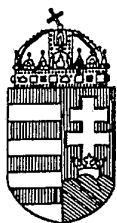


(19) Országkód:

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL**

# SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

**204 576 B**

(21) A bejelentés száma: 900/89  
(22) A bejelentés napja: 1989. 02. 24.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
19532 A/88 1988. 02. 25. IT  
21558 A/88 1988. 07. 29. IT

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

**C 12 P 41/00**

C 12 P 7/40

(40) A közzététel napja: 1990. 08. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1992. 01. 28. SZKV 92/01

(72) Feltalálók:  
Bianchi, Daniele, Milánó (IT)  
Cesti, Pietro, Novara (IT)  
Pina, Carlo, Milánó (IT)  
Battistel, Ezio, La Spezia (IT)

(73) Szabadalmaz:  
Istituto Guido Donegani S.p.A., Novara (IT)

## (54) Folyamatos biotechnológiai eljárás 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsav S(+) optikai izomerjének előállítására

### (57) KIVONAT

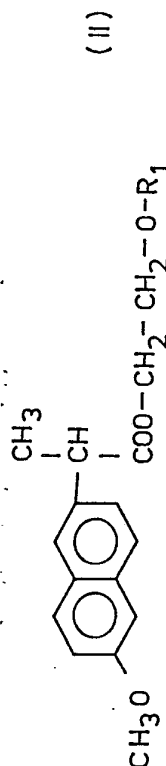
A 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsav S(+) optikai izomerjének folyamatos biotechnológiai előállítása során egy (II) általános képletű, 50 °C alatti olvadáspontú racém (R,S) 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsav-észtert – a képletben

R<sub>1</sub> jelentése 2–5 szénatomos alkilcsoport, fenilcsoport, vagy -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sub>2</sub>-csoport, ahol n értéke 10 és 15 közötti szám,

R<sub>2</sub> jelentése 1–4 szénatomos alkilcsoport –

Candida cylindracea eredetű lipázzal reagáltatnak 20–60 °C hőmérsékleten, 5 és 8 közötti pH-értéken, oly módon, hogy az észtert a porózus hordozóanyagon immobilizált lipázra folyamatosan vezetik rá; porózus hordozóanyagként 50–1000 Å porozitású 1–0,01 mm szemcseméretű poli(akril-észter) típusú adszorbens gyantát alkalmaznak.

Jellemző ábra (II).



**HU 204 576 B**

A találmány tárgya javított eljárás S(+) 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsav (NAPROXEN®) folyamatos biotechnológiai előállítására a (II) általános képletű, 50 °C alatti olvadáspontú (R,S) 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsav-észterből.

Ismeretes, például a T. Y. Shen; Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 11, 460 (1972) szakirodalmi helyen írják le, hogy a 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsavat nem szteroid gyulladásgátló szerként alkalmazzák.

Az említett sav az  $\alpha$ -helyzetben aszimmetriacentrumot tartalmaz, így két optikailag aktív enantiomer az S(+) és a R(-) enantiomer formájában létezik.

Az előzőekben hivatkozott szakirodalmi helyen azt is leírják, hogy az S(+) enantiomer gyulladásgátló aktivitása mintegy hússzor nagyobb, mint az R(-) enantiomeré.

Ezért szükséges az S(+) enantiomernek a kevésbé aktív R(-) enantiomertól való elválasztása.

A 195 717 számú európai közrebocsátási iratban a 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsav S(+) és R(-) optikai izomerjeinek biotechnológiai elválasztására olyan eljárást ismertetnek, amelyben az (I) általános képletű megfelelő racém (R,S) észtereket enzimatikusan sztereoselektíven hidrolizálják. Az (I) általános képletben R jelentése  $-\text{CH}_2-\text{C}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CN}$ ,  $-\text{CH}_2\text{COCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{COOO}-(1-4 \text{ szénatomos alkilcsoport})$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-(1-4 \text{ szénatomos alkilcsoport})$ .

Enzimként előnyösen a *Candida cylindracea* (ATCC No. 14830) lipáztermelő mikroorganizmust alkalmaznak, amely az S(+) optikai izomernek a racém (I) általános képletű vegyületből való szelektív hidrolizálására képes, miközben az R(-) formájú észter lényegében változatlanul megmarad.

A fenti eljárás azonban aligha alkalmas gazdaságos ipari termelésre, minthogy az enzim 96 óra elteltével aktivitásának 80%-át elveszíti, ezért további hidrolízis lépésekben nem használható fel, illetve nem alkalmazható folyamatos hidrolizálási eljárásban, amelynek során az egységnyi enzimre jutó termékmennyiség nagy lehetne.

Arra a felismerésre jutottunk, hogy ha a 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsavnak olyan racém észtereit alkalmazzuk, amelyeknek olvadáspontja 50 °C alatti, és ha az alkalmazott enzim sajátos porózus hordozóanyagon immobilizált *Candida cylindracea* eredetű enzim, a folyamatos hidrolizálási eljárás úgy hajtható végre, hogy eredményeként a hidrolizált terméket magas hozammal nyerjük, és az enzimaktivitás hosszú időszakon át gyakorlatilag változatlan marad. Az említett eljárásban porózus hordozóanyagként poli(akril-észter) alapú adszorbens gyantákat alkalmazunk, amelyek porozitása 50 és 1000 Å közötti, szemcsemérete 1–0,01 mm.

A gyakorlatban megállapítottuk, hogy ha más porózus hordozóanyagot alkalmazunk, amelynek porozitása és szemcsemérete az előzőekben megadott tartományon belül esik, de anyaga a poli(akril-észter)-től eltérő, a racém észter csak kis konverziós fokkal alakítható át hidrolizált terméké, így a folyamatos enzimes hidrolizálási eljárás nem végezhető gazdaságosan.

A fentieknek megfelelően a találmány tárgya folyamatos eljárás a 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsav S(+) optikai izomerjének biotechnológiai előállítására. Az eljárás során egy (II) általános képletű, 50 °C alatti olvadáspontú, racém (R,S) 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsav-észtert – a képletben

R<sub>1</sub> jelentése 2–5 szénatomos alkilcsoport, fenilcsoport, vagy  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}_2$ -csoport, ahol

n értéke 10 és 15 közötti szám,

R<sub>2</sub> jelentése 1–4 szénatomos alkilcsoport –

*Candida cylindracea* eredetű lipázzal reagáltatunk 20 és 60 °C közötti hőmérsékleten, 5 és 8 közötti pH-értéken, és a kapott S(+) savat eltávolítjuk; az eljárás során az észtert a foszfátpuffer-oldattal együtt folyamatosan tápláljuk be a bioreaktoroszlopba, amely az előzőekben említett, porózus hordozóanyagon megkötött lipázzal van töltve, a hordozóanyag 50–1000 Å porozitású, 1–0,01 mm szemcseméretű akril-észter polimer, és a lipáznak a hordozóanyaghoz viszonyított tömege az 1:2 és 1:10 közötti tartományban van. Az S(+) formájú savat a reakcióelegyből ismert módon különítjük el.

A lipáz, amelyet a *Candida cylindracea* ATCC 14830 mikroorganizmus termel, olyan enzim, amely különböző tisztaságú minőségben kereskedelmi forgalomból beszerezhető, és a mikroorganizmus tenyésztéséből ismert eljárásokkal kinyerhető.

A találmány szerinti eljárásban hordozóanyagként olyan adszorbens gyanták alkalmazhatók, amelyeknek polimer mátrixa 50 és 1000 Å közötti porozitású, és 1 és 0,01 mm közötti szemcseméretű, mind a lipáz, mind a (II) általános képletű racém észter adszorbeálására alkalmas poliakril-észter tartalmú. Ilyen gyanták például az AMBERLITE® XAD8 és az AMBERLITE® XAD7 gyanták (az eljárásban alkalmazott AMBERLITE® gyanták a Rohm et Haas Co. termékei).

A lipáznak a hordozón való megkötését a hordozóanyagnak és a pH=6–8 értékre puffertolt vizes lipázoldatnak keverés mellett történő egyszerű elegyítésével végezzük, a lipázt a hordozóanyaghoz viszonyítva 1:2 és 1:10 közötti arányban alkalmazzuk.

A lipáznak a hordozóanyagon való még erősebb megkötése érhető el, ha a hordozóanyagra felviitt lipázt egy többértékű aldehid, különösen telített, alifás, 2–10 szénatomos dialdehid, például glutaraldehid vizes oldatával hozzuk érintkezésbe.

A bioreaktor általában egy hőszabályozással ellátott oszlop, amelynek átmérő:magasság aránya 1:3 és 1:50 közötti, és az immobilizált lipázt tartalmazó hordozóanyaggal van töltve.

A találmány szerinti eljárás kiindulási anyagául szolgáló (II) általános képletű racém (R,S) észterek szokásos észterezési eljárással állíthatók elő racém 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsavból, például az 1. reakcióvázlat szerint. A reakcióvázlatban szereplő képletekben R<sub>1</sub> jelentése az előzőekben megadott.

A (II) általános képletű racém (R,S) észterek közül előnyösek azok, amelyekben R<sub>1</sub> jelentése 2–4 szénatomos alkilcsoport, különösen előnyös kiindulási anyag a racém 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsav etoxi-etil-ész-

tere, n-propoxi-etil-észtere, izopropoxi-etil-észtere és n-butoxi-etil-észtere.

Különböző molaritású,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  és  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tartalmú vizes foszfátpuffert alkalmazunk, hogy a hidrolizálás során a reakcióelegy pH-ját az előre meghatározott értéken tartsuk, és hogy a hidrolizálás révén kapott S(+) 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsavat só formájában oldjuk.

A hidrolizálást előnyösen 30 és 50 °C közötti hőmérsékleten, és 6–7 pH-értéken végezzük.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a bioreaktoroszlopot hordozóanyagon immobilizált lipázzal töltjük meg, az oszlop hőmérsékletét úgy szabályozzuk, hogy 20 és 60 °C között legyen, és a (II) általános képletű (R,S) észtert folyamatos áramban vezetjük be amíg a hordozóanyag telítetté válik. A bioreaktorban az adszorbeált észter és a töltőanyag mennyiségaránya általában az 1:2 és 1:20 közötti tartományba esik.

Az oszlopra a telítés után folyamatos áramban pH=6,5-ös, 0,15 n foszfátpuffert vezetünk párhuzamosan az előzőekben említett racém észterrel, az észter aránya a pufferoldathoz általában 1:50 és 1:200 közötti.

A racém észter bevezetésekor folyamatosan elfoglalja az oszlopon az R(-) optikai izomerben gazdagodott észter helyét, amely a lipáz hatására nem hidrolizált.

A bioreaktor kimeneténél a (II) általános képletű észter R(-) optikai izomerben dúsult szuszpenzióját nyerjük vizes pufferoldatban, amely oldat tartalmazza a túlnyomórészt S(+) optikai izomer formájában lévő 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsavat, és a megfelelő etilénlikol-étert, amelyek a hidrolízis során keletkeztek.

A sav és az észter a bioreaktort elhagyó elegyből megsavanyítást követően vízzel nem elegyedő szerves oldószerekkel extrahálható, alkalmazhatunk például oldószerként metilén-kloridot, toluolt vagy etil-étert.

Ezt követően a kapott szerves extraktumból bepárlás után a lényegében S(+) formájú savat az R(-) izomerben dúsult észterrel kromatográfiás oszlopon, például stationer fázisú szilikagéloszlopon átengedve elkülöníthetjük.

Más eljárás szerint a lényegében S(+) formában lévő savat extrahálással is elkülöníthetjük a szerves extraktumból lúgos mosással, például 5 tömeg%-os nátrium-hidroxid-oldattal vagy 10 tömeg%-os kálium-hidroxid-oldattal való mosással.

A találmány egy további megvalósítási módja szerint a savat és az észtert a bioreaktort elhagyó elegyből úgy különítjük el, hogy az elegyet egy második adsorbens gyantával, például AMBERLITE® XAD7 vagy AMBERLITE® XAD4 típusú gyantával (a Rohm et Haas Co. termékei) töltött oszlopra visszük, ahol a sav és az észter a gyantán adszorbeálódik, és az adszorpciós oszlopot elhagyó pufferoldatban a megfelelő etilénlikol-éter található.

Ezt követően a savat és az észtert az adszorpciós oszlopról vízzel elegyedő szerves oldószerekkel, például metanollal vagy etanollal való mosással eluáljuk.

A kapott szerves extraktumot ezután bepároljuk, és a lényegében S(+) formában lévő savat az R(-) formában dúsult észterrel az előzőekben leírt módon különítjük el.

Az adszorpciós oszlopról távozó, glikoltartalmú pufferoldatot először a kezdeti 6,5-ös pH-ra állítjuk be kálium-hidroxid vizes oldatával, majd a bioreaktorba visszavezetjük.

A pufferoldat addig vezethető vissza, amíg a glikolkoncentráció nem haladja meg a 10 tömeg% értéket, mivel az ennél magasabb glikolkoncentráció a hidrolizálás inhibitoraként működne.

Az R(-) izomerben gazdag észtert az előzőekben leírt módon végzett elkülönítés után vízmentes közegeben bázissal keverve racemizálhatjuk, és a bioreaktorba visszavezethetjük. A következőkben a találmányt nem korlátozó példákban mutatjuk be részleteiben.

#### 1. példa

##### Az enzim immobilizálása

500 g AMBERLITE® XAD7 gyantát 1 liter metanollal mosunk, majd pH=6,5-ös, 0,15 n foszfátpuffer-oldattal kondicionáljuk.

A gyantát 1 liter pH=6,5-ös, 0,15 n foszfátpufferben oldott 100 g *Candida cylindracea* (Sigma L 1754 type VII. 500 µl/mg) lipázenzimhez adjuk, és az elegyet rázógépen 200 ford./perc fordulatszámmal szobahőmérsékleten 24 órán át keverjük. Ezután a gyantát kiszűrjük és 1 liter pH=6,5-ös foszfátpufferrel mossuk.

Ezt követően a hidrolizálási reakciót és a savnak a reakcióelegyből való ezt követő elválasztását az 1. ábrán vázlatosan bemutatott berendezésben végezzük el.

Az 1. ábrán szereplő jelölések a következők:

- (1) a hordozós lipázt tartalmazó hőszabályozott oszlopból álló bioreaktor,
- (2) az adszorpciós oszlop,
- (3) a mosásra szolgáló szerves oldószerek bevezetése,
- (4) az adszorpciós oszlopot elhagyó szerves extraktum,
- (5) a friss pufferoldat bevezetése,
- (6) a racém észter betáplálására szolgáló tartály,
- (7) a friss és a visszavezetett pufferoldat gyűjtésére szolgáló tartály,
- (8) a hidrolizálás révén kapott reakcióelegy gyűjtésére szolgáló tartály.

##### Folyamatos hidrolizálási eljárás

Az 1. ábrára hivatkozva, az előzőekben leírt immobilizált enzimet tartalmazó hordozóanyagot 5 cm átmérőjű és 60 cm magas hőszabályozott oszlopból álló (1) bioreaktorba préseljük.

Az oszlopra ezután betápláljuk a racém etoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot, a betáplálást addig végezzük, amíg a gyanta telítődik.

A hordozóanyag 490 g racém észtert adszorbeál.

Az oszlop hőmérsékletét 35 °C értékre állítjuk be, és 7,2 ml/óra sebességgel racém etoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot és ezzel egyidejűleg 800 ml/óra sebességgel pH=6,5-ös, 0,15 n foszfátpuffert vezetünk rá.

Az oszlopot elhagyó elegy S(+) formájú 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsav és etilénlikol-monoetil-éter tartalmú oldatban szuszpendált, R(-) formában dúsult észter.

*Az S(+)-2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsav  
elválasztása a reakcióelegyből*

Az (1) bioreaktort elhagyó elegyet folyamatosan 5 cm átmérőjű, 60 cm magas, 20 °C hőmérsékleten tartott, 500 g préselt AMBERLITE® XAD4 gyantát tartalmazó (2) adszorpciós oszlopra vezetjük.

Ez az oszlop képes arra, hogy mind a 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsavat, mind az etoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot abszorbeálja.

Az adszorpciós oszlop kivezetésénél az enzimes hidrolízis során képződött etilénlglikol-monoetil-éter foszfátpufferes oldatát nyerjük. Ezt az oldatot nátrium-hidroxid adagolásával ismét pH=6,6-ra állítjuk, míg az etilénlglikol-monoetil-éter koncentrációja 5% alatt marad.

Az adszorpciós oszlop 40 órás működtetés után telődik, ekkor regeneráljuk.

A regenerálást az oszlopnak 10 liter metanollal való mosásával végezzük, amelyet 850 ml/óra sebességgel vezetünk be, miközben az oszlop hőmérsékletét 35 °C értéken tartjuk.

A mosást követően a (2) oszlopot 5 liter pH=6,5-ös, 0,15 n foszfátpuffer átáramoltatásával ismét kondicionáljuk, majd ismét összekapcsoljuk az (1) bioreaktoral.

Az eljárás folyamatossá tételére a gyakorlatban egymással felváltva két adszorpciós oszlopot alkalmazunk.

Az adszorpciós oszlopról egy-egy mosáskor lejövő 10 liter metanolos oldatot vákuumban bepároljuk, és az S(+) formájú savat és az R(-) formában dúsult észtert tartalmazó visszamaradó anyagot 2 liter etil-acetátban oldjuk, és 2 liter 5%-os nátrium-hidroxiddal extraháljuk.

A vizes oldatot 10%-os hidrogén-klorid adagolásával pH=1-re állítjuk be, és a kicsapódó S(+) formájú savat kiszűrjük, majd 100 °C hőmérsékletű kemencében szárítjuk.

Az R(-) formában dúsult észtert tartalmazó szerves fázist nátrium-szulfáton szárítjuk, lepároljuk róla az etil-acetátot, majd a racemizálási fázisba visszük, amelyet a későbbiekben ismertetünk.

Az adszorpciós oszlop minden mosási ciklusából 60–70 g S(+)-2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsavat nyerünk, amelynek fizikai jellemzői a következők:

op.: 154–155 °C,

$[\alpha]_D^{20} = +66,4^\circ$  (c=1, CHCl<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (ppm): 1,57 (3H, d, -CHCH<sub>3</sub>), 3,83 (1H, q, CH), 3,86 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 6,9–8,0 (6H, m, aromás), 8,0 (1H, széles s, OH),

valamint 260–280 g, az R(-) formában dúsult etoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot kapunk.

Az előzőekben ismertetett működési körülmények mellett az 1. ábrán bemutatott rendszer 1200 órás folyamatos üzemelése alatt 9387 g racém etoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot táplálunk be, és 1757 g S(+)-2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsavat nyerünk, ami 25%-os konverzióval felel meg, ennek a terméknek az olvadáspontja 154–155 °C.

$[\alpha]_D^{20} = +66,3^\circ$  (c=1, CHCl<sub>3</sub>),

valamint 7050 g, az R(-) formában dúsult észtert kapunk anélkül, hogy a hatékonyságban vagy termelékenységben csökkenés jelentkezne.

*Az etoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionát  
racemizálása*

300 ml etilénlglikol-monoetil-éter és 36 ml 10%-os kálium-hidroxid elegyéhez 314 g, az R(-) formában dúsult etoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot adunk. Az elegyet 5 órán át visszafolyatós hűtő alatt forraljuk. A reakció befejeződése után ( $[\alpha]_D^{20} = 0^\circ$ ) az etilénlglikol-monoetil-étert lepároljuk, 1 liter etil-acetátot adunk hozzá, 3•1 liter vízzel mossuk, majd nátrium-szulfáton szárítjuk. Az oldószer lepárlása után 95%-os hozammal 298 g racém etoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot nyerünk.

*2. példa*

1 g Candida cylindracea (Meito Sangyo OF-360, 360 000 µ/g) eredetű lipázt 25 g AMBERLITE® XAD7 gyantán immobilizálunk az 1. példában leírt módon.

A gyantát 3 cm átmérőjű, és 30 cm magas hőszabályozott oszlopot tartalmazó bioreaktorba préseljük.

Az oszlopot racém etoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionáttal telítjük, majd ugyanezt az észtert vezetjük rá 0,3 ml/óra sebességgel, egyidejűleg 31 ml/óra sebességgel pH=6,5-ös 0,15 n foszfátpuffert vezetünk a 35 °C hőmérsékleten tartott oszlopra.

Az oszlopot elhagyó elegyet egy második adszorpciós oszlopra visszük, amelynek átmérője 3 cm, magassága 30 cm és töltete 50 mg préselt AMBERLITE® XAD4 gyanta.

A második oszlopból távozó pufferoldatot nátrium-hidroxid adagolással pH=6,5-re állítjuk, majd visszavezetjük a bioreaktoroszlop betáplálási helyére.

Az S(+) formájú savat és az R(-) formában dúsult észtert az adszorpciós oszlopról leoldjuk, és az 1. példában ismertetett eljárással szétválasztjuk.

Az előzőekben ismertetett működési körülmények mellett 500 órás folyamatos működtetés során 146 g racém észtert táplálunk be, és 34 g S(+)-2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsavat nyerünk 31%-os konverzióval, a kapott termék olvadáspontja 154–155 °C,

$[\alpha]_D^{20} = +65,9^\circ$  (c=1, CHCl<sub>3</sub>),

valamint 101 g R(-) formában dúsult etoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot is nyerünk.

*3. példa*

1 g Candida cylindracea (Meito Sangyo OF-360, 360 000 µ/g) eredetű lipázt 25 g AMBERLITE® XAD8 gyantán immobilizálunk az 1. példában ismertetett eljárással.

Az immobilizált enzimet a bioreaktor 3 cm átmérőjű, 30 cm magas oszlopába töltjük, és a betáplálást a 2. példa szerint végezzük.

Az adott reakciókörülmények mellett a rendszert 500 órán át folyamatosan működtetjük, ezalatt 146 g racém észtert táplálunk be, 40 g S(+)-2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsavat nyerünk 37%-os konverzióval, a kapott termék olvadáspontja 154–155 °C,

$[\alpha]_D^{20} = +67,1^\circ$  (c=1, CHCl<sub>3</sub>),

valamint kapunk még 91 g, az R(-) formában dúsult etoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot.

#### 4. példa

Folyamatos enimes hidrolízist végzünk az előzőekben ismertetett berendezés alkalmazásával, az 1. példában leírt működési körülmények mellett, de a racém etoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionát helyett racém n-propoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot alkalmazunk. Ebben az esetben az (1) oszlop hordozóanyaga 480 g racém észtert abszorbeál az előbbi 490 g helyett, és az enimes hidrolízis során etilén-glikol-monoetil-éter helyett etilén-glikol-monopropil-éter képződik.

Az előzőekben ismertetett körülmények mellett az 1. ábrán bemutatott rendszerre 500 órás folyamatos működtetés alatt 3780 g racém n-propoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot táplálunk be, 632 g S(+) 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsavat nyerünk 23%-os konverzióval, a kapott termék olvadáspontja 154–155 °C,

$$[\alpha]_D^{20} = +65,1^\circ \quad (c=1, \text{CHCl}_3),$$

és 2910 g, az R(-) formában dúsult észtert kapunk anélkül, hogy a hatékonyság vagy termelékenység észlelhetően csökkenne.

#### Az n-propoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionát racemizálása

100 g etilén-glikol-monopropilén-éter és 11 ml 10%-os kálium-hidroxid elegyéhez 100 g, az R(-) formában dúsult n-propoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot adunk, és az elegyet 5 órán át visszafolyatató hűtő alatt forraljuk.

A reakció befejeződése után ( $[\alpha]_D^{20}=0^\circ$ ) az etilén-glikol-monopropil-étert lepároljuk, a visszamaradó anyaghoz 300 ml etil-acetátot adunk 3·300 ml vízzel mossuk és nátrium-szulfáton szárítjuk. Ezután az elegyről az oldószert lepároljuk. Így 92%-os hozammal 92 g racém n-propoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot nyerünk.

#### 5. példa

1 g *Candida cylindracea* (Meito Sangyo Co. Ltd. Japan, type OF-360, 360 000 µ/g) eredetű lipázt 25 g AMBERLITE® XAD7 gyantán immobilizálunk az 1. példában ismertetett módon.

A gyantát egy bioreaktor szabályozható hőmérsékletű, 3 cm átmérőjű, 30 cm magas oszlopába préseljük.

Az oszlopot racém n-butoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionáttal telítjük, majd a 35 °C hőmérsékletű oszlopra egyidejűleg 0,4 ml/óra sebességgel a fenti észtert, és 30 ml/óra sebességgel pH=6,5, 0,15 n foszfátpuffert vezetünk be.

Az oszlopot elhagyó elegyet egy második adszorpciós oszlopra visszük, amely oszlop átmérője 3 cm, magassága 30 cm és 50 g préselt AMBERLITE® XAD4 gyantával töltött.

A második oszlop elvezetésénél távozó pufferoldatot nátrium-hidroxid adagolással pH=6,5-re állítjuk, majd a bioreaktoroszlop betáplálásához visszavezetjük.

Az S(+) formájú savat és az R(-) formában dúsult észtert az adszorpciós oszlopról leoldjuk, majd az 1. példában leírt módon szétválasztjuk.

Az ismertetett működtetési körülmények mellett 600 órás folyamatos működtetés során 252 g racém észtert táplálunk be, és 52 g S(+) 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsavat nyerünk 30%-os konverzióval, a kapott termék olvadáspontja 154–155 °C,

$$[\alpha]_D^{20} = +66,7^\circ \quad (c=1, \text{CHCl}_3),$$

valamint kapunk még 176 g R(-) formában dúsult n-butoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot.

#### 6. példa

1 g *Candida cylindracea* (Meito Sangyo Co. Ltd. Japan, type OF-360, 360 000 µ/g) eredetű lipázt 25 g AMBERLITE® XAD7 gyantán immobilizálunk az 1. példában ismertetett módon.

Az immobilizált enzimet ezután egy bioreaktor 3 cm átmérőjű, 30 cm magas, hőmérséklet-szabályozással ellátott oszlopába töltjük. Az oszlopot racém izopropoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionáttal telítjük, és a 35 °C hőmérsékletű oszlopra egyidejűleg 0,4 ml/óra sebességgel a fenti észtert, és 35 ml/óra sebességgel pH=6,5, 0,15 n foszfátpuffert vezetünk.

A fenti működési körülmények mellett 500 órás folyamatos működtetés során 210 g racém észtert viszunk fel, 42 g S(+) 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsavat nyerünk 27%-os konverzióval, a kapott termék olvadáspontja: 154–155 °C,

$$[\alpha]_D^{20} = +64,1^\circ \quad (c=1, \text{CHCl}_3),$$

valamint 150 g az R(-) formában dúsult izopropoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot nyerünk.

#### 7. példa

5 g *Candida cylindracea* (Meito Sangyo Co. Ltd. type OF-360, 360 000 µ/g) eredetű lipázt 25 g AMBERLITE® XAD7 gyantán immobilizálunk az 1. példában ismertetett módon.

Az immobilizált enzimet egy bioreaktor hőmérséklet-szabályozással ellátott, 3 cm átmérőjű és 30 cm magas oszlopába töltjük.

Az oszlopot mintegy 550 molekulatömegű racém polietilén-oxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionáttal telítjük – a vegyület polietilén-oxi-etil-csoportjának képlete  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}_2$ , ahol n értéke 11–13 és R<sub>2</sub> jelentése metilcsoport –, majd az oszlopra egyidejűleg 0,4 ml/óra sebességgel a fenti észtert, és 35 ml/óra sebességgel pH=6,5, 0,15 n foszfátpuffert vezetünk az oszlopot 35 °C hőmérsékleten tartva.

A fenti működési körülmények mellett a rendszert 600 órán át folyamatosan működtetjük, ezalatt 264 g racém észtert vezetünk rá, 23 g S(+) 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsavat nyerünk 30%-os konverzióval, a kapott termék olvadáspontja: 153–154 °C,

$$[\alpha]_D^{20} = +63,9^\circ \quad (c=1, \text{CHCl}_3),$$

valamint 180 g, az R(-) formában dúsult poli(etilén-oxi)-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot nyerünk.

#### 8. példa

1 g *Candida cylindracea* (Meito Sangyo Co. Ltd. Japan, type OF-360, 360 000 µ/g) eredetű lipázt 25 g AMBERLITE® XAD7 gyantán immobilizálunk az 1. példában leírt módon.

Az immobilizált enzimet egy bioreaktor hőmérséklet-szabályozással ellátott 3 cm átmérőjű és 30 cm magas oszlopba töltjük.

Az oszlopot racém fenoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionáttal töltjük, majd egyidejűleg 0,3 ml/óra sebességgel a fenti észtert, és 30 ml/óra sebességgel pH=6,5, 0,15 n foszfátpuffert vezetünk rá az oszlopot 40 °C hőmérsékleten tartva.

A fenti működési körülmények mellett a rendszert 300 órán át folyamatosan üzemeltetjük, ezalatt 98 g racém észtert viszünk rá, 15 g S(+) 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsavat nyerünk 23%-os konverzióval, a kapott termék olvadáspontja: 154–155 °C,

$[\alpha]_D^{25} = +65,7^\circ$  (c=1, CHCl<sub>3</sub>),

valamint 70 g az R(-) formában dúsult fenoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot nyerünk.

#### Referenciapéllda

Négy folyamatos enzimes hidrolizálási vizsgálatot végzünk, amelyek során a 2. példában ismertetett működtetési körülményeket alkalmazzuk, azzal az eltéréssel, hogy az AMBERLITE® XAD7 gyanta helyett a következő gyantákat alkalmazzuk:

AMBERLITE® XAD2 polimer sztirol/divinil-benzol mátrixú adszorbens gyanta,  
DUOLITE® ES762 polimer fenol/formaldehid mátrixú adszorbens gyanta,  
DUOLITE® S761 polimer fenol/formaldehid mátrixú adszorbens gyanta,  
DUOLITE® ES468 poliakril mátrixú ioncserélő gyanta.

Az AMBERLITE® gyanták a Rohm et Haas Co. termékei, a DUOLITE® gyanták a Diamond Alkali Co. termékei.

Valamennyi alkalmazott gyanta porozitása 50 és 1000 Å közötti, szemcseméretük 1–0,01 mm.

A racém etoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionát konverziója az S(+) 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsav optikai izomerre 5% alatt marad.

#### SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás a 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsav S(+) optikai izomerjének folyamatos biotechnológiai előállítására, amelynek során egy (II) általános képletű racém (R,S) 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsav-észtert – a képletben

R<sub>1</sub> jelentése 2–5 szénatomos alkilcsoport, fenilcsoport, vagy -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sub>2</sub>-csoport, ahol n értéke 10 és 15 közötti szám,  
R<sub>2</sub> jelentése 1–4 szénatomos alkilcsoport –

Candida cylindracea eredetű lipázzal reagáltatunk 20–60 °C hőmérsékleten, 5 és 8 közötti pH-n, és a

kapott S(+) savat kinyerjük, *azzal jellemezve*, hogy 50 °C alatti olvadáspontú észtert alkalmazunk, ezt a foszfátpuffer-oldattal egyidejűleg folyamatosan tápláljuk be egy olyan bioreaktoroszlopba, amelyet a tárgyi körben megjelölt lipáz porózus hordozóanyagon immobilizált formájával töltünk meg, hordozóanyagként 50–1000 Å porozitású, 1–0,01 mm szemcseméretű, akril-észter polimerből álló abszorbens gyantát alkalmazunk, és a lipázt a hordozóanyagon 1:2 és 1:10 közötti tömegarányban kötjük meg. (Elsőbbsége: 1988. 07. 29.)

2. Eljárás a 2-(6-metoxi-2-naftil)-propionsav S(+) optikai izomerjének folyamatos biotechnológiai előállítására, amelynek során racém (R,S) etoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot Candida cylindracea eredetű lipázzal reagáltatunk 20–60 °C hőmérsékleten, 5 és 8 közötti pH-n, és a kapott S(+) savat kinyerjük, *azzal jellemezve*, hogy 50 °C alatti olvadáspontú észtert alkalmazunk, ezt a foszfátpuffer-oldattal egyidejűleg folyamatosan tápláljuk be egy olyan bioreaktoroszlopba, amelyet a tárgyi körben megjelölt lipáz porózus hordozóanyagon immobilizált formájával töltünk meg, hordozóanyagként 50–1000 Å porozitású, 1–0,01 mm szemcseméretű, akril-észter polimerből álló abszorbens gyantát alkalmazunk, és a lipázt a hordozóanyagon 1:2 és 1:10 közötti tömegarányban kötjük meg. (Elsőbbsége: 1988. 02. 25.)

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kiindulási anyagként racém (R,S) n-propoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot reagáltatunk. (Elsőbbsége: 1988. 07. 29.)

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kiindulási anyagként racém (R,S) izopropoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot reagáltatunk. (Elsőbbsége: 1988. 07. 29.)

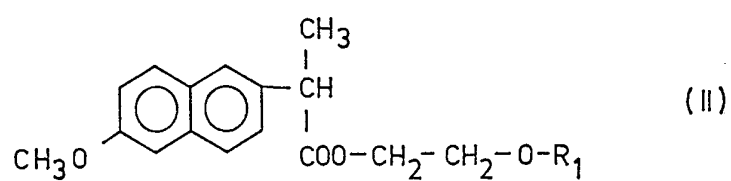
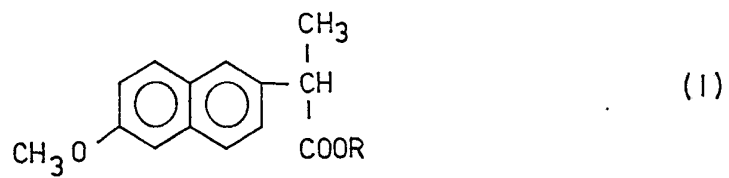
5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kiindulási anyagként racém (R,S) n-butoxi-etil-[2-(6-metoxi-2-naftil)]-propionátot reagáltatunk. (Elsőbbsége: 1988. 07. 29.)

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy porózus hordozóanyagként AMBERLITE® típusú poli(akril-észter) alapú gyantákat alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1988. 07. 29.)

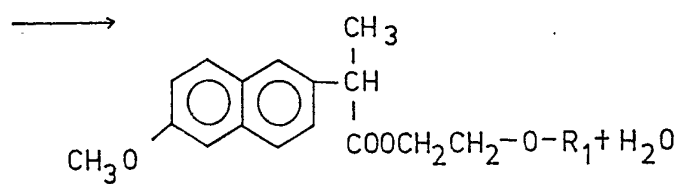
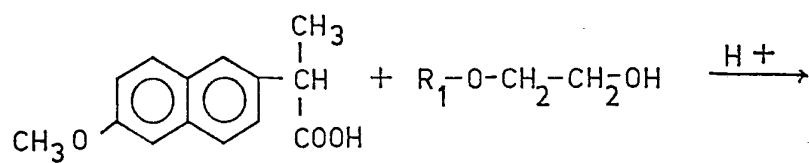
7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 30–50 °C hőmérsékleten és pH=6–7 értéken reagáltatunk. (Elsőbbsége: 1988. 07. 29.)

8. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy porózus hordozóanyagként AMBERLITE® típusú poli(akril-észter) alapú gyantákat alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1988. 02. 25.)

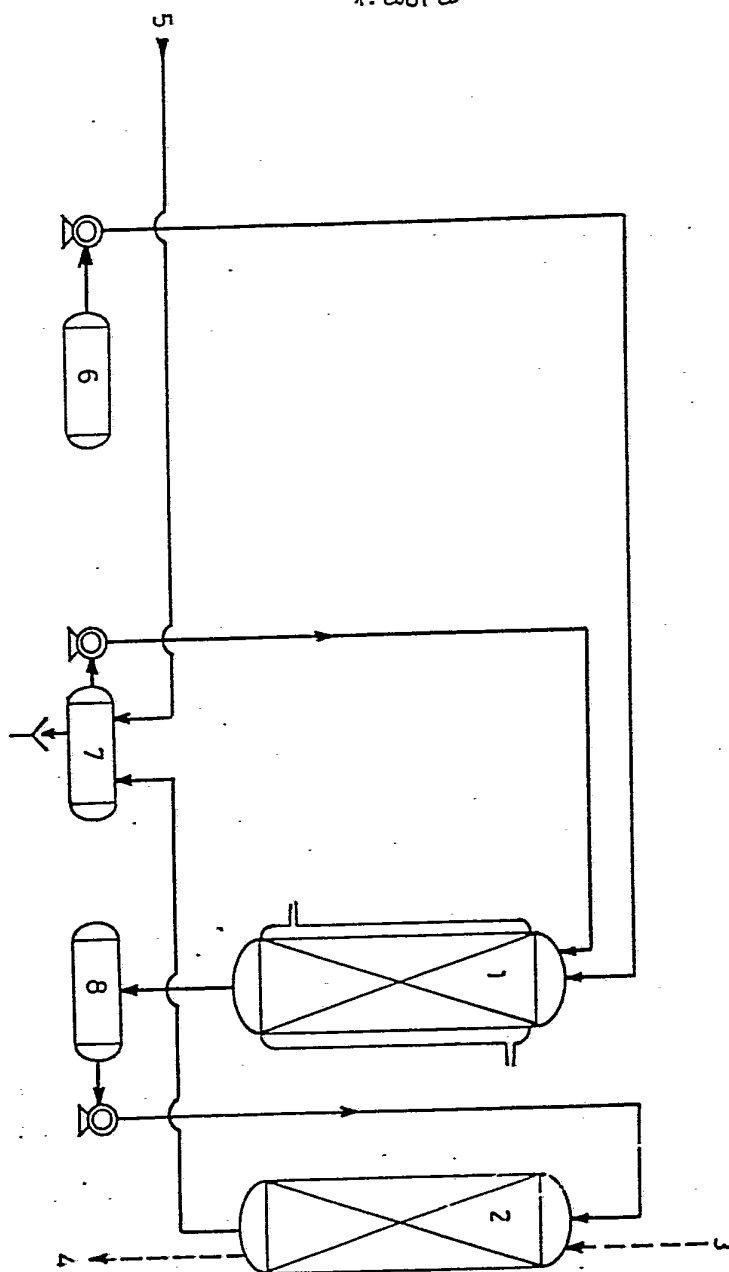
9. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 30–50 °C hőmérsékleten és pH=6–7 értéken reagáltatunk. (Elsőbbsége: 1988. 02. 25.)



1. reakcióvázlat



1. ábra



Kiadja az Országos Találmányi Hivatal, Budapest  
A kiadásért felel: dr. Szvoboda Gabriella osztályvezető  
AGUILAR & TÁRSA Kft  
Felelős vezető: Javier Aguilar ügyvezető ig.