk meg. A reakcióternék enantiomer tisztaságát királis HPLC segítségével (elválasztó oszlop Chirex® (D) penicillamin (Phenomenex)) határoztuk meg, futtató elegyként $CuSO_4$ 2 mmólos, 10 %-os metanollal készített oldatát alkalmazva 0,5 ml/perc áramlási sebesség mellett. A detektálás fotometriásan történt 254 nm hullámhosszon. A megadott körülmények között az L-PPT referenciaoldata 17 percnél, a D-PPT-é 21 percnél eluálódik. Mindegyik mintában kizárólag L-PPT-t tudtunk kimutatni reakcióternékként. Az elért konverzió [termelt L-PPT/N-acetil-L-PPT a szubsztrátumban x 100] 100 % (az alacsonyabb, például 10 mmól, 50 mmól) szubsztrátum-koncentrációk esetén) és 66 % (a legnagyobb alkalmazott - 500 mmólos – szubsztrátum-koncentráció esetén) között volt.

2. táblázat: N-acetil-D,L-PPT rezolválása a szubsztrátum-koncentráció függvényében

Szubsztrátumoldat N-acetil-D,L-PPT [mM]	**Termékoldat* L-PPT [mM]**	**Konverzió L-PPT/N-acetil-D,L-PPT [%]**
10	5	100
50	25	100
100	48	96
250	108	86
500	164	66

* A biokatalizátor koncentrációja 2 mg/ml volt.

Az alábbi kísérletben a biokatalizátor koncentrációját emeltük és a szubsztrátum bontásának reakciókinetikáját rögzítettük. 13 mg liofilizált sejtet 1 ml szubsztrátum oldatban (500 mmól N-acetil-D,L-PPT-dinátriumsó /13,3 vegyes%-os), 10 mmól NaCl, 10 mmól Na-foszfát, pH = 8,0) szuszpendáltunk és a szuszpenziót rázógépen 100 $perc^{-1}$ frekvencia mellett 37 °C-on inkubáltuk. A keletkezett L-PPT meghatározására 55 órán keresztül időközönként 50 µl-es mintát vettünk a felülúszóból, a mintát centrifugáltuk és elemzésig –20 °C-on tároltuk. Az L-PPT reakciótermék kvantitatív meghatározását és az enantiomer tisztaság vizsgálatát a fent elírtak szerint végeztük. Az eredményeket a 3. táblázatban közöljük. A választott körülmények között az L-fajlagos bontás kb. 55 óra alatt befejeződött. A konverzió mintegy 90 %-os.

3. táblázat: az N-acetil-D,L-PPT rezolválásának reakciókinetikája

Reakcióidő [óra]	**L-PPT [mM]***
0	0
1	27,7
4	59,7
9	106,0
23	181,6
31	186,5
47	208,6
55	221,8

* A biokatalizátor koncentrációja 13 mg/ml volt

szubsztrátum koncentrációja: 500 mM N-acetil-D,L-PPT

5. A tisztított *deac1*-protein immobilizálása

A 2. példa szerint His Tag-fúziós proteinként tisztított enzimet a VINA-Epoxy Biosynth® (Riedel de Haen) polimer hordozóhoz rögzítettük, immobizált enzimmel elvégzendő reakciók érdekében. A *deac*-proteint ammóniumszulfátos kicsapással 15 mg/ml koncentrációra sűrítettük és egy éjszakán át 1 M Na-foszfát-oldattal (pH = 8,0) ellen dializáltuk. Szabványos kapcsolási reakcióhoz 10 mg proteint és 100 mg VINA-hordozót 2 napon keresztül lassan rázattuk szobahőmérsékleten. Utána az immobilizátumot lecentrifugáltuk, először immobilizáló pufferben, majd 50 mM Na-foszfát-oldatban (pH = 7,0) mostuk. Szabad epoxicsoportok blokkolására a hordozót szobahőmérsékleten egy órán keresztül 50 mmól 2-merkaptoetanolt tartalmazó, 7,0 pH-jú 50 mmólos Na-foszfát-oldatban inkubáltuk. A biokatalizátort 0,02 % Na-azidot tartalmazó 1 ml 5 mmólos Na-foszfát-oldatban (pH = 7,0) 4 °C-on tároltuk. A proteinkapcsolás meghatározására az oldat proteintartalmát Bradfort módszere szerint [Bradfort (1976), Anal. Biochem. 72:248-254] mértük immobilizálás előtt és után; a mosófolyadékok proteintartalmát is mértük. A dezacetiláz fajlagos aktivitását az 1. példában leírt radioaktív assay segítségével mértük immobilizálás előtt és után. A kapcsolás után a relatív enzimaktivitás az oldott protein értékének több, mint 90 %-a volt.

6. N-acetil-D,L-foszfinotricin rezolválása immobilizált *deac1*-enzimmel oszlopreaktorban

Egy g enzim-immobilizátumot (nedves tömeg) oszlopreaktorba juttattunk és különböző koncentrációjú szubsztrátum-oldatok rezolválásához használtunk biokatalizátorként különböző áramlási sebességek mellett. A szubsztrátum-oldatok N--acetil-D,L-PPT (diammóniumsó, 10 mM NaCl, 10 mM Na-foszfát, pH = 8,0) koncentrációját a 4. táblázatban adjuk meg. A reagáltatást 37 °C-on 10 napon keresztül végeztük. Az elreagált mennyiséget a kilépő oldat L-PPT tartalmának aminosav-elemzéssel és királis HPLC segítségével végzett meghatározás útján elemeztük (lásd 4. példa). Az eredményeket a 4. táblázatban adjuk meg A legnagyobb konverziót (83 %-ot) a legnagyobb szubsztrátum-koncentrációval (500 mM) és a szubsztrátum legkisebb áramlási sebességével (0,03 ml/perc) értük el. A tér/idő-hozam az áramlási sebességgel és a szubsztrátum-koncentrációval emelkedik, legnagyobb értéke 500 mM szubsztrátum-koncentráció és 0,3 ml/perc áramlási sebesség mellett 181 [mg L-PPT/g biokatalizátor / óra] volt. Az immobilizált dezacetiláz a kísérlet egész időtartama alatt

jó stabilitást mutatott, és 10 napos, 37 °C-os igénybevétel után kiindulási aktivitásának még kb. 80 %-ával rendelkezett.

4. táblázat: N-acetil-D,L-PPT rezolválása immobilizált deac1-enzimmel oszlopreaktorban

Szubsztrátum-oldat N-acetil-D,L-PPT [mM]	Áramlási sebesség [ml/perc]	Termékoldat L-PPT [mM]	Konverzió [%]	Tér/idő-hozam [mg L-PPT/g biokatalizátor x óra]*
100	0,1	29,7	59	39
	0,3	22,0	44	87
	0,5	13,8	28	91
250	0,1	38,4	31	50
	0,3	25,0	20	99
	0,5	18,1	14	119
500	0,1	71,1	28	93
	0,3	46,0	18	181
	0,5	26,3	11	173
500	0,03	208,2	83	82

* reakcióhőmérséklet 37 °C

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás L-PPT előállítására racém N-acetil-D,L-PPT-ből, *azzal jellemezve*, hogy

a) az N-acetil-L-PPT-t *Stenotrophomonas sp.* mikroorganizmusból izolált rekombináns hippurát-hidroláz deac1 enzim segítségével szelektív módon dezacetilezzük, míg az N-acetil-D-PPT nem dezacetileződik,

b) a racém N-acetil-D,L-PPT nagyobb, mint 50 mmól – 1500 mmól koncentrációban fordul elő,

c) a kapott dezacetilezett L-PPT-t a nem dezacetilezett N-acetil-D-PPT és/vagy a nem teljesen dezacetilezett N-acetil-L-PPT mellől preparatív úton elválasztjuk, és ahol

d) a dezacetilezett L-PPT tér/idő-hozama 55 óra reakcióidőnél legalább 69 mg dezacetilezett L-PPT/g biokatalizátor/h.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a rekombináns deac1 enzimet immobilizált formában alkalmazzuk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy
a reagáltatást kb. 25-65 °C-on végezzük.

4. deac1 alkalmazása az 1-3. igénypontok közül egy vagy több szerinti eljárásban L-PPT enantioszelektív előállítására racém N-acetil-D,L-PPT-ből.