4853/90

55.559/BE

K I V O N A T

Eljárás enzimek előállitására és alkalmazására

RHONE-POULENC Inc. MONMOUTH JUNCTION, [illegible], New Jersey,
Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1990. ~~12. 13.~~ 06. 01.

Elsőbbsége: 1989. 06.05. /361049/
Amerikai Egyesült Államok

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US90/02990

A nemzetközi közzététel száma: WO 90/15146

A találmány tárgya eljárás Candida rugosából származó lipáz vagy lipáz izoenzimek alkalmazása észterek sztereoszelektiv hidrolizálására, savak sztereoszelektiv észterezésére vagy észterek sztereoszelektiv átészterezésére vizes/szerves rendszerekben. A Candida rugosából két lipáz izoenzimet különitettek el tisztán ioncserélő kromatográfiával vagy izoelektromos fókuszálással és azokat észterek sztereoszelektiv hidrolizisére, savak sztereoszelektiv észterezésére vagy észterek sztereoszelektiv átészterezésére alkalmazták. A lipázt vagy lipáz izoenzimet immobilizálni is lehet, és egy zsirsav vagy egy zsírsav-észter jelenléte megnöveli a reakció sebességét és sztereoszelektivitását.

S.B.G. & K.
Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

55.559/BE

4853/90

"A"

NI20S: C12P 7/64, 7/62
C12N 11/18
C12N 11/08
9/20

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

61050

Eljárás enzimek előállitására és alkalmazásukra

RHONE-POULENC Inc. MONMOUTH JUNCTION, [illegible]; New Jersey,
Amerikai Egyesült Államok

Feltalálók: COBBS Carrington, S. ELLICOT CITY,
BARTON Michael, J. ROCKVILLE,
PENG Lin, BALTIMORE,
GOSWAMI Animesh., COLUMBIA,
MALICK Adrien., WOODSTOCK,
HAMMAN John., BALTIMORE,
CALTON Gary, J. ELKRIDGE, Maryland
Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1990. ~~12.~~ 06. 01. ~~13.~~

~~Elsőbbsége~~: 1989. 06. 05. /361049/
Amerikai Egyesült Államok

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US90/02990

A nemzetközi közzététel száma: WO 90/15146

A találmány Candida rugosa-ból kinyert lipáz készitményekből származó enzimek és izoenzimek izolálására, immobilizálására és alkalmazására vonatkozik.

Az elmúlt néhány év során a lipázoknak vagy észterázoknak észterek sztereospecifikus hidrolizálására történő alkalmazása komoly érdeklődést keltett. Ezzel kapcsolatban lásd: Cambou,B. and Klibanov,A.M.: Optikailag aktiv savak lipáz-katalizált előállitása észterek aszimmetrikus hidrolizisén keresztül, illetve az alkohol csoport hatása, Appl.Biochem.& Biotech. 9, 225-260 (1984); Dahod,S.K and Siuta-Mangano,P.: Alifás savak észterei racém elegyének rezoloálása, Stauffer Chemical Company, 86104201.8 számú európai szabadalmi bejelentés (a továbbiakban Dahod EPA); Dahod,S.K. and Siuta-Mangano,P; Metil-(2-klór--propionát) lipázzal történő, szén-tetrakloriddal promotált sztereoszelektiv hidrolizise, Biotechn & Bioeng. 30, 995-999 (1987) (a továbbiakban Dahod Biotech); és Walts,A.E., Fox,E.M. and Jackson, C.B.: R-Glicidil-butirát: Egy laboratóriumi eljárás kifejlesztése ipari eljárássá, Biotech USA 1987, Online International, London. Ez az érdeklődés annak a kivánalomnak tudható be, hogy olyan speciális sztereokémiájú mezőgazdasági és gyógyszerészeti intermediereket állitsanak elő, amelyekben a nem kivánatos enantiomernek minimális vagy semmi aktivitása sincs és igy nem is lehet nemkivánatos toxicitása. Ezzel kapcsolatban lásd: Calton, G.J.: Mikroorganizmusok és enzimek alkalmazása optikailag aktiv mezőgazdasági vegyszerek szintézisében és gyártásában; ACS Symposium Series Biotechnology in Agricultural Chemistry, Amer,Chem.Soc., Washington D.C., 1987. Számos mezőgazdasági és gyógyszerészeti téren alkalmazott propionsav-szár-

mazék tartozik ebbe a kategóriába. Ezzel kapcsolatban lásd: Dahod EPA, Dahod Biotech és Calton, valamint Caldwell,J., Hutt,A.J. és Fourner-Gigleux,S.: 2-aril-propionsavak metabolikus királis inverziója és diszpozicionális enantioszelektivitása valamint azok biológiai következményei, Biochemical Pharmacology 37, 105-144 (1988).

Annak ellenére, hogy számos lipázt alaposan megvizsgáltak racém alkoholok és/vagy karbonsavak resolválásának szempontjából, azok általában nem voltak túl sikeresek a 95 % alatti enantiospecificitásuk miatt. Általánosan elfogadott tény, hogy 95 % fölötti enantioszelektivitásra van szükség egy iparilag is jelentős eljárás esetén. Ezzel kapcsolatban lásd: Akiyama, A., Bednarski,M., Kim,M.J., Simon,E.S., Waldmann,A. és Whitesides,G.M.: Enzimek szerves szintézisekben, Chemtech 1988, 627-634 (a továbbiakban Whitesides). Csak kevés, az irodalomban közölt lipáz mutatott magasfokú sztereospecifitást. Ezzel kapcsolatban lásd: Dahod EPA:, Dahod Biotech; Walts: Nissan Chem Ind, 86-20283/31 számú japán szabadalmi bejelentés; Stokes, T.M. és Oehlschlager, A.C:: Enzimreakciók apoláros oldószerekben: (±)-Szulkatol resolválása sertés hasnyálmirigy lipázzal, Tetra.Lett. 28 (19), 2091-2094 (1987); Kodera, Y., Takahashi,K., Nishimura,H., Matsushima,A., Saito,Y., és Inada,Y.: Benzolban végzett észter szintézis szubsztituált karbonsavból Candia rugosaból származó polietilén-glikollal módositott lipáz katalizisével, Biotech. Lett., 8, 881-884 (1986); és Klibanov,A.M. és Kirchner,G.: 2-halogén-propionsavak optikai izomerjeinek enzimatikus elő-

állitása, 4.601,987 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leirás. A lipázokat szintén alaposan viszgálták optikailag aktiv észtereknek savak illetve alkoholok elegyéből történő előállitása szempontjából, és azok jó enantioszelektivitást mutattak hosszú láncú alkoholok észterezése esetében. Ezzel kapcsolatban lásd: Klibanov,A.M és Kirchner,G.: 2-halogén-propionsavak optikai izomerjeinek enzimatikus előállitására, 4.601.987 számú egyesült államokbeli szabadalmi leirás; illetve Cambou,B. és Klibanov,A.M.: Optikailag aktiv észterek és alkoholok preparativ előállitása szerves közegben észteráz katalizált sztereospecifikus átészterezés segitségével, J.Am.Chem.Soc. 106, 2687-2692 (1984).

A Candida rugosából (korábbi nevén Candida cylindracea) nyert lipázt eddig is széles körben használták, és úgy tűnt, hogy korlázott sztereospecifitást mutat néhány észter hidrolizisében. Ezt az enzimet számos cég gyártja, köztük a Sigma, Meito Sangyo, Biocatalysts, Enzyme Development Corp. valamint Amano, és a kereskedelemben kapható. Előállitása a C. rugosa ATCC 14830 törzs táptalajának és sejtjeinek extrakciójával történik. Egy korábbi kutatás megmutatta, hogy a Candida rugosából nyert lipáz (Sigma) nem eredményezte a 2-klór-propionsav-metil-észterek sztereospecifikus hidrolizisét, de nagy enantiomer felesleget adott 2-klór-propionsav-oktil-észterének hidrolizisénél. Ezzel kapcsolatban lásd Klibanov,A.M. és Kirchner,G.: 2-halogén-propionsavak optikai izomerjeinek enzimatikus előállitása: 4.601.987 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leirás. Ezenfelül kimutatták, hogy az

oktil-észter szintézise abszolut sztereospecifikus. Ezzel kapcsolatban lásd; Cambou,B. és Klibanov,A.M.: Optikailag aktiv észterek és alkoholok előéllitása szerves közegekben észteráz katalizált sztereospecifikus átészterezés alkalmazásával, J.A.Chem.Soc. 106, 2687-2692 (1984).

Azt is észrevették, hogy kétfázisú, vizes-szerves elegyben, alacsony hőmérsékleten (4 ^{o}C) magas optikai tisztaságot (90 % feletti enantiomer felesleget) lehet elérni 30 %-os hidrolizist követően. Érdekes módon, a magas klórtartalmú oldószerek ezen hidrolizis esetén jobbak voltak, és szén-tetraklorid egy szubsztrátum jelenlétében aktiválta az enzimet-, mig szubsztrát hiányában szén-tetraklorid gyorsan inaktiválta az enzimet. Ezzel akapcsolatban lásd.: Dahod és Siuta-Mangano. Azt is kimutatták, hogy a reakcióban kapott optikai tisztaság a hidrolizis mértékének volt a függvénye a korábbi várakozásoknak megfelelően, és az optikai tisztaság gyorsan romlott, ahogyan a reakció kezdte megközeliteni az egyik enantiomer teljes hidrolizisét.

Sih és munkatársai, [Sih,C.J., Gu,Q.M., Fulling,G., Wu,S.-H. and Reddy,D.R., J.Indus.Micro., Suppl.3, Develop. Ind.Micro., 29, 221-229 (1988); Gu,Q.-M., Chen,C.-S. és Sih, C.J., Tetrahedron Lett., 27, 1763-1766 (1986)] resolválási módszert találtak a 2-aril-propionsavak (S) enantiomerjéhez, az aril szubsztituenstől függően. A 2-(6-metoxi-2-naftil)--propionsav-(naproxen) és p-izobutil-hidrotropasav (ibuprofen) esetében a Candia rugosa lipáz enantiospecificitása 98 % fölötti volt. Mindazonáltal a 2-(3-benzoil-fenil)-propionsav

(ketoprofen) esetében az enantiomer felesleg csak 51 % volt.

A Nissan Chemical Industries munkatársai (Nissan Chem. Ind. 86-255917 számú japán szabadalmi leirás) megkiséreltek hasznot húzni a sztereoszelektiv hidrolizisből azáltal, hogy egy Candida rugosa lipázkészitményt használtak egy ariloxi-propionsav, az (R)-(+)-2-(4-hidroxi-fenoxi)-propionsav (R-HPPA) előállitására, azonban csak 87 %-os enantiomer felesleget értek el 21 %-os hidrolizis mellett vizes oldatban.

A Candida rugosa lipázáról sokáig úgy gondolták, mintha az egyetlen enzim volna, tekintet nélkül a forrásra, bár az utóbbi időkben már publikáltak egy cikket a nyers enzim szétválasztásáról. Ezzel kapcsolatban lásd: Abramowicz,D.A. és Keese,C.R.,: Karbonátok enzimatikus átészterezése részben vizes környezetben, Biotech. Bioeng., 33, 149-156 (1989). Mindazonáltal jól ismert az irodalomban az, hogy sok enzim számos, egymástól különböző izoenzimet tartalmaz, amelyek eltérő specifitással rendelkeznek. A sertésmáj észterázból származó izoenzimeket sikerült izolálni. Ezzel kapcsolatban lásd: Farb,D.H.: Mikroszómális sertésmáj észteráz különböző formái:

I. Izolálás és tulajdonságok, a másodlagos szerkezet megállapitása.

II. A kapcsolatba lépő csoportok reakciósebességének pH függése, Diss.Ab.Int,B 38, 5900-5901 (1978); Farb,D. és Jencks, W.P:: Sertésmáj észteráz aktivitásának pH függése, Arch.Biophy; 203, 227-35 (198o); és Guanti,G., Banfi,L., Narisano,E., Riva,R. és Thea,S.: Enzimek az aszimmetrikus szintézisben: A reakcióközegek hatása diészterek sertésmáj észterázzal katali-

zált hidrolizisére, Tetrahedron Lett., 27, 4639-4642 (1986). A szubsztrátumtól függően ezen izoenzimek mindegyike különféleképpen reagálhat a reakció körülményeinek megváltoztatására és különböző sztereospecifitást mutathat.Mindazonáltal nincs jele annak, hogy a C.rugosa lipázban izoenzimek lennének jelen, annak ellenére, hogy az enzimet intenziven vizsgálták, még izoelektromos fókuszálással is. Ezzel kapcsolatban lásd; Gerlach,D., Schreier,S., Gollner,T., Kim,K.S. és Schreier,P.: Lipázok kiválasztása szekunder alkoholok szerves közegben észterezéssel való enantiomer rezolválására, Bioflavour '87, Proc. Int. Conf., 1988 Walter de Gruyter & Co., Berlin.

Nem tekintve a már emlitett, korábbi erőfeszitéseket, még mindig bőven van hely az olyan továbbfejlesztett eljárások számára, amelyek az enzimatikus módszerekkel történő sztereospecifikus hidrolizisre vagy észterek átészterezésére vagy alkoholok illetve észterek észterezésére vonatkoznak. például állandó érdeklődés van az (R,S)-(+)-metil-2-(4-hidroxi-fenoxi)--propionát (HPPA-Me) enzimatikus hidrolizise iránt, hogy 95 %-nál jobb szelektivitással állitsanak elő (R)-HPPA-t. A racém HPPA értékes intermedier bizonyos gyomirtószerek gyártásánál. Úgy találták, hogy a kvizalofop (quisalofop) etil herbicid aktivitásának több mint 95 %-áért az (R) izomer a felelős, amelyet (R)-HPPA-ból kényelmesen lehet szintetizálni. Ennélfogva komoly jelentősége van annak, hogy a HPPA racém észterét gazdaságos módon tudjuk lebontani, hogy ezen intermediert ipari méretekben elő tudjukm állitani. A találmány célja, hogy fejlődést biztositson az enzimatikus hidrolizis valamint az

észterezési és átészterezési eljárások területén. A továbbiak során más célok is nyilvánvalóak lesznek.

A találmány tárgyát olyan eljárások képezik, amelyek olyan 2-szubsztituált savak racém észterkeverékeinek Candida rugosa-ból nyer bizonyos lipázkészitményekkel, vizes-szerves közegben történő sztereoszelektiv hidrolizisére szolgálnak, ahol a sav 2-helyzetben halogénatomtól eltérő szubsztituenst tartalmaz. Ezek az eljárások a hidrolizisre vonatkozóan nagyon sztereoszelektivek. A találmány foglalkozik még olyan eljárásokkal is, amelyek különböző észterek átészterezésére valamint savak és alkoholok észterezésére vonatkoznak. A találmány ezen felül vonatkozik az R-2-(4-hidroxi-fenoxi)-propionsav egy olyan előállitási eljárására is, ahol nagy enantiomer felesleget érünk el egy enzim alkalmazásával. A találmány vonatkozik még két különösen hasznos izoenzimre is, amelyek jelenlétét a Candida rugosa-ból nyert lipázkészitményekben fedeztük fel, valamint ezen izoenzimeknek a Candida rugosa lipázból kromatográfiás eljárással és izoelektromos fókuszálással történő elválasztására és tisztitására. Ezen izoenzimeknek észterek hidrolizisére, észterek átészterezésére és savak észterezésére történő alkalmazása a jelen találmánynak egy további területét jelentik. Ezenfelül megadjuk ezen izoenzimeknek a sztereoszelektiv hidrolizishez, észterezéshez vagy átészterezéshez történő alkalmazásának módját is. Módszereket ismertetünk az izoenzimek immobilizálására valamint az immobilizált izoenzimeknek és a Candida rugosa immobilizált lipázának alkalmazását is megadjuk. Hasonlóképpen megadunk egy módszert az enzimaktivitásnak

immobilizálással történő szelektivitás-növelésére. Ezenfelül ismertetünk egy, a redukáló anyagok alkalmazására szolgáló módszert az enzimatikus hidrolizisek stabilizálása érdekében. Leirjuk az enzimeknek, izoenzimeknek illetve ezek immobilizált alakjainak szerves oldószerek jelenlétében történő alkalmazását is. Eljárásokat adunk meg 2-ariloxi szubsztituált savak sztereoszelektiv előállitására, és leirjuk az R-2-(4-hidroxi--fenoxi)-propionsav izoenzimek alkalmazásával történő előállitását. Leirjuk 2-aril-propionsavaknak izoenzimekkel történő sztereoszelektiv előállitását, és eljárásokat adunk meg S-ketoprofennek, S-ibuprofennek, S-fenoprofénnek, S-2-fenil-propionsavnak és 2-indoprofennek ezen az úton történő előállitására. Megadunk még egy módszert egy lipázzal katalizált reakció sebességének vagy sztereoszelektivitásának fokozására.

A találmány egyrészről vonatkozik egy észtereknek nagy enantiomer feleslegű savakká történő sztereoszelektiv hidrolizálására szolgáló eljárásra, amely kétfázisú, vizes-szerves rendszerben játszódik le szabad vagy immobilizált enzimek segitségével, ahol a szerves fázis egy aromás oldószer és ahol a sav 2-helyzetében halogéntől eltérő szubsztituens van.

A találmány másrészről vonatkozik R-2-(4-hidroxi-fenoxi)--propionsav Candida rugosa-ból nyert enzimek segitségével történő előállitására.

A találmány tárgyát képezik még a következők is:

(1) egy, a 2-(4-hidroxi-fenoxi)-propionsav előállitására alkalmazott enzim vagy izoenzim stabilitásának megjavitására szolgáló eljárás egy redukálószer alkalmazásával;

(2) egy, izoenzimeknek Candida rugosa lipázkészitményből történő izolálására és tisztitására szolgáló eljárás, amely eljárásban ioncserélő kromatográfiát használunk egy, a lipáz izoenzimek elkülönitésére szolgáló, megfelelő eluációs programmal;

(3) egy, izoenzimeknek a Candida rugosa-ból származó lipázból történő izolálására és tisztitására szolgáló eljárás, amely eljárásban izoelektromos fókuszálást használunk;

(4) egy olyan, tisztitott Candida rugosa lipáz izoenzim, amely a következő N-terminális aminosavszekvenciával rendelkezik:

Ala-Pro-Thr-Ala-U-Leu-Ala-Asn-Gly-V-
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-
Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-W-X-Ala-Glu-
Pro-Pro-Y-Z-Asn-P ,

ahol U,V,W,X,Y és Z aminosavak és P a peptid fennmaradó része. A találmány tárgyát képezi különösen egy olyan izolált izoenzim, melyet a továbbiakban(CSC-1-nek nevezünk),amely a következő N-terminális aminosavszekvenciával rendelkezik:

Ala-Pro-Thr-Ala-Lys-Leu-Ala-Asn-Gly-V-
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-
Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-Pro-Phe-Ala-Glu-
Pro-Pro-Val-Gly-Asn-P ,

ahol V egy aminosav és P a peptid fennmaradó része.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy olyan izolált izoenzim,(amelyet a továbbiakban CSC-2-nek nevezünk), amely a következő N-terminális aminosavszekvenciával rendelkezik:

Ala-Pro-Thr-Ala-Thr-Leu-Ala-Asn-Gly-Asp-Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-W-X-Ala-Glu-Pro-Pro-Y-Z-Asn-Leu-Phe-Ile-ZZ-Leu-P,

ahol W,X,Y,Z és ZZ aminosavak és P a peptid fennmaradó része.

Minden a szakterületen jártas egyén előtt nyilvánvaló az, hogy az előzőekben leirt izoenzimeket rekombináns DNS-t alkalmazó módszerrel is elő lehet állitani, amikor más izolálási módszerek is lehetségesek. Az is nyilvánvaló, a fentebb leirt izoenzimek szerkezetében az aminosavszekvencia kisebb változtatásait is végre lehet hajtani rekombináns DNS-t alkalmazó módszerekkel anélkül, hogy az előbb megadott aminosavszekvencia megváltozása befolyásolná az izoenzimek hatásának természetét és specifitását;

(5) egy lipáz izoenzim jelenlétében végzett, észterek hidrolizálására szolgáló eljárás;

(6) egy lipáz izoenzim jelenlétében végzett, savak vagy alkoholok észterezésére szolgáló eljárás;

(7) egy lipáz izoenzim jelenlétében végzett, észterek átészterezésére szolgáló eljárás;

(8) egy lipáz izoenzim jelenlétében végzett, észterek sztereoszelektiv hidrolizálására szolgáló eljárás;

(9) egy lipáz izoenzim jelenlétében végzett, savak vagy alkoholok sztereoszelektiv-észterezésére szolgáló eljárás;

(10) egy lipáz izoenzim jelenlétében végzett, észterek sztereoszelektiv átészterezésére szolgáló eljárás;

(11) Candida rugosa lipáz izoenzimjeinek és enzimjeinek immobilizálására szolgáló eljárások;

(12) Candida rugosa lipáz immobilizált enzimjeinek és immobilizált izoenzimjeinek alkalmazására szolgáló eljárások;

(13) egy enzim immobilizálással történő tisztitására szolgáló eljárás;

(14) enzimek, izoenzimek vagy immobilizált enzimek illetve immobilizált izoenzimek kétfázisú, vizes-szerves rendszerekben történő alkalmazására szolgáló eljárások;

(15) egy 2-ariloxi szubsztituált savak specifikus enantiomerjeinek lipáz izoenzimek segitségével történő előállitására szolgáló eljárás;

(16) egy R-2-(4-hidroxi-fenoxi)-propionsavnak lipáz izoenzimek segitségével történő előállitására szolgáló eljárás;

(17) egy 2-aril-propionsavak lipáz izoenzimek segitségével történő resolválására szolgáló eljárás. A találmány tárgyát képezik különösen az S-ketoprofen, S-ibuprofen, S-fenoprofen, S-2-fenil-propionsav és S-indoprofen előállitására szolgáló eljárások. Ezek az eljárások

különösen értékesek a szakirodalomban leirt bizonyos észterek előállitásával kapcsolatban; és

(18) bizonyos adalékok alkalmazására, amelyek fokozzák a Candida rugosa lipázának vagy a Candida rugosa izoenzimjeinek sztereoszelektivitását illetve reakciósebességét.

A találmány további jellemzőit, tárgyait és előnyeit az ezután következő részletes leirásban részletesen felsoroljuk.

A találmány tárgyát egy észterek racém elegyeinek savakká történő sztereoszelektiv hidrolizálására szolgáló olyan eljárás képezi, amely eljárás a következő lépésekből áll:

a) a Candida rugosa lipáz enzimének vagy izoenzimének immobilizálása; és

b) észterek racém elegyének az immobilizált enzimmel vagy izoenzimmel való érintkeztetése olyan szerves oldószer jelenlétében, amely fokozza az eljárás sztereoszelektivitását. Az eljárás sztereoszelektivitását optimalizáló szerves oldószerek példáiként aromás szerves oldó szerek, különösen aromás szénhidrogének emlithetők. Egy különösen előnyös szerves oldószer a toluol.(Lásd a 6. példát). Mindazonáltal más szerves oldószereket is lehet használni. Közéjük tartoznak korlátozás nélkül a halogénezett szénhidrogének.

A reakciókörülmények, például a hőmérséklet és a reakció idő változtathatók. Előnyösen szobahőmérsékleten (20-25 ^{o}C)

dolgozunk, de más hőmérséklet-tartományok is használhatók. Az optimális reakcióidőt, pH-t és egyéb körülményeket mindegyik speciális esetben egyszerűen meg lehet határozni.

A Candida rugosa lipáz enzimét vagy izoenzimeit alkalmazó találmány szerinti eljárással sztereospecifikusan hidrolizálható előnyös észterek a 2-(ariloxi)-propionsavak, különösen a 2-(4-hidroxi-fenoxi)-propionsav (a továbbiakban "HPPA") észterei. A sztereoszelektivitás fokozódik, ha az enzimet immobilizáljuk, előnyösen egy poliaziridin prepolimerrel. Kis mennyiségben redukáló anyagok, például nátrium-hidrogén-szulfit is adagolható, hogy megakadályozzuk a HPPA és észterei oxidációját.

Amint az a 9. példából is látható, az immobilizált enzim sztereospcificitása a használat során növekszik. A HPPA metil-észterének HPPA-vá történő hidrolizisénél az első adagban 82 % R-HPPA és 18 % S-HPPA terhelés volt, mig mind a hetedik, mind a nyolcadik adag hidrolizise során a konverzió 100 % R-HPPA és 0 % S-HPPA volt. Bár a használattal a sztereospecifitás jelentősen nőtt, az aktivitás kissé csökkent. A találmány szerinti eljárással kapott megnövekedett sztereospecifitás egy ipari eljárás esetében kritikus, mivel - mint ahogyan azt már korábban megjegyeztük - egy ipari eljáráshoz általában 95 %-nál nagyobb enantimer feleslegre van szükség.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás a Candida rugosa lipáz sztereoszelektiv enzimjének tisztitására és szétválasztására, amely ioncserélő krómatográfia alkalmazásából áll és az eredményként kapott lipáz izoenzimeknek egy megfelelő eluációs programmal történő szétválasztásából. Az eluációs program

lehet egy lépcsőzetes pH változtatásos program, egy pH gradiens program vagy egy sóeluációs program. Az előnyös eluációs program a lépcsőzetes pH változtatásos program. Ezen eljárás egy előnyös megvalósitása magában foglalja a Candida rugosa lipáz enzimjeinek tisztitását, hogy a két izoenzimet (CSC-1 és CSC-2) eluáljuk.

A Candida rugosa lipáz sztereoszelektiv izoenzimjeinek tisztitását és szétválasztását izoelektromos fókuszálással is meg lehet valósitani. Mint ahogyan azt az 58. példában bemutatjuk, a Candida rugosa lipáz enzimjét két izoenzimre, a CSC-1-re és a CSC-2-re lehet szétválasztani, amelyek mindegyike kivételes sztereospecifikus hidrolitikus aktivitást mutat.

A találmány szerinti tisztitási és szétválasztási eljárás megfelel nagy léptékben való alkalmazásra. A találmány szerinti eljárásban számos kromatográfiás hordozót lehet használni. Előnyös egy erős savval szubsztituált kromatográfiás hordozó. Különösen előnyös egy szulfopropil funkciós csoporttal szubsztituált kromatográfiás hordozó alkalmazására. Az előnyös hordozók közé tartozik az SP-Trisacryl™ és az SP-Sephacryl™. (Lásd a 11., 12., 13. és 14. példákat).

Mint azt már korábban emlitettük, a találmány tárgyát képezi a Candida rugosa lipázának egy olyan izolált izoenzime mely a következő N-terminális aminosav-szekvenciával rendelkezik:

Ala-Pro-Thr-Ala-U-Leu-Ala-Asn-Gly-V-
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-
Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-W-X-Ala-Glu-
Pro-Pro-Y-Z-Asn-P

ahol U, V, W, X, Y és Z aminosavak és P egy peptid. Közelebbről meghatározva a találmány tárgyát képezi egy olyan izoenzim (a továbbiakban CSC-1), amely a következő aminosav-szekvenciával rendelkezik:

Ala-Pro-Thr-Ala-Lys-Leu-Ala-Asn-Gly-V-
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-
Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-Pro-Phe-Ala-Glu-
Pro-Pro-Val-Gly-Asn-P

ahol V egy aminosav és P egy peptid, pontosabban a peptid fennmaradó része. A CSC-1-et 5,3-5,7 közötti izoelektromos pont és 55-65 000 közötti molekulatömeg jellemzi.

A találmány vonatkozik még egy másik, Candida rugosa lipázból izolált izoenzimre (a továbbiakban CSC-2), amely a következő N-terminális aminosav-szekvenciával rendelkezik:

Ala-Pro-Thr-Ala-Thr-Leu-Ala-Asn-Gly-Asp-
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-
Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-W-X-Ala-Glu-
Pro-Pro-Y-Z-Asn-Leu-Phe-Ile-ZZ-Leu-P

ahol W, X, Y,Z és ZZ aminosavak és a P a peptid fennmaradó része. Úgy találtuk, hogy a Candida rugosa lipázból nyert CSC-1 és CSC-2 izoenzimeknek különböző és gyakran ellentétes sztereoszelektivitása van. Ezek az izoenzimek, a CSC-1 és CSC-2 hasznosak a különféle észterek sztereoszelektiv hidrolizisekor, amint azt az alábbiakban leirjuk.

A Candida rugosa lipáza, amelyet itt akár önmagában, akár a jelzett izoenzimek elkülönitése céljára alkalmazunk, számos kereskedelmi forrásból beszerezhető. Annak ellenére,

hogy a kereskedelemben beszerezhető enzimek mind Candida rugosa-ból származnak , azok különböznek az izoelektromos fókuszálási profil szempontjából, és ugyancsak komoly különbségeket mutatnak a tartalmazott fehérjék koncentrációját illetően. Azt is észrevettük, hogy a kereskedelmi enzimkészitmények különböző fokú sztereospecifitást mutatnak észterek hidrolizise esetén. A kereskedelemben beszerezhető lipázok hidrolizis során fellépő sztereospecifitásbeli különbségei nyilvánvalóan a Candida rugosa lipázában jelen lévő számos fehérje koncentráció-variációnak tulajdonitható. Mivel a CSC-1 és CSC-2 izoenzimek valószinűleg minden bezserezhető Candida rugosa lipázában jelen vannak, bizonyos lipáz- preparátumok előnyösek az izoenzimek forrásaiként. A Meito Sangyo-tól származó MY lipáz előnyösen alkalmazható a CSC-1 és CSC-2 izoenzimek elkülönitésénél. Más lipázok, mint az AY lipáz és a Sigma lipáz szintén használhatók.

A CSC-1 és CSC-2 mintákat mikroszekvenáló technikával analizáltuk. A mikroszekvenálás azt mutatja, hogy a két frakció valójában két különböző termék, és nem egymás bomlástermékei. (Lásd a 13. példát). A mikroszekvenálás azt is mutatja, hogy nagy szekvencia-homológia van a CSC-1 és egy, a Torpedó californica-ból (elektromos angolna) származó acetil-kolinészteráz között. mindazonáltal amikor az angolna acetil-kolinészterázt vizsgáltuk HPPA észterek hidrolizálásának szempontjából, nagyon alacsony és sztereospecifitás nélküli aktivitást tapasztaltunk. (Lásd a 13. példát).

Ez aláhúzza azt a nem nyilvánvaló felismerést, miszerint az izoenzimek egyedülállóan hatékonyak a sztereospecifikus

aktivitásuk szempontjából. A két új izoenzim, a CSC-1 és a C CSC-2 sterkezetét a korábban már emlitett N-terminális aminosav-szekvenciájuk szemlélteti, amelyet a 13. példában mutatunk be.

A találmánnyal összhangban úgy találtuk, hogy a CSC-1 és CSC-2 izoenzimek, ha egy racém észterelegy hidroliziséhez használjuk őket, nagymértékben királis termékeket eredményeznek. A CSC-1-ről kimutattuk, hogy a 2- 4-hidroxi-fenoxi)--propionsav-metil- vagy -etil-észtereinek racém elegyeinél erősen sztereoszelektiv hidrolizist végez. (Lásd a 15. és 16. példát). A CSC-2 izoenzim különösen a ketoprofen észtereinek sztereoszelektiv hidrolizisekor mutatkozott különösen hatásosnak. A CSC-1 és CSC-2-őt alkalmazó észterhidroliziseket kétfázisú (vizes-szerves) reakcióközegben hajtjuk végre.

A CSC-1 és CSC-2 aktivitása jelentős mértékben változik, és egy adott reakció esetén az egyiket előnyben részesithetjük a másikkal szemben. Például a CSC-1 és CSC-2 egy összehasonlitása azt mutatta, hogy racém HPPA metil-észterének konverziósebessége sokkal nagyobb CSC-1 mint CSC-2 esetében, és az enantiomer felesleg is kissé nagyobb. Másrészről kitűnő eredményeket kaptunk, amikor a ketoprofen észtereit hidrolizáltuk CSC-2-vel. A CSC-2 izoenzim is jobb az MY lipáznál a ketoprofen észtereinek hidrolizálására, és a CSC-2-vel a hidrolizis sebessége is jelentősen nagyobb, mint a MY lipázzal, jóllehet magát a lipázt is lehet használni. (Lásd a 18. és 19. példákat). Egy izooktánnal vagy valamilyen hasonló oldószerrel (előnyösen szénhidrogénnel) készitett kétfázisú elegy hasonlóképpen kitűnő enantio-

mer felesleget adott. (Lásd a 18. példát). A CSC-1-nek, a CSC-2-nek és az MY lipáznak az összehasonlitása megmutatta a CSC-2 fölényét ketoprofen monoglicerid hidrolizise esetén, és ezenfelül kitűnő enantiomer felesleget is adott. (Lásd a 19. példát).

Szerves oldószerek előnyösen használhatók a ketoprofen metil-észterei vizoldhatóságának elősegitésére, a vizet általában pH 6-8 körülire szokták pufferolni. Mindazonáltal óvatosnak kell lenni, hogy a felhasznált oldószer vagy annak a mennyisége biztosan ne befolyásolhassa az eredményt. Igy például azt találtuk, hogy a ketoprofen észtereknek dimetil-formamidban (DMF) történő oldása a DMF mennyiségének növelésével káros hatással lehet a CSC-2 izoenzimre. A ketoprofen monoglicerid nagyléptékű hidrolizisénél is kis enantiomer felesleg mutatkozott, amikor jelentős mennyiségű DMF-t adagoltunk a rednszerbe. (Lásd a 20. és 21. példákat).

A találmány egy másik megoldása szerint az észtereknek CSC-2-vel történő hidrolizisét egy felületaktiv anyag jelenlétében is lehet végezni. Felületaktiv anyagként szereplő adalékanyag alkalmazásának előnye, hogy a DMF-nek az enantiomer feleslegre gyakorolt káros hatását meg lehet akadályozni, vagy minimálisra lehet csökkenteni. (Lásd a 22. példát). Előnyös felületaktiv adalékok az olajsav észterek, növényi olajok, állati olajok és egyéb oleátot tartalmazó felületaktiv anyagok.

Kevéssé poláros oldószereknek egy kétfázisú rendszerben, ketoprofen monoglicerid hidrolizisénél történő alkalmazása szintén előnyös a nagy reakciósebesség és enantiomer felesleg

biztositása szempontjából. (Lásd a 23. példát).

Az izoenzimeket vagy a lipázt számos módon lehet előnyösen immobilizálni, ezek mindegyike aktiv anyagot ad. Az immobilizált izoenzimeket királis savak előállitására lehet alkalmazni. Például a CSC-1 izoenzimet immobilizálni lehet, és számos észter hidrolizisében lehet alkalmazni. A CSC-1 izoenzimnek poliaziridin vagy Eupergit C alkalmazásával történő immobilizálása nagyon hatásos a hidrolizis szempontjából. (Lásd a 25. példát). A 33. példában látható, hogy a poliaziridines eljárással immobilizált CSC-1 esetében megnövekedett a katalizátor élettartam. Az immobilizálást egy szerves sav jelenlétében lehet véghezvinni. (Lásd a 29. példát). Azt is észrevettük, hogy a polivinilalkoholnak előnyös hatása van a lipáz CSC-1 immobilizálására, mivel a relativ aktivitás láthatóan lényegesen megnőtt ezen reagens adagolásával. (Lásd a 30. példát).

A CSC-2 izoenzim immobilizálására szolgáló egyik előnyös módszer szilikagélt használ. (Lásd a 24. példát). A 31. példán mutatjuk be a nyers MY lipáz immobilizálását.

A szerves savak is pozitiv hatást mutattak az immobilizálásra, amint azt a 26. példában az MY lipázzal bemutattuk. Bár a vizsgált savak mindegyike több-kevesebb aktivitást mutatott, úgy tűnik, hogy az előnyös savak azok, amelyek 12-18 szénatomot tartalmaznak, a sztearinsav igen előnyös. A sztearinsav hatása 5 %-os koncentráció alatt adagolástól függően, mig efölött az immobilizálásra állandósult hatást gyakorol. (Lásd a 27. példát). A sztearinsav védőhatásának finomabb vizsgálata azt mutatta,hogy 5 % sztearinsav az optimális a relativ aktivitás

szempontjából. Mindazonáltal más adagolások is hatásosak és alkalmazhatók. (Lásd a 28. példát).

A sztereospecifikus lipázok előállitásának egy másik módja azt mutatta, hogy a CSC-1 elkülönitésére használni lehet mind a kationos mind az anionos ioncserélőket. (Lásd a 34. példát).

A CSC-1 és CSC-2 izoenzimek hatásosak a 2-aril-propionsav--észterek hidrolizisénél, igy az ibuprofen-észtereknél, fenoprofen-metil-észternél, 2-fenil-propionsav-metil-észternél és indoprofen-monogliceridnél a bemutatott módszer szerint. Mint ahogyan az a 35. példában látható, az ibuprofent egy nem szteroid gyulladáscsökkentőt,hatékonyan bontottunk MY lipázzal, CSC-1-gyel és CSC-2-vel, a reakciósebesség és az enantiomer felesleg CSC-2-nél volt a legnagyobb. Fenoprofen-metil-észter, egy másik nem szteroid gyulladáscsökkentő esetében a CSC-1 és CSC-2 világosan nagy reakciósebességet és sztereoszelektivitást mutattak. (Lásd a 36. példát).

A ketoprofen és ibuprofen metil-észtereinek hidrolizisénél a tényleges sebesség CSC-2 esetében nagyobbnak mutatkozott, viszont a CSC-1 és CSC-2 azonos reakciósebességet mutatott fenoprofen esetében. (Lásd a 36. példát). A 37. példában látható a CSC-1 és CSC-2 alkalmazása 2-fenil-propionsav metil-észterének resolválásánál. Ismét a CSC-2 mutatta a jobb reakciósebességet és sztereoszelektivitást,bár mind a két izoenzim jobb volt, mint az MY lipáz, annak ellenére, hogy az MY lipázt jóval nagyobb mennyiségben használtuk.

Az indoprofen monogliceríd hidrolizise azt mutatta, hogy a CSC-2 olyan sztereospecifikus resolválást végzett, ahol az S-forma dominált, mig az MY lipáz és a CSC-1 esetében az R-forma dominált. (lásd a 38. példát).

A ketoprofen monogliceridnek CSC-2-vel történő hidrolizisénél egy felületaktiv anyag alkalmazása a relativ reakciósebesség növekedését eredményezte. Például Tween 80 hatásos volt, ha a reakcióelegybe adagoltuk marha szérumalbumin (BSA) jelenlétében vagy anélkül. (Lásd a 39. példát). Ezt a hatást tovább vizsgáltuk számos, különböző tipusú felületaktiv anyag esetében. A 40. példából látható, hogy a CSC-2 enzim reakciósebességének fő gyorsitói az olajsav-észterek. Az olajsav-észtereket különösképpen megvizsgáltuk, és úgy találtuk, hogy CSC-2 esetében ketoprofen monogliceridnél nőtt a százalékos enantiomer felesleg és a hidrolizissebesség. (Lásd a 41. példát). Más, olyan olajsav--származékokat is megvizsgáltunk, amelyek általában nem használatosak felületaktiv anyagokként, és úgy találtuk, hogy az olajsav és észterei növelik a reakciósebességet valamint az enantioszelektivitást. (Lásd a 42. példát).

Az olajsav-észterek a természetes olajokban is megtalálhatók. Ilyenformán a természetes olajokat is megvizsgáltuk a hidrolizisre gyakorolt hatásuk szempontjából. Az olivaolaj különösen fokozta a CSC-2 aktivitását. (Lásd a 43. példát). Azt is kimutattuk, hogy az olivaolaj és a kukoricacsira olaj természetes szubsztrátként is szerepelnek a CSC-2-t alkalmazó hidrolizisben, és átészterezödésben is előfordul. (Lásd a 44. példát.) Ilyenformán az átészterezödés olyannyira megnövelheti a gyengébb minőségű vagy nemkivánatos olajok értékét, amilyen értéke van, vagy szeretnénk

hogy legyen az olajsav-észtereknek. A találmány szerinti izoenzimeket ilyen gyengébb minőségű olajok hidrolizálására is fel lehet használni, hogy értékes savakat nyerjünk, amelyek ismert kémiai módszerekkel elválaszthatók. (Lásd a 44. példát). A természetben előforduló más triglicerideket is megvizsgáltuk. (Lásd a 45. példát). A vizsgált természetes olajok, amelyek glicerinészterek voltak, gyorsitó hatást gyakoroltak a CSC-2 aktivitására. A 46. példában látható, hogy számos olajsav-észter vagy olajsav adagolása megnöveli a ketoprofen észtereinek CSC-2-vel végzett hidrolizisének reakciósebességét és enantiospcificitását,és azt is jelzi, hogy az alkalmazott extrakciós eljárásnak olyannak kell lennie, hogy az elkülönitse az olajat, illetve az olajsavat a ketoprofentől. (Lásd a 46. példát).

Mindazonáltal, nem minden olaj fokozza a CSC-2 aktivitását minden szubsztrát esetében. Például az ásványolaj, egy szénhidrogén elegy, nem gyorsitotta a ketoprofen monoglicerid hidrolizisét. (Lásd a 47. példát). Az észterek vizsgálata során azt találtuk továbbá, hogy olajsav-észtereken és linolénsav-metil-észteren kivül másoknál nem fordult elő reakciósebesség növelés. (Lásd a 48. példát).

Olajsav esetében úgy találtuk, hogy az sebességnövelő hatással van mind az MY lipázra mind a CSC-2-re, de a CSC-1-re nem. Az olajsav szintén megnövelte az enantiomer felesleget a CSC-2 esetén, de nem olyen drámai módon, mint az MY lipáz esetén. (Lásd a 49. példát). Az olajsavat hatásosnak találtuk ketoprofen hidroxi-észterek hidrolizisének elősegitésére. Az olajsav effektust mind az MY lipázon mind a Biocatalyst B lipázán ész-

leltük. (Lásd az 50. példát). Olajsav jelenlétében jelentős javulás volt megfigyelhető ketoprofen (2-klór-etil)-észterének hidrolizisénél CSC-2 és MY lipáz esetében, és az enantiomer felesleg is ismét nőtt. (Lásd az 51. példát).

Más enzimeknek olajsavakkal illetve azok észtereivel együttesen lejátszatott hidrolizisét valamint a sebességnövelésre és az enantiomer feleslegre gyakorolt hatásukat vizsgálva azt kaptuk, hogy az OF lipáz és a Biocatalyst Candida lipáza hidroxi-észterek esetében drámai növekedést mutatott. Sertésmáj észterázzal hidrolizálva ezeket az észtereket, az ellentétes enantiomert kaptuk. (Lásd az 52. példát). Immobilizált CSC-2 alkalmazása ugyanolyan tipusú sebesség és enantiomer felesleg növelést mutatott, mint szabad CSC-2 esetén, ha olajsavat adtunk a rendszerbe. (Lásd az 53. példát).

Egy szerves oldószernek, mint például hexánnak az adagolása szintén jelentős sebességnövekedést mutatott, amikor növekvő olajsavkoncentráció volt jelen. A hexánban 1 % és 25 % közötti olajsavkoncentráció mutatkozott hasznosnak. Az előnyös tartomány 5 % és 15 % között van. (Lásd az 54. és 56. példát). A további oldószerek vizsgálata azt mutatta, hogy sem az aromás oldószerek (toluol) sem a klórozott oldószerek (kloroform) nem voltak előnyösek. Az alifás oldószerek azonban, igy a hexán és az izooktán jelentősen megnövelt reakciósebességet eredményezett. (Lásd az 55. példát). A további oldószervizsgálatok azt mutatták, hogy mind ketoprofen monoglicerid (KPG) mind ketoprofen etilénglikol (KPEG) észterek esetében az alifás oldószerek javuláshoz vezettek mind a reakciósebesség mind az enantiomer felesleg esetében. (Lásd az 56. példát).

Az Enzeco Rxx Candida rugosa lipáznak - amely izoelektromos fókuszálással (IEF) vizsgálva azonosnak tűnt a CSC-2-vel - valamivel magasabb a molekulatömege, és egészen eltérő sztereoszelektivitást adott. Az olajsavval általában sebesség növekedést tapasztaltunk a KPEG hidrolizisénél, de a KPG-nél nem. Ez azt jelenti, hogy önmagában vagy SDS-PAGE vagy IEF nem elegendő a különböző enzimek megkülönböztetésére. (Lásd az 57. ábrát).

Az MY lipázkészitmény szintén szétválasztható izoelektromos fókuszálással preparativ méretben, és CSC-1 és CSC-2 ezen a módon is kinyerhető. (Lásd az 58. példát).

A találmány szerinti alkalmazáshoz megfelelő lipáz immobilizálási módszerek a szakmában ismeretesek. Például a 4.436.813 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leirás közli enzimeknek vagy az azokat tartalmazó sejteknek az immobilizálását olyan prepolimer anyagok alkalmazásával, mint például a poliazetidin prepolimerek (például Polycup), karboxi--metil-cellulóz, polimetilén-izocianát és poliuretán hidrogél prepolimerek. Ezen anyagok bármyelyikét fel lehet használni a jelen célra a 4.436.813 számú szabadalmi leirásban ismertetett módon. Az enzimek immobilizálására szintén hasznosak a polimerizálható polifunkcionális aziridin prepolimerek, mint azt a 4.650.755 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leirásban és a 938.248 sorszámú szabadalmi bejelentésben leirják, amelyek tartalmát hivatkozásként kezeljük.

Az itt megadott példákban további immobilizáló anyagokat mutatunk be.

A következő példák a jelen találmány szemléltetését

szolgálják, de annak oltalmi körét nem korlátozzák:

1. példa

Három beszerzési forrásból (Meito Sangyo, Biocatalyst Ltd., és Amano) származó, kereskedelmi minőségű Candida rugosa lipázban jelen lévő fehérjéket vizsgáltunk SDS-PAGE módszerrel a molekulatömeg-profil meghatározása céljából. Az enzimkészitményeket 1 µg/ml koncentrációban oldottuk fel 1% SDS-t 0,05 M triszt (pH 8,0) valamint 1 % 2-merkapto-etanolt tartalmazó oldatban. A mintákat Phast rendszeren (Pharmacia LKB) analizáltuk, előregyártott 10-15 % közötti gradienssel rendelkező poliakril-amid gélek használatával. A fehérjét (0,2 µg - 2,0 µg/nyom) felvittük a gélre, és 73 volt·órát futtattuk 15 °C-on. A géleket etanol-ecetsav elegyben fixáltuk, és a fehérjét ezüsttel festve hivtuk elő Pharmacia előhivó kamra segitségével.

Mind az MY lipáz (Meito Sangyo) mind az AY lipáz (Amano) és a Candida cylindracea lipáz (Biocatalyst) esetében volt egy fő sáv a gélen 60 kilodalton molekulatömegnél. (Lásd az 1.ábrát). Mindazonáltal az is látható az 1. ábráról, hogy az AY lipáznál (2. és 5. nyom) egy másik fő sáv is volt.

2. példa

A kereskedelemben kapható MY lipáz összetételét vizsgáltuk CM- Trisacryl és DEAE-Trisacryl kromatográfiával.

0,33 MY lipázt (Meito Sangyo) oldottunk 10 ml 0,25 M Na_2HPO_4 oldatban (pH 7,0) és a szilárd részeket centrifugálással eltávolitottuk. A fehérjét egy 2,5x10 cm-es CM-Trisacryl M oszlopra

vittük fel, amelyet előzőleg ugyanezen pufferrel egyensúlyba hoztunk. Az áramlási sebességet 1,0 ml/perc-re állitottuk be. A gyantát ugyanezzel a pufferrel mostuk, amig a 280 nm-en mért abszorbció nulla nem lett. Ezen ioncserélő gyanta alkalmazásával egyetlen fehérjecsúcsot eluáltunk, amely az összes enzim-aktivitást tartalmazta.

5 g MY lipázt oldottunk fel 0,15 M NaCl-t és 0,01 M Na_2HPO_4-et (pH 7,3) tartalmazó oldatban, és a szilárd részeket centrifugálással eltávolitottuk. A fehérjét Sephadex G-25 gyantán kromatografálva sómentesitettük 25 mM Na_2HPO_4 oldattal (pH 7,0). A fehérjefrakciókat egyesitettük, és egy 25 mM Na_2HPO_4 oldattal (pH 7,0) egyensúlyba hozott 2,5 x 10 cm-es DEAE-Trisacryl M oszlopra vittük fel őket. Az eluciót ugyanezen pufferrel végeztük. Az összes enzimaktivitást és fehérjét egyetlen csúcsként eluáltuk. Ezeken az oszlopokon azt lehet feltételezni, hogy az MY lipázkészitményben egyetlen fajta fehérje van.

3. példa

Ez a példa mutatja be a 2-(4-hidroxi-fenoxi)- propionsav-metil-észterének (HPPA-Me) MY lipázzal történő hidrolizisét.

340 mg MY lipázt (Meito Sangyo), 4 g R,S-HPPA-metil-észtert és 200 ml 20 mM KH_2PO_4-et (pH 6,5-re beállitva) elegyitettünk 5,5 órán keresztül rázattuk.

A keletkezett sav analizisét úgy folytattuk le, hogy a vizes oldat pH-jának 6,5-re történő beállitása után (a hidrolizis során enyhe pH csökkenés történt) az észtert metilén-dikloriddal extraháltuk, amelyet a pH 2-re történő beállitása, majd

a savnak etil-acetáttal történő extrahálása követett. Az oldatot szárazra pároltuk, a maradékot vizben feloldottuk, és nagynyomású folyadékkromatográffal (HPLC), Macherey Nagel-Duren Resolvosil BSA-7 oszlopon megelemeztük 5 % propanolt tartalmazó 10 mM KH_2PO_4-oldat (pH 5) alkalmazásával 2,7 ml/perc áramlási sebességnél, és 220 nm-en végzett detektálással. Ezalatt az idő alatt az R,S-észter 35 %-a alakult át savvá. Az R és S savak aránya 94 % R és 6 % S volt.

4. példa

A Candida rugosából nyert, kereskedelmi forgalomban kapható lipázok sztereoszelektivitásának összehasonlitása.

MY lipázt (Meito Sangyo), Candida B lipázt (Biocatalyst, Ltd), OF lipázt (Meito Sangyo) és AY lipázt (Amano) hasonlitottunk össze sztereoszelektivitás szempontjából az R,S-HPPA-metil--észterből történő R-HPPA előállitása alapján. A készitményeket az 1. táblázatban megadott mennyiségekben 50 ml 50 mM KH_2PO_4 (pH=6,5) oldattal készitett 20 mM HPPA-metil-észter oldathoz adagoltuk. A reakcióelegyeket 25 ^{o}C-on 22 órán keresztül történő rázatással inkubáltuk. Az R és S savak arányát a 3. példában leirt nagynyomású folyadékkromatográfiás módszerrel határoztuk meg közelitőleg 16 %-os észterhidrolizisnél. Az eredmények az 1. táblázatban láthatók:

1. táblázat

Lipáz készitmény	Hozzáadott enzimmennyiség (mg)	R-sav (%)
MY lipáz	10,7	93
AY lipáz	10,6	93
B lipáz	9,4	69
OF lipáz	9,6	68

Mint azt már jeleztük, mind az MY lipáz mind az AY lipáz nagyobb sztereospecifitást mutatott, mint akár a B, akár az OF lipáz.

5. példa

Ez a példa a HPPA-Me MY lipázzal végzett kétfázisú hidrolizisét irja le.

2 g oldható MY lipáz enzimet adtunk 50 ml-nyi 1 mol/l (196 g/l) HPPA-Me-t tartalmazó toluol és 50 ml 1 M KH_2PO_4 (pH 7,0) oldat elegyéhez, és hagytuk, hogy az R,S észter savvá alakuljon. A sav relativ aránya ebben a kétfázisú (toluol-viz) rendszerben, az R,S észter 46 %-os hidrolizisénél 92 % R-sav és 8 % S-sav volt.

6. példa

MY lipázzal végzett kétfázisú hidrolizis optimalizálása különböző oldószer/viz elegyekben.

Mindegyik reakciót a következőképen játszattuk le:

A. 75 %-os szerves oldószer/25 % vizes puffer:

50 mg R,S-HPPA-Me-t egy 10 ml-es Scintillation fiolában 7,5 ml szerves oldószerrel, 2,5 ml 50 mM foszfát pufferrel (pH=6,0) és 5 mg MY lipáz enzimmel elegyitettünk. A reakcióelegyet rázókészülékre raktuk, és 0-43 óra közötti időn keresztül rázattuk, különböző időpontokban történő mintavétellel.

B. 25 % szerves oldószer/75 % vizes puffer:

50 mg R,S-HPPA-Me-t egy 10 ml-es Scintillation fiolában 2,5 ml szerves oldószerrel, 7,5 ml 50 mM foszfát pufferrel (pH=6,0) és 5 mg MY lipáz enzimmel elegyitettünk. A reakcióelegyet rázókészüléken rázattuk 0-143 óra közötti időn keresztül különböző időpontokban történő mintavétellel.

A 2. táblázatban bemutatjuk a megadott szerves oldószerek alkalmazásával kapott százalékos R-HPPA arányt és százalékos konverziót egy kétfázisú rendszerben, ahol a teljes vivőanyag (oldószer) térfogatának 75 %-a viz és a fennmaradó 25 % szerves oldószer volt.

2. táblázat

Oldószer	Oldószer %	Idő (óra)	Konverzió (észter/sav)	R %	Oldhatóság (HPPA-ME) mg/ml
Szén-tetraklorid	25	2,7	58	79	33,0
	75	2,7	61	76	
1,2-dibróm-etán	25	43	33	73	565,7
	75	43	23	57	
tetraklór-etilén	25	5,3	61	83	1,4
	75	5,3	58	85	
1,1,2-triklór-etán	25	43	29	79	558,0
trifluor-triklór-etán	25	5,3	49	100	oldhatatlan
	75	2,7	60	85	
xilolok	25	5,3	49	100	
	75	5,36	41	89	
toluol	25	2,7	385	100	236,3
	75	2,7	25	90	
aceton	25	43	0	0	nt
	75	43	0	0	nt
izopropil-alkohol	25	43	0	0	nt
	75	43	0	0	nt
kumol	25	2,7	35	100	20,0
ciklohexán	25	2,7	35	100	66,4
	75	2,7	31	83	
fluor-benzol	25	5,3	40	95	155,5
	75	5,3	29	86	
etanol	25	43	0	0	nt
	75	43	0	0	nt

Amint az látható, a legjobb eredményeket a kisebb oldószermennyiség alkalmazásával, aromás szénhidrogénekkel vagy vegyes fluor-klór szénhidrogénekkel, nevezetesen trifluor-triklór-etánnal értük el.

7. példa

Ezen a példán mutatjuk be az immobilizált MY lipáz alkalmazását a HPPA-Me hidrolizisében.

Az immobilizált lipázt, amelyet az előbb leirt módszerekkel állitunk elő, a HPPA-Me toluolos oldatával és foszfát-pufferrel (pH=6,5) együtt szobahőmérsékleten 60 órán keresztül rázattuk. A vizes oldatot ezután az R-HPPA-ra nagynyomású folyadékkromatográfiával megvizsgáltuk a 3. példa szerint. Az enzimet ionmentes vizzel mostuk, és egy új adaghoz hozzáadtuk.

A. MY lipáz immobilizálása Amberlite IRC-84-en vagy DP-1-en XAMA-7-tel.

1,10 g MY lipázt alaposan összekevertünk 2,5 g dehidratált Amberlite IRC-84-gyel vagy Amberlite DP-1-gyel és 0,85 g XAMA-7-tel valamint 2 ml 0,1 M foszfát pufferrel (pH=6,5). Az elegyet 4 órán keresztül szobahőmérsékleten állni hagytuk, mely idő alatt az enzim immobilizálódott. A katalizátort mostuk, és utána 4 ^{o}C-on tároltuk.

B. MY lipáz immobilizálása Amberlite DP-1-en Polycup-pal.

0,15 g MY lipázt, 0,5 g dehidratált Amberlite DP-1-et és 2 ml Polycup-ot 45 ^{o}C-on 4 órán keresztül melegitettünk. Az immobilizált enzimet mostuk, és HPPA-Me-vel megvizsgáltuk. Az immobilizáció mértéke 40 % volt.

C. MY lipáz immobilizálása nátrium-perjodáttal aktivált cellulózgyöngyökön.

0,15 g MY lipázt és 1 g nátrium-perjodáttal ($NaIO_4$) aktivált cellulózgyöngyöt 5 ml foszfáttal pufferolt konyhasó oldatban (PBS) rázattunk szobahőmérsékleten 20 órán keresz-

tül. Az immobilizált enzimet kiszűrtük, mostuk és HPPA-Me-vel megvizsgáltuk. Az immobilizáció mértéke 90 % volt.

D. MY lipáz immobilizálása kitinen glutáraldehiddel

0,25 g lipázt, 0,5 g kitint és 500 µl 50 tömeg %-os glutáraldehidet rázattunk 10 ml foszfáttal pufferolt konyhasó oldatban (PBS) szobahőmérsékleten 20 órán keresztül. Az immobilizált enzimet kiszűrtük, mostuk és HPPA-Me-vel megvizsgáltuk. Az immobilizáció mértéke 67 % volt.

E. MY lipáz immobilizálása hexán-diamin-cellulóz gyöngyökön glutáraldehiddel.

0,25 g MY lipázt, 1 g hexán-diamin-cellulóz gyöngyöt és 500 µl glutáraldehidet (50 %-os) rázattunk 5 ml foszfáttal pufferolt konyhasó oldatban szobahőmérsékleten 20 órán keresztül. Az immobilizált enzimet kiszűrtük, mostuk és HPPA-Me-vel megvizsgáltuk. Az immobilizáció mértéke 54 % volt.

F. MY lipáz immobilizálása polietilén-imin (PEI)-cellulóz gyöngyökön glutáraldehiddel.

A PEI-cellulóz gyöngyök előállitása 10 g dehidratált cellulózgyöngynek, 3 g polietilén-iminnek (PEI) (50 %-os), 2 g ciánursav-kloridnak és 2,5 ml trietil-aminnak 20 ml acetonitrilben 40 ^{o}C-on, 20 órán át történő kevertetéséből állt. A gyöngyöket ezután kiszűrtük és egymás után 200-200ml 0,01 M sósavoldattal, metanollal, 0,05 M nátrium-hidroxid-oldattal, metanollal és ionmentes vizzel mostuk. 0,25 g

MY lipázt 2 g polietilén-imin-cellulóz gyönggyel, 500 µl glutáraldehiddel 10 ml foszfáttal pufferolt konyhasó oldatban szobahőmérsékleten 24 órán keresztül történő rázatással immobilizáltunk. Az immobilizált enzimet kiszűrtük, mostuk, és HPPA-Me-vel megvizsgáltuk. Az immobilizáció mértéke 71 % volt.

G. MY lïpáz immobilizálása polietilén-imin-cellulóz gyöngyökön ciánamiddal.

0,25 g MY lipázt, 1 g polietilén-imin-cellulóz gyöngyöt (a fenti F pont szerint) és 0,25 g ciánamidot 10 ml foszfáttal pufferolt konyhasó oldatban 4 ^{o}C-on 65 órán keresztül rázattunk. Az immobilizált enzimet kiszűrtük, mostuk, és HPPA-Me-vel megvizsgáltuk. Az immobilizáció mértéke 34 % volt.

H. MY lipáz immobilizálása polietilén-imin-cellulóz gyöngyökön (a fenti F pont szerint) toluol-2,4-diizocianáttal.

0,25 g MY lipázt, 1 g polietilén-imin-cellulózgyöngyöt és 10 mg toluol-2,4-diizocianátot 5 ml foszfáttal pufferolt konyhasó oldatban szobahőmérsékleten 20 órán keresztül rázattunk. Az immobilizált enzimet kiszűrtük, mostuk és HPPA-Me-vel megvizsgáltuk. Az immobilizáció mértéke 4,4 % volt.

8.példa

Ezen a példán mutatjuk be redukáló anyagoknak HPPA jelenlétében a lipáz stabilitására gyakorolt hatását.

A HPPA-Me aszimmetrikus hidrolizisét az 5. példában használt kétfázisú, vizes-szerves rendszerben hajtottuk végre. Az észter főként a szerves fázisban volt, mig az enzim és a sav túlnyomórészt a vizes fázisban.

Megvizsgáltuk a nátrium-ditionit(3. táblázat), a nátrium-szulfit (4. táblázat), a cisztin (5. táblázat) és különböző egyéb redukáló anyagok (6.táblázat) hatását. A nátrium-ditionit hatékonynak mutatkozott az enzimaktivitás csökkenésének megakadályozására. Sem a nátrium-szulfit sem a cisztin nem volt hatékony az enzimaktivitás csökkenésének megakadályozására.

5 g MY lipázt immobilizáltunk Amberlite DP-1-en 2,5 g XAMA-7-tel. 0.89 g immobilizált enzimet (150 mg nyers enzimmel egyenértékű mennyiséget) rázattunk 4 napon keresztül 2,5 ml 1M HPPA oldattal (foszfáttal pufferolva, pH=6,5), amely 2, 4, 8 illetve 16 mg/ml redukáló anyagot tartalmazott. Cisztint, nátrium-foszfinátot, (tetrabutil-ammónium)-bórhidridet, (tetrabutil-ammónium)-ciano-bórhidridet, nátrium-szulfitot és nátrium-ditionitot vizsgáltunk. Az immobilizált enzimet ezután ionmentes vizzel mostuk, és HPPA-Me-vel vizsgáltuk. A kezdetben immobilizált enzimet használtuk kontrollként a HPPA-val kezelt enzim maradék aktivitásának kiszámitásához. A HPPA-val kezelt lipáz aktivitásának 70 %-a maradt meg, ha nem használtunk redukálószert.

3. táblázat

Adag sorsz.	Reakció-idő (óra)	HPPA-Me konv. (mM)	$Na_2S_2O_4$ (mg) 0	2,5	5	10	25	50
			HPPA-Me → HPPA konverzió (%)					
1	15	10	33	37	36	30	25	24
3	15	10	25	29	29	21	21	17
7	15	10	20	30	27	25	25	25
11	15	10	13	21	24	31	34	33
14	15	10	19	21	22	21	23	23
18	15	10	18	16	17	19	29	33
22	15	10	12	14	13	13	18	23
30	15	10	13	17	17	17	31	38

(1) 180 mg MY lipázt immobilizáltunk 2 ml IRC-84-en 90 mg XAMA-7-tel, a 7. A. példa eljárása szerint.

(2) HPPA-Me/toluol = 1 M/ 10 ml, 20 ml 0,25 M/ 7 pH-jú foszfátpufferrell.

4. táblázat.

Adag sorsz.	Reakció-idő (óra)	HPPA-Me konc., (mM)	Na_2SO_3 (mg)					
			0	2,5	5	10	25	50
			HPPA-Me → HPPA konverzió (%)					
33	15	10	28	39	20	26	32	25
7	15	10	13	17	14	20	17	25
9	15	10	13	14	11	16	13	18
12	15	10	14	16	12	14	12	18
14	15	10	13	13	9	13	10	16
18	15	10	16	14	10	14	12	12
19	15	10	13	13	11	15	12	13
20	15	10	14	14	10	14	11	14

(1) 200 mg MY lipázt immobilizáltunk 2 ml IRC-84-en, 100 mg XAMA-7-tel, a 7. A. példa eljárása szerint.

(2) HPPA-Me/toluol = 1 M/10 ml, 20 ml 0,25 M =7 pH-jú foszfát-pufferrel.

5. táblázat

Adag sorsz.	Reakció-idő (óra)	HPPA-Me (mM)	Cisztin, mg 0	2,5	5	10	25
1	15	10	36	30	34	35	36
5	15	10	27	-	31	28	26
9	15	10	14	19	11	16	16
15	15	10	17	19	17	16	17
16	15	10	19	17	16	15	13
20	15	10	19	16	16	17	16
21	15	10	15	20	18	15	17
22	15	10	17	20	17	17	17

(1) 240 mg MY lipázt immobilizáltunk 2 ml IRC-84-en 120 mg XAMA-7-tel a 7.A. példában megadott eljárás szerint.

(2) HPPA-Me/toluol = 1 M/10 ml, 20 ml 0,25 M 7 pH-jú foszfát-pufferrel.

6. táblázat

	Koncentráció (mg/ml)	Relativ aktivitás (%)
Cisztin	2	83
	4	76
	8	81
	16	83
NaH_2PO_2	2	84
	4	81
	8	91
	16	91
Bu_4N $CNBH_3$	2	83
	4	81
	8	88
	16	85
Bu_4N BH_4	2	-
	4	-
	8	78
	16	79
Na_2SO_3	2	95
	4	101
	8	110
	16	111
$Na_2S_2O_4$	2	-
	4	-
	8	111
	16	112

Kontroll enzim 100 %-nál

HPPA-val kezelt enzim 70,4 %-nál

9. példa

Ez a példa mutatja be a kapott immobilizált MY lipáz enantioszelektivitásának növekedését többszöri használat során.

20 g nyers MY lipázt (Meito Sangyo Ltd) elegyitettünk 20 ml 25 mM acetátpufferrel (pH=6,5), és 10 percig kevertük. Ezután 10 g XAMA-7 poliaziridin prepolimert (Cordova Chemical Co) adtuk lassan hozzá, majd az elegyet egy percig kevertük. Ezután 40 g Amberlite DP-1 ioncserélő gyantát (Rohm-Haas) adtunk állandó keverés közben az elegyhez egy perc alatt. Az elegyet azután 4 ^{o}C-on 12 órán át állni hagytuk, hogy a polimerizáció befejeződjön. A kapott, szabadon folyó gyöngyöket, amelyek az immobilizált lipázt hordozó poliaziridinnel bevont Amberlite-ból álltak, ötszörös térfogatú 25 mM ammónium-acetát pufferrel (pH =6,5) mostuk. Ilyenformán 160 ml immobilizált MY lipáz katalizátort kaptunk.

Ezen immobilizált katalizátor segitségével egy sorozat reakciót játszattunk le. Minden egyes adag 2 mól R,S-metil-2--(4-hidroxi-fenoxi)-(propionátot) (HPPA--Me), 14 mól toluolt, 214 mól ionmentes vizet, 2 mól ammónium-acetátot és 0,017 mól nátrium-ditionitot tartalmazott. A pH-t foszforsav segitségével 6,5-re állitottuk be. A reakcióelegyet ezután 12 órán át kevertük, hogy biztositsuk a HPPA-Me tökéletes oldatba vitelét az immobilizált MY lipáz hozzáadása előtt.

Ezután szubsztráthoz hozzáadtuk az immobilizált MY lipázt, és a keverést addig folytattuk, amig a hidrolizis során legalább 0,8 mól HPPA keletkezett. A vizes fázisból időközönként mintát vettünk, és azokat a 3. példa szerint analizáltuk. Amikor

a HPPA-Me HPPPA-vá történő konverziója elérte a 40 %-ot (800 mmol HPPA keletkezett), az enzimgyöngyöket szűréssel eltávolitottuk a rendszerből, és egy új szubsztrát adaghoz adtuk hozzá azokat.

A reakció leállitásakor kapott analitikai eredményeket nyolc különálló, egymás után ugyanazon immobilizált MY lipáz alkalmazással feldolgozott adagra az alábbiakban adjuk meg.

7. táblázat

Adag sorsz.	Hidrolizis idő (óra)	Teljes hidrolizis (mól)	R-HPPA (%)	S-HPPA (%)
1	120	1	82	18
2	130	1	90	10
3	140	1	91	9
4	90	0,88	98	2
5	95	0,80	98	2
6	140	0,8	99	2
7	100	0,8	100	0
8	100	0,8	100	0

A fentiek alapján nyilvánvaló, hogy az immobilizált MY lipáz sztereoszelektivitása a nyolc adag során folyamatosan nőtt, mig az immobilizált MY lipáz aktivitása (százalékos hidrolizis) valamelyest csökkent. Mig az első adagban a HPPA-Me-nak HPPA-vá történő hidrolizise 82 % R-HPPA-t és 18 % S-HPPA-t eredményezett, addig mind a hetedik, mind a nyolcadik adagban a

a konverzió 100 % R-HPPA és 0 % S-HPPA volt. Annak ellenére, hogy az aktivitás egy kicsit csökkent, ez nem volt számottevő hátrány. A legfontosabb tényező a megnövekedett sztereospecifitás, mivel egy ipari eljáráshoz általában 95 % feletti enantiomer feleslegre van szükség.

10. példa

Ez a példa a Candida rugosa lipáz összetétel-profil meghatározása céljából végzett izoelektromos fókuszálását irja le.

A Meito Sangyo,a Biocatalyst Ltd és az Amano kereskedelemben kapható Candida rugosa lipázát izoelektromos fókuszálással vizsgáltuk az összetétel-profil meghatározása céljából. Nettó elektromos töltésen alapuló proteinszétválasztást végeztünk izoelektromos fókuszálással előregyártott izoelektromos fókuszáló (IEF) gélek felhasználásával pI 3 és 9 között egy Phast rendszerrel (Pharmacia LKB). Az enzimkészitményeket ionmentes vizben oldottuk, és az izoelektromos fókuszálás előtt 3 órán keresztül dializáltuk. 0,1 mg/nyom-2,0 mg/nyom közötti fehérjemennyiséget vittünk fel a gélre, és 15 ^{o}C-on 590 volt·órát futtattuk. A gélt 10 %-os triklór-ecetsavban fixáltuk, és utána a fehérjét egy Pharmacia előhivó kamra segitségével, ezüst-festéssel előhivtuk. Az enzimek pI-ját ismert pI-jű standardokkal történő összehasonlitással határoztuk meg.

Az MY lipáz (Meito Sangyo) és az AY lipáz (Amano) nagyon hasonló profilokat mutatott (lásd a 2. ábrát). Mindegyiknek

4 fő fehérje sávja volt, egy pI 5,5-nél, kettő pI 4,0 közelében és egy pI 3,5 közelében. Az OF lipáznak (Meito Sangyo) és a Candida rugosa lipáznak (Biocatalyst) eltérő prfilja volt, pI 4,0 közelében 4-5 fehérjesávval. Ezekből a készitményekből hiányzott a pI 5,5 körüli enzimsáv.

11. példa

Ez a példa a Candida rugosa-ból nyert MY lipáz két izoenzim frakcióra történő szétválasztását (SP-Trisacryl kromatográfia) irja le.

1 g MY lipázt (Meito Sangyo) 60 ml ionmentes vizben feloldottunk, és 2 l 0,025 M nátrium-dihidrogén-foszfát oldattal (pH=3,3) szemben 16 órán keresztül dializáltuk. Az oldhatatlan anyagot centrifugálással eltávolitottuk, és a pH-t ezután 3,5-re ismét beállitottuk. Egy 2,5 x 10 cm-es SP-Trisacryl (IBF-Biotechnics) ioncserélő oszlopot készitettünk, és azt 0,025 M nátrium-dihidrogén-foszfát oldattal (pH=3,3) egyensúlyba hoztuk (inditó puffer). Az oldható lipázt ezután felvittük az oszlopra, és a meg nem kötött anyagot az inditópufferrel a gyantáról eluáltuk. A lipáz frakciók (izoenzimek) szétválasztását pH gradienslépcsőkkel végeztük 0,07 M citrát, 0,015 M nátrium-foszfát puffer segitségével. Az eluálást a fenti pufferrel végeztük pH 4,75-ön, hogy eluáljuk az enzimaktivitást hordozó anyagot, a CSC-2-t, egészen addig folytatva a mosást, amig az A_{280} vissza nem tért az alapvonalra. Ezután a CSC-1 lipázfrakciót eluáltuk 150 ml citrát-foszfát pufferrel pH 6,80-on. A fehérje eluciós profilját a 3. ábrán mutatjuk be. Mindegyik fehérjét tartalmazó frakciót izoelektromos fókuszálással

futtatuk (lásd a 4. ábrát). A CSC-1 pI-je közelitőleg 5,5 volt, mig a CSC-2 pI-je közelitőleg 4,4 volt.

12. példa

Ez a példa a Candida rugosából nyert sztereospecifikus lipáz SP- Sephadex kromatográfia segitségével végzett előállitását irja le.

60 ml ionmentes vizben feloldott 1,3 g MY lipázt (Meito Sangyo) dializáltunk 2 liter 7 mM citrát - 15 mM Na_2HPO_4 oldattal (pH=3,3) szemben. A kromatográfiát megelőzően a nyers enzimoldat pH-ját 3,3-re állitottuk be. A fehérjét ezután egy 2,5 x 20 cm-es SP-Sephadex oszlopra vittük fel, amelyet előzőleg a fenti, citrát-Na_2HPO_4 pufferrel hoztunk egyensúlyba 60 ml/óra adagolással 25 ^{o}C-on. Az oszlopot ezután a fenti puffer 120 ml-évei mostuk. A lépcsőzetes eluálást növekvő pH-jú pufferrel végeztük. Először az oszlopot 100 ml 7 mM citrát, 15 mM Na_2HPO_4 pufferrel (pH=4,7) eluáltuk a CSC-2 lipáz kinyerése céljából (lásd az 5. ábrát). Ezután az oszlopot 100 ml 7 mM citrát - 15 mM Na_2HPO_4pufferrel (pH=6,8) eluáltuk. Ez a puffer oldotta le a CSC-1-nek nevezett enzimfrakciót tartalmazó frakciót.

Egy 3-9 gélen végzett izoelektromos fókuszálásos analizis alapján ezen oszlopfrakciók mindegyike egyetlen fő fehérjesávot tartalmazott. A pH 4,7-es pufferrel eluált sávnak a pH-ja 4,4 volt, és ezt CSC-2-nek neveztük el. A pH 6,8-on eluált sáv pI-je 5,2 volt, és azt CSC-1-nek neveztük el.

13. példa

A Candida rugosa lipázából nyert CSC-1 és CSC-2 izoenzimek aminosav összetételének és szekvenciájának analizise.

A CSC-1 és CSC-2 tisztitási eljárásához tartozik induláskor az MY lipáz oldhatóvá tétele 50 g/l mennyiségben 25 mM nátrium-dihidrogén-foszfátban (végső pH=6,5). 2-3 órás 4 ^{o}C-on végzett keverés után a mintát centrifugáltuk (10000 ford/perc; 10 percen keresztül), és a szilárd anyagot oldottuk. A felülúszó fázis pH-ját foszforsavval 3,0 - 3,2-re csökkentettük, és a felülúszót üreges szálú készülékben dializáltuk, vagy egy 25 mM dinátrium-hidrogén-foszfáttal (pH=3,2) egyensúlyba hozott Trisacryl GF-05 oszlopon sótalanitottuk. A mintát ezután egy pH 3,2-nél egyensúlyba hozott SP-Trisacryl oszlopra vittük fel. Ezután az oszlopot mostuk (25 mM; pH 3,2) és egymás után pH 4,8-as és 6,8-as citrát/nátrium-foszfát pufferrel (McIlvaine pufferek, közelitőleg 25 mM) eluáltuk. Mindegyik puffer tartalmazott 0,02 % nátrium-azidot. A fenti pufferrendszereket 25 mM nátrium-acetáttal is helyettesiteni lehet, a pH beállitásához ecetsavat használva. A puffer és a pH cserét a Trisacryl GF05 oszlopon is el lehet végezni. Ezt az oszlopot desztillált vizzel is lehet futtatni. Az enzimek fő sávjait az SDS-PAGE Phast géleken 55 000-60 000 molekulatömegnél lokalizálódva találtuk meg. Ez a sáv meglehetősen diffúz volt, és izoelektromos fókuszálás segitségével jobban tudtuk jellemezni. Az izoelektromos fókuszáló géleken Phast rendszerben (pH tartomány=3-9) futtattuk, és azok azt mutatták, hogy a pH 4,8-nál kapott (első) eluációs csúcsnak (CSC-2) a pI-je közelitőleg 4,4,

mig a CSC-1-nek bázikusabb pI-je van (közelitőleg 5,2). Ezeket a sávokat láthatóvá tettük, és azok a gél tetején (savas végénél) (CSC-2) vagy a közepéhez közel (CSC-1) helyezkedtek el. Az izoelektromos fókuszáló géleket egy standard Phast rendszer programmon futtattuk maximálisan 2 000 voltot, 3,5 wattot használva, összesen 500 volt·órát.

A CSC-1 és CSC-2 mintákat tovább tisztitottuk üreges szálú koncentrálással (membránszűrés) (CD Labòratories) illetve a CSC-2 esetében egy SP-Trisacryl-on végrehajtott második kromatografálással. Az ilyenformán előllitott CSC-1 egy fő sávból állt az izoelektromos fókuszáló géleken. A CSC-2 viszont 4 vagy még több sávot is tartalmazott, amelyet az MY lipázban jelenlevő összes egymáshoz közelálló savas sáv is alátámasztott.

A felhasznált CSC-2 egy fő sávot tartalmazott. A gél fényképe (lásd a 6. ábrát) egy pH 3-9-es Phast gélt mutat be, amelyet 20 %-os triklór-ecetsavban fixáltunk, és ezüst festéssel hivtunk elő. Mindegyik mintát desztillált vizzel higitottuk, és 1 µl/nyom mennyiségben vittük fel azokat a gélre. Az 1. és 8. vonalak voltak az izoelektromos koncentrálás pI standardjai. Ezek a fehérjestandardok és az izoelektromos pontjaik a következők voltak; amiloglükoszidáz (3,5), metilvörös (3,75), szója tripszin inhibitor (4,55), béta-laktoglobulin A (5,2), marha karbonsavanhidráz (5,85), humán karbonsavanhidráz B (6,55), ló mioglobin (6,85 és 7,35), lencse lektin (8,15; 8,45 és 8,65) és tripszinogén (9,3). A 2. és 3. vonalak az MY lipázé (sótalanitás/tisztitás nélkül) voltak. A 4. és 5. vonalak a CSC-1-é, a 6. és 7. vonalak a CSC-2-é voltak. Mivel a

fehérjék extinkciós koefficiensei ismeretlenek voltak, és az abszorbció 280 nm-en mesterségesen magas volt a zavaró kromofor anyagok miatt, a fehérje tartalmat úgy számitottuk ki, hogy 100 µl fehérjeoldatot adtunk 3 ml Pierce reagenshez, és lo perc elteltével 595 nm-en meghatároztuk az optikai sűrűséget (a spektrofotométer referenciamintája a reagens volt). Ilyenmódon 50 mg MY lipáz 1 ml-ben 0,4-es optikai sűrűséget adott 595 nm-en (400 µg/ml vagy 1,8 % fehérje). 1,2 mg CSC-2 1 ml vizben 0,34-es optikai sűrűséget adott 595 nm-en (340 µg/ml vagy 28 % fehérje).

A CSC-1 és CSC-2 aminosav összetétele a 8. táblázatban látható.

8. táblázat

CSC-1 és CSC-2 aminosav analizise

Aminosav	CSC-1 összetétel (%)	CSC-2 összetétel (%)
Alanin	9,57	8,05
Arginin	3,62	3,5
Aszparaginsav/aszparagin	11,29	12,8
Cisztin/2	n.m.	n.m.
Glutaminsav/glutamin	10,76	10,6
Glicin	9,7	10,3
Hisztidin	1,78	1,39
Izoleucin	4,6	4,46
Leücin	7,9	8,3
Lizin	4,5	4,38
Metionin	1,58	1,99
Fenilalanin	4,3	5,0
Proline	3,0	6,59
Szerin	10,9	7,9
Treonin	7,0	6.2
Triptofán	n.m.	n.m.
Tirozin	3,49	3,38
Valin	5,79	4,9

* 20 órás 6 M HCl-0,05 % 2-merkapto-etanolos hidrolizis 115 ^{o}C-on; a savhidrolizis előtt egy fenolkristályt adunk a rendszerbe. A szerintartalmat 10 %-kal, a treonintartalmat 5 %-kal megnöveltük, hogy a sav okozta bomlást kompenzáljuk.

n.m. = nem mértük.

Egy CSC-1 mintát tovább tisztitottunk egy C_4 forditott fázisú oszlop és egy viz/0,07 % trifluor-ecetsav, acetonitril/0,7 % trifluor-ecetsav oldószer rendszer segitségével A rendszerben a fehérjék eluciója 20-50 % acetonitril gradiensnél következett be. A CSC-2-t 45 - 75 % acetonitril gradienssel oldottuk le ugyanolyan körülmények között, mint amilyeneket a CSC-1-re megadtunk. A CSC-1-et és CSC-2-t ezután elektroforézissel szétválasztottuk, egy PVDF (Millipore) szűrőre vittük, és a 60 000 daltonnál mozgó sávot szekventáltuk. A CSC-1-nél a 10-es helyzetű aminosavat nem lehetett biztonsággal azonositani, bár az valószinűleg triptofán lehetett, de ezt a szekvenálás körülményei között elég nehéz azonositani, feltehetőleg a nem tökéletes karboxi-metilezés következtében.

Az új izoenzimek, a CSC-1 és CSC-2 összetételét N-terminális aminosavszekvenciájukkal szemléltetjük a következők szerint:

CSC-1

```
 1                   5                  10
Ala- Pro-Thr-Ala-Lys-Leu-Ala-Asn-Gly-(?)

 11                  15                 20
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-

 21                  25                 30
Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-Pro-Phe-Ala-Glu-

 31                  35
Pro-Pro-Val-Gly-Asn
```

CSC-2

```
 1                  5                        10
Ala- Pro-Thr-Ala-Thr-Leu-Ala-Asn-Gly-Asp

 11                 15                       20
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-

 21                 25                       30
Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile- X - X -Ala-Glu-

 31                 35                  39
Pro-Pro- X - X -Asn-Leu-Phe-Ile-Leu
```

Nagyon erős szekvencia homológia figyelhető meg a CSC-1 és az CSC-2 esetében, mivel ezek az enzimek csak az 5- és 10--helyzetű aminosavakban különböznek, amennyire szekvenciájukat pillanatnyilag ismerjük.

Azt is észrevettük, hogy nagyfokú szekvencia homológia van a CSC-1 és a Torpedo californica acetil-kolinészteráza (AcEs) között, amint az az alábbiakban látható:

```
                                                  4
CSC-1                    Ala-Pro-Thr-Ala-
AcES  Asp-His-Ser-Glu-Leu-Leu-Val-Asn-Thr-Lys-
        1                                        10

        5                        10              14
CSC-1 Lys-Leu-Ala-Asn-Gly-(?)-Thr-Ile-Thr-Gly-
AcES  Ser-Gly-Lys-Val-Met-Gly-Thr-Arg-Val-Pro-
        11                                       20

        15                       20              24
CSC-1 Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-Glu-Ala-Phe-Leu-
AcES  Val-Leu-Ser-Ser-His-Ile-Ser-Ala-Phe-Leu-
        21                                       30

        25                       30              34
CSC-1 Gly-Ile-Pro-Phe-Ala-Glu-Pro-Pro-Val-Gly-
AcES  Gly-Ile-Pro-Phe-Ala-Glu-Pro-Pro-Val-Gly-
        31                                       40

        35
CSC-1 Asn-
AcES  Asn-
        41
```

Mindazonáltal a T. californica acetil-kolinészteráz a következő vizsgálatoknak megfelelően nem hidrolizálta a HPPA-Me-t sztereoszelektiven R-HPPA-vá. 200 ml KH_2PO_4 oldatot (pH=6,5) elegyitünk 400 mg HPPA-Me-rel és 500 egység T. californica acetil-kolinésztárazzal. A rekacióelegyet 24 órán keresztül rázattuk, és azután a 3. példa szerint megmintáztuk és analizáltuk. Nagyon kis hidrolizációs aktivitást lehetett megfigyelni.

14. példa

MY lipáz izoenzimek nagy léptékű szétválasztása SP-Trisacryl alkalmazásával.

Egy 1o x 25 cm-es SP-Trisacryl LS oszlopot 25 mM NaH_2PO_4 oldattal (pH=3,0) (A puffer) egyensúlyba hoztunk. 150 mg nyers MY lipázt (Meito Sangyo) 3,0 liter 25 mM NaH_2PO_4 oldatban (pH= 6,5) két óra alatt feloldottunk. A szuszpenziót 10 000 g-vel centrifugáltuk 20 percen keresztül. Az oldható frakciót 1,66 M foszforsav-oldattal pH 3,0-ra állitottuk. Az enzimoldatot szűrtük, és 3 ór'n keresztül 100 térfogatrésznyi ionmentes vizzel szemben dializáltuk. Az enzimoldatot ezután 1,25 l/h adagolással felvittük az ioncserélő oszlopra. A meg nem kötött anyagot az A pufferrel lemostuk az oszlopról. Kétlépcsős pH eluálást végeztünk, először 5 liter 7 mM citromsav/ 15 mM Na_2HPO_4-tal (pH=4,80), amelyet 5 l 7 mM citromsav/15 mM Na_2HPO_4 (pH=6,80) követett. A kapott kromatogram a 7. ábrán látható. A pH 6,8-as pufferrel eluált fehérjecsúcsot összegyűjtöttük, és egy üreges szálú berendezésben

(Amicon) ultraszűréssel betöményitettük. Erről az oszlopról az 1,35 g CSC-1 lipáz egész mennyiségét visszanyertük. Izoelektromos fókuszálással vizsgálva ez a fehérje azonos volt a 11. példában előállitott CSC-1 lipázzal.

15. példa

HPPA-metil-észter hidrolizise CSC-1 lipázzal.

25mmol R,S HPPA-metil-észtert 25 ml 50 mM Na_2HPO_4 -oldatban hidrolizáltunk 25 ^oC-on 50 µg CSC-1 lipáz enzimmel (lásd 11. példa). Egy óra reakcióidő után mintát vettünk, és azt nagynyomású folyadékkromatográfiával analizáltuk, amelynek során az R és S savakat szétválasztottuk, és a megfelelő koncetrációkat meghatároztuk. Egy Resolvosil-BSA-7 (Macherey-Nagel) analitikai oszlopot (4 x 150 mm) használtunk 10 mM KH_2PO_4 (pH=5,0)/5 % propanol oldattal, mint mozgó fázissal 2,0 ml/perc adagolás mellett. Ekkor a reakcióelegy 2,9 mM R-savat tartalmazott, S-sav nem volt kimutatható.
A reakciót a racém észter 46 %-os konverziójáig hagytuk lezajlani, amikorra a képződött savak aránya 97 % R-sav és 3 % S-sav volt.

16. példa

HPPA-etil-észter hidrolizise szabad CSC-1 lipázzal.

25 ml (20 mmol) R,S-HPPA-etil-észtert hidrolizáltunk. 50 mM Na_2HPO_4 oldatban (pH=6,5) 25 °C-on 1 mg CSC-1 enzimmel 1 óra reakcióidő után mintát vettünk, nagynyomású folyadékkromatográfiával analizáltuk, hogy meghatározzuk az R és S savak koncentrációját. Egy Resolvosil-BSA-7 (Macherey-Nagel) analitikai oszlopot használtunk 10 mM KH_2PO_4 (pH=5,5)/ 5 % propanol oldattal, mint mozgó fázissal 2,0 ml/perc adagolás mellett. Egy óra múlva a racém észter 30 %-os hidrolizise zajlott le, és a keletkezett sav enantiomer tisztasága 98 % R-sav és 2 % S-sav volt.

17. példa

CSC-1 és CSC-2 összehasonlitása a HPPA-metil-észter hidrolizisénél.

25 ml 100 mM kálium-dihidrogén-foszfát pufferrel (pH=6,5) készitett 25 mM HPPA-Me oldatot töltünk két 100 ml-es Erlenmeyer lombik mindegyikébe. Az egyik lombikba CSC-1-et adagoltunk (50 µl, SP-Trisacryl oszlopról eluált frakciót, lásd a 11. példát), mig a másikba CSC-2-t (50 µl, SP-Trisacryl oszlopról származó frakciót, lásd a 11. pédát). A reakcióelegyből az alábbiaknak megfelelően mintát vettünk és a 3. példa szerint analizáltuk a következő eredménnyel:

9. táblázat

Idő (óra)	CSC-1 Konverzió (%)	CSC-1 R-HPPA (%)	CSC-2 Konverzió (%)	CSC-2 R-HPPA (%)
1	4	100	5	97
2	11	100	7	96
3	17	100	8	97
5	25	99	13	96
22	52	97	40	93
30	-	-	49	91

Amint azt már emlitettük, a racém HPPA-metil-észter konverziója CSC-1 esetében lényegesen magasabb volt. A CSC-1-gyel kapott termék enantiomer tisztasága szintén jobb volt, mint a CSC-2 esetében kapott terméké, bár mindkettőnél használható eredményt kaptunk.

18. példa

Ebben a példában a ketoprofen észterek hidrolizisekor kapott eredményeket hasonlitottuk össze CSC-2 és nyers MY lipáz alkalmazása esetén.

Egy 50 ml-es Erlenmeyer lombikban lévő 9 ml 100 mM ammónium-foszfát oldathoz (pH=5,5) mért mennyiségű észtert adtunk (akár közvetlenül, akár 200 µl dimetil-formamidban oldva). A mért mennyiségű észtert a puffer 1 ml-ében oldva adtuk az oldathoz. Az elegyet körkörös rázógépen 250 ford/percnél 35 ^{o}C-on 22 órán keresztül kevertük. A reakcióelegyet 8 csepp 6 M sósav-oldattal pH 1,5-2,0-ra savanyitottuk, majd 2 x 10 ml kloroformmal extraháltuk. A kloroformos oldatot

nagynyomású folyadékkromatográffal analizáltuk, hogy meghatározzuk a hidrolizis során keletkezett sav százalékos mennyiségét.

A hidrolizis reakcióelegyének 5 ml kloroformos extraktumát vizmentes nátrium-szulfáton szárítottuk és szűrtük. A szűrletet zárt kémcsőben 0 ^{o}C-ra lehűtöttük és 100 µl N-metil-morfolint majd 100 µl klórszénsav-izobutilésztert adtunk hozzá. 0 ^{o}C-on 10 percig történő enyhe rázatás után 100 µl D-(+)-(1-fenil-etil)-amint adtunk hozzá, és az enyhe rázatást 0 ^{o}C-on további 5 percig folytattuk. A reakcióelegyet ezután szobahőmérsékleten rázattuk 5 percig. A reakcióelegyet 5 ml vizzel, 5 ml 1 M sósavval majd ismét 5 ml vizzel mostuk. A keletkezett diasztereomer amidokat azután nagynyomású folyadékkromatográffal analizáltuk egy olyan oszlopon, amelyet speciálisan az észterek enzimetikus hidrolizise során keletkezett sav enantiomer feleslegének (%S-%R) meghatározására szánnak.

A ketoprofen észtereket (50 mg) a fentieknek megfelelően hidrolizáltuk. A ketoprofen-monoglicerid és a ketoprofen-etilén-glikol-észter hidrolizisekor keletkezett sav mennyiségének analizisét nagynyomású folyadékkromatográffal végeztük Partisil 5 ODS-3 RAC oszlopon (9,4 x 100 mm, Whatman), metanol: : 10 mM ammónium-dihidrogén-foszfát oldat (60:40) eleggyel 4 ml/perc adagolással és 254 nm-nél végzett indikálással. A többi észter hidrolizisekor kapott sav nagynyomású folyadékkromatográfiás analizisét ODS-3 RAC oszlopon végeztük, metanol : 10 mM ammónium-dihidrogén-foszfát-oldat (80:20)

eleggyel 2 ml/perc adagolással és 254 nm-nél végzett indikálással. Mindegyik hidrolizis esetében a képződött ketoprofén enantiomer feleslegét az amidoknak nagynyomású folyadékkromatográfiás analizisével határoztuk meg ODS-3 RAC oszlopon, metanol : 10 mM ammónium-dihidrogén-foszfát-oldat (60 : 40) eleggyel 4 ml/perc adagolással és 254 nm-nél végzett indikálással. Az eredmények táblázatos összefoglalását az alábbiakban adjuk meg a 10. táblázatban.

10. táblázat

Ketoprofen különböző észtereinek hidrolizise CSC-2-vel és az eredmények összehasonlitása a nyers MY lipázzal kapott eredményekkel

Észter	Enzim	Reakció-közeg	Sebesség (μmol/h/mg)	S-sav (%)
Metil	MY lipáz	Puffer	0,002	36
	CSC-2	Puffer	0,222	96
butil	MY lipáz	Puffer	0,005	88
	CSC-2	Puffer	0,519	>99
	CSC-2	Kétfázisú *	0,314	>99
oktil	MY lipáz	Puffer	0,004	94
	CSC-2	Puffer	0,192	n.m.
	CSC-2	Kétfázisú *	0,069	n.m.
2-klór-etil	MY lipáz	Puffer	0,014	32
	CSC-2	Puffer	1,405	98
	CSC-2	Kétfázisú *	2,735	98
2,2,2-trifluor-etil	MM lipáz	Puffer	0,023	15
	CSC-2	Puffer	2,931	78
	CSC-2	Kétfázisú *	1,855	81
monoglicerid	MY lipáz	Puffer	0,034	77
	CSC-2	Puffer	2,079	98
	CSC-2	Kétfázisú	3,815	ND

* Izooktán: 100 mM ammónium-dihidrogén-foszfát-oldat (pH 5,5) (1 : 1) kétfázisú rendszer.

n.m. = nem mértük

Amint az nyilvánvalóvá vált, sokkal jobb enantiomer felesleg értékeket és hidrolizissebességeket kaptunk a CSC-2 alkalkalmazásával, ha azokat a ketoprofen észterek MY lipázzal történő hidrolizisével hasonlitjuk össze.

Ez a példa ezenfelül használható eredményeket adott (például nagy sebesség és enantiomer felesleg) kétfázisú, izooktánt tartalmazó rendszerek alkalmazásához.

19.példa

Ebben a példában a ketoprofen-monoglicerid nyers MY lipáz, CSC-1 és CSC-2 alkalmazásával végzett hidrolizisekor kapott eredményeket hasonlitjuk össze.

9 ml 100 mM ammónium-foszfát pufferhez (pH=5,5) 50 mg ketoprofen-monogliceridet adunk akár tisztán, akár 200 µl dimetil-formamidban oldva, majd ezután az elegyhez a fenti puffer 1 ml-ében oldott enzimet adunk. 250 ford/perc-nél, 35 ^{o}C-on 22 órán keresztül történő rázatás után a reakcióelegyet megsavanyitjuk, és 2 x 10 ml kloroformmal extraháljuk, majd nagynyomású folyadékkromatográffal analizáljuk, hogy meghatározzuk a keletkezett sav mennyiségét, amint azt a 18. példában leirtuk. Az eredményeket a 11. táblázatban adjuk meg:

11. táblázat

Ketoprofen-monoglicerid hidrolizisének eredményei

DMF** (µl)	Enzim (mg)	Savtartalom (%)	Hidrolizált savtartalom (%)	Sebesség	Enantiomer felesleg S-sav (%)	Enantiomer felesleg S-sav* (Számított) (%)
200	nincs	0.3				
0	nincs	0.4				
200	MY lipáz(50)	28,3	28,0	0,039	73,2	76,0
0	MY lipáz(50)	27,2	28,8	0,037	68,0	69,0
200	CSC-2 (1)	21,3	21,0	1,455	95,4	96,6
0	CSC-2 (1)	27,7	27,3	1,891	96,4	97,8
200	CSC-1 (1)	3,8	3,3	0,229	74,6	81,0
0	CSC-1 (1)	4,5	4,1	0,284	84,6	92,6

* A kiindulási anyagban szennyezésként jelenlevő R- és S-sav mennyiségét levonva.

** Dimetil-formamid

Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a CSC-2 előnyösebb volt a ketoprofen-monoglicerid hidrolizisénél, mivel lényegesen nagyobb volt a hidrolizis sebessége, és jobb volt az enantiomer felesleg.

20. példa

Dimetil-formamid (DMF) hidrolizisre gyakorolt hatása.

50 mg ketoprofen-monoglicerid hidrolizisét különböző dimetil-formamid: 100 mM ammónium-dihidrogén-foszfát puffer (pH=5,5) elegyekben hajtották végre. Mindegyik lombikhoz 50 mg 200 µl dimetil-formamidban oldott ketoprofen-monogliceridet adtunk. Ezután ismét dimetil-formamidot adtunk a rendszerbe, majd ezt követően 100 mM-es ammónium-dihidrogén-foszfát puffert. Az elegyhez 1 mg 0,5 ml pufferben oldott, tisztitott CSC-2-t adtunk. 22 óra elteltével a 2%, 5 % és 10 % dimetil--formamidot tartalmazó mintákat megsavanyitottuk, 2 x 10 ml kloroformmal extraháltuk és analizáltuk. A többi mintát a 18. példa szerint közvetlenül analizáltuk. A keletkezett sav mennyisége a dimetil-formamid mennyiségének növekedésével csökkent.

Dimetil-formamid (%)	Sav (%)
2	23
5	18
10	11
20	3
30	0,7
40	0,3
50	0,4

21. példa

Ketoprofen-monoglicerid nagyléptékű hidrolizise.

Egy 2,8 literes Fernbach lombikba 500 ml 100 mM ammónium-foszfát pufferben (pH=5,5) oldott 100 mg CSC-2-t adunk, majd az elegyhez 10 g 10 ml dimetil-formamidban oldott ketoprofen-monogliceridet adunk hozzá. 300 ford/perc-cel rotációs rázógépben 35 ^{o}C-on 166 órán keresztül tartó rázatás után a reakcióelegyet 1 M nátrium-hidroxid-oldattal pH 10-re állitottuk be, majd a semleges (ketoprofen-észtert tartalmazó) frakció eltávolitása céljából 3 x 500 ml etil-acetáttal extraháltuk. A (ketoprofensavat tartalmazó) vizes réteget 6 M sósavoldattal pH 1,5-re savanyitottuk, és 3 x 500 ml etil-acetáttal extraháltuk. Az oldószernek az észterről és a savról történt eltávolitása után 6,55 g (65,5%) nyers észtert illetve 2,32 g (30 %) nyers savat kaptunk. A nyers sav vizes etanolból történt kikristályositását követően fehér porként 1,69 g (21,8 %) ketoprofent kaptunk. A savat a 18. példában az amidokra leirt nagynyomású folyadékkromatográfiás analizisnek vetettük alá, és eredményként az S-savra 91,2 % enantiomer felesleget kaptunk.

22.példa

Ebben a példában a dimetil-formamidnak és felületaktiv anyagoknak a ketoprofen-monoglicerid CSC-2 segitségével ketoprofenné történő hidrolizisére gyakorolt hatását mutatjuk be. A felhasznált felületaktiv anyag Tween 80 és Span 85 volt.

Kis mennyiségű dimetil-formamidot adtunk a reakcióelegyhez a ketoprofen-monoglicerid oldhatóságának növelése céljából.

Mindegyik esetben 100 mmol/l ammónium-foszfát puffert (pH=5,5) használtunk, 2 tf % detergenst adtunk a rendszerbe, és a teljes térfogat 10 ml volt. A ketoprofen-monogliceridet vagy közvetlenül, vagy 200 µl dimetil-formamidban oldva adagoltuk. Az enzim:szubsztrát arány mindegyik esetben 1:50 volt. A 18.példa szerint végzett analizis eredményeit alább mutatjuk be.

12. táblázat

Dimetil formamidnak a ketoprofen-monogliceridetergensek jelenlétében végzett hidrolizisére gyakorolt hatása

KPG[1] (mg)	DMF[2] (µl)	Tween 80 Seb.	Rel. Seb	ef.[3] (%)	Span 85 Seb	Rel. seb	ef. (%)
50	200	1,63	100[4]	96	1,37	100[5]	93
100	200	0,64	40	92	2,39	175	96
200	200	0,28	17	86	1,47	107	95
50	0	2,10	129	97	3,69	269	97
100	0	1,62	99	96	2,97	216	97
200	0	1,04	64	93	1,70	124	95

1) Ketoprofen-monoglicerid

2) Dimetil-formamid

3) Enantiomer-felesleg

4) Standardként 100-nak választottuk minden, Tween 80-nal végzett reakció esetében.

5) Standardként 100-nak választottuk minden, Span 85-tel végzett reakció esetében.

A kapott eredmények egyértelműen mutatják a dimetil-formamidnak a reakciósebességre és az enantiomer feleslegre gyakorolt káros hatását. Felületaktiv anyagok alkalmazása jó sebességet és enantiomer felesleget eredményezett.

23. példa

Ketoprofen-monoglicerid hidrolizise vizes-szerves kétfázisú rendszerben.

2-2 ml különböző szerves oldószerhez 10,9 mg ketoprofen-monoglicerid 50 µl dimetil-formamiddal készitett oldatát adjuk, és utána mindegyik elegyhez 0,4 mg CSC-2 2 ml 100 mM ammónium-foszfát pufferral (pH=5,5) készült oldatát adjuk. A puffer reakcióelegy (a táblázatban 2.sz) 2 ml pufferben enzimet tartalmazott, a csak puffer reakcióelegyben (a táblázatban 1.sz) nem volt enzim.

150 ford/perc-nél végzett rázatás után a reakcióelegyet a 18. példában bemutatott standard módszerrel analizáltuk. Az eredményeket a 13. táblázatban adjuk meg.

13. táblázat

Ketoprofen-monoglicerid hidrolizise CSC-2-vel vizes-szerves kétfázisú rendszerben

Sorsz.	Oldószer	Rel. seb.	S-sav, %
1	Csak puffer (enzim nélkül)*		
2	Puffer	100	96
3	Hexán	80	93
4	Izooktán	214	96
5	Ciklohexán	185	95
6	Ciklohexén	146	89
7	Ciklooktén	387	95
8	Toluol	15	58
9	Xilolok	44	81
10	Etil-benzol	18	48
11	Kumol	91	86
12	1,2,3,4-tetrahidronaftalin	136	85
13	Szén-tetraklorid	48	95
14	Kloroform**	0	
15	Metilén-diklorid**	0	
16	1,1,1-triklór-etán	25	75
17	Diklór-etilén**	0	
18	1,1,2-triklór-etán	0	
19	Perklór-etilén	3	27
20	1,1,2-triklór-trifluor-etán	123	99
21	Dietil-éter**	0	
22	Diizopropil-éter	53	69
23	Dibutil-éter	59	69
24	Ciklohexanon**	0	
25	3-pentanon**	0	
26	Butanol**	0	
27	Hexanol**	0	
28	Oktanol**	0	
29	Benzilalkohol	0	
30	Etil-acetát**	0	

* Minden táblázatban szereplő értéket ezen kontrollmintának megfelelően korrigáltunk

** 16 órás reakciók, minden többi 24 órás volt.

Az eredmények azt mutatják, hogy egyes alacsony polaritással rendelkező oldószereket fel lehet használni a hidrolizis sebességének javitására, és csak kevés befolyást gyakoroltak az enantiomer feleslegre.

24. példa

CSC-2 immobilizálására és ketoprofen-monoglicerid hidrolizisénél történő alkalmazása.

10 ml 100 mM ammónium-foszfát oldathoz (pH=5,5) 200 µl dimetil-formamidban oldott 50 mg ketoprofen-monogliceridet adtunk, majd ezután CSC-2-t (különböző módon immobilizálva 2 mg CSC-2 tartalommal). 250 ford/perc-nél 35 °C-on történő rázatás után az elegyet megsavanyitottuk, kloroformmal extraháltuk, és nyagynyomású folyadékkromatográffal analizáltuk a 18. példának megfelelően. Az eredmények a 14. táblázatban láthatók. Az immobilizálási eljárások a következők voltak:

(1) 269-I

2 mg CSC-2 lipázt kevertünk össze 0,3 g Amberlite DP-1-gyel és 200 mg XAMA-7-tel 10 ml izookténben. Az elegyet szobahőmérsékleten 4 órán át rázattuk, majd az izooktént ledesztilláltuk. Az immobilizált enzimet ezután ionmentes vizzel mostuk, és 4 °C-on tároltuk.

(2) 269-II

Ugyanaz, mint a 269-I kivéve, hogy 50 mg sztearinsavat is adtunk a rendszerbe.

(3) 269-III

Ugyanaz mint a 269-I kivéve, hogy 50 mg hexadecil--amint is adtunk a rendszerbe.

(4) 269-2A-tól 269-2G-ig

Ugyanaz, mint a 269-II. Az Amberlite DP-1 pH-ját a következő értékekre állitottuk be:

2A	pH	3,5
2B	pH	4,5
2C	pH	5,5
2D	pH	6,5
2E	pH	7,5
2F	pH	8,5
2G	pH	9,5

(5) 269-5A

1 ml foszfátpufferben (0,01 M, pH 6,5) oldott 2 mg CSC-2 lipázt 5 % perjodáttal aktivált 0,5 g cellulózgyönggyel rázattunk szobahőmérsékleten. Az immobilizált enzimet ionmentes vizzel mostuk, és 4 ^{o}C-on tároltuk.

(6) 269-5B

1 ml foszfátpufferben (0,01 M, pH 6,9) oldott 2 mg CSC-2 lipázt 0,58 g Affi-Prep-pel rázattunk szobahőmérsékleten 24 órán keresztül. Az immobilizált enzimet mostuk, és 4 ^{o}C-on tároltuk.

(7) 269-7F

Amberlite DP-1 gyantát pH 3,5-n egyensúlyba hoztuk, acetonnal mostuk, majd 100 ^{o}C-on dehidráltuk. 1 ml foszfát--pufferben (0,01 M, pH 5,0) oldott 2 mg CSC-2 lipázzal összeke-

vertünk 0,3 g dehidratált gyantát, és az elegyet liofilizáltuk. A liofilizált enzimet 50 mg sztearinsavat és 50 mg XAMA-7-et tartalmazó 5 ml ciklookténnel rázattuk, majd egy éjszakán keresztül állni hagytuk, hogy a ciklooktén elpárologjon. Az immobilizált enzimet mostuk, és 4 ^{o}C-on tároltuk. A 269-76 előállitására ugyanilyen eljárásban cellulózgyöngyöket használtunk; a 269-7E-hez Dowex 50 Wx4-et; a 269-7D-hez Amberlite A 15-öt.

(8) 269-8A

Ugyanaz, mint a 269-7F de XAMA-2-vel

269-8B

Ugyanaz, mint a 269-7F.

(9) 269-9A

2 mg CSC-2 lipázt rázattunk 0,5 g nátrium-perjodáttal aktivált cellulóz gyöngyökkel pH 5,0 pufferben 20 órán keresztül. Az enzimet ezután kiszűrtük, mostuk és 4 ^{o}C-on tároltuk.

(10) 269-9B

Ugyanaz, mint a 269-A, de pH 7,0-en.

(11) 269-10

25,1 mg CSC-2 lipázt összekevertünk 0,2 g CM-cellulózzal 1,0 ml 10 %-os sztearinsavat tartalmazó 5 ml ciklookténben. Az elegyet egy órán keresztül rázattuk, majd 2 ml ugyanezen oldószerrel készitett, 10 %-os XAMA-7 oldatot adtunk hozzá. Az elegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten rázattuk, és a ciklooktént elpárologtattuk. Az immobilizált

enzimet kiszűrtük, mostuk, és 4 ^{o}C-on tároltuk.

(12) 269-11A és 269-11D

10 mg CSC-2 lipázt, és 150 mg glükózt 5 ml ionmentes vizben összekevertünk 1,25 g Amberlite DP-1-gyel (pH 3,5), és az elegyet liofilizáltuk, A liofilizált enzimet 20 ml ciklookténben (269-11A) vagy 1,1,2-triklór-trifluor--etánban (269-11D) 200 mg XAMA-7-tel és 500 mg sztearinsavval rázattuk. Ezt az eljárást használtuk a 269-11B, 269-11C, 269-11E és 269-11F előállitására is.

(13) 269-12A

Ugyanaz, mint a 269-9B, de 0,1 % EDTA-val (etilén--diamin-tetraacetát)

269-12B

Ugyanaz, mint a 269-12A de pH 8,5-ön.

(14) 269-13

Ugyanaz, mint a 269-8A, de 110 mg keményitő hozzáadásával.

(15) 269-14A

5 ml ionmentes vizben oldott 10 mg CSC-2 lipázt 1 g dehidratált cellulózgyönggyel összekevertünk, és az elegyet liofilizáltuk. A liofilizált enzimet 20 ml ciklookténben 400 mg sztearinsavval és 200 mg XAMA-7-tel immobilizáltuk. A 269-14B előállitására CM-cellulóz gyöngyöt használtunk.

(16) 269-5D1

1g szilikagélhez (Spherosil, 400 LS, IBF) 4 ml 100 mM ammóniumfoszfát pufferben (pH 5,5) oldott 10 mg CSC-2

lipázt adtunk, és az elegyet 22 órán keresztül enyhén rázattuk. A szilárd anyagot kiszűrtük, és ugyanazon pufferrel (5 x 10 ml) mostuk. Az oldat nem mutatott aktivitást, a teljes aktivitást a szilárd anyag tartalmazta.

14. táblázat:

Vizsgálatok immobilizált CSC-2-vel

Kódszám	Aktivitás a szabad CSC-2 %-ában	S-sav enantiomer feleslege (%)
Immobilizálás DP-1-gyel		
269-I	1	NM
269-II	23	70
269-II	5	NM
269-2A tól-2G -ig	1-5	NM
269-7F	5	80
269-8A		NM
269-8B	38	70
269-11A	41	81
269-11D	22	81
269-13	4	NM
Immobilizálás cellulózzal		
269-7G	59	87
269-11B	31	76
269-11E	7	NM
269-14A	48	87
Immobilizálás CM-cellulózzal		
269-10	7	NM
269-11C	50	82
269-11F	40	82
269-14B	61	85
Immobilizálás perjodáttal aktivált cellulózzal		
269-5A	27	96
269-9A	10	92
269-9B	17	93
269-12A	7	NM
269-12B	7	NM
Immobilizálás más hordozókkal		
269-5B	11	76
269-7D	1	NM
269-7E	6	NM
279-SD1	107	97

NM = Nincs meghatározva

25. példa

Tisztitott CSC-1 lipáz izoenzim immobilizálása Eupergit C-n és hidrolizishez való felhasználása.

1 mg Eupergit C gyantát (Hoechst) 20-szoros térfogatú 0,1 M dinátrium-hidrogén-foszfát-oldattal (pH 6,0) mostunk. A gyantához 3 mg tisztitott lipázt tartalmazó 6 ml ugyanolyan puffert adtunk,és enyhe keverés közben 4 ^{o}C-on 16 órán keresztül hagytuk reagálni. Ezt a katalizátort azután 10-szeres térfogatú pH 6,0-os pufferrel mostuk. A katalizátort 25 mmol/l HPPA-Me-t tartalmazó 100 ml 50 mM dinátrium-hidrogén-foszfát--oldatban (pH 6,5) adagoltuk 25 ^{o}C-on, és az elegyet enyhén rázattuk. Az immobilizált enzim aktivitásának 39 %-át őrizte meg az oldható enzimhez viszonyitva az R és S savvá történő észterkonverzió nagynyomású folyadékkromatográfiás vizsgálata alapján. Az R,S észter 42 %-os hidrolizisénél az R-sav aránya 97 % volt.

26. példa

Ebben a példában szerves savaknak az MY lipáz immobilizálására gyakorolt hatását mutatjuk be.

0,45 g MY lipázt, 0,9 g dehidratált Amberlite DP-1-et és 100 mg XAMA 7-et [pentaeritrit-trisz (béta-N-aziridinil) --propionát] kevertünk össze 10 ml toluolban, amely a következő telitett savak egyikét tartalmazta: 30 mg propionsavat, 30 mg vajsavat, 30 mg valeriánsavat, 30 mg hexánsavat, 30 mg heptánsavat, 40 mg oktánsavat, 40 mg nonánsavat, 40 mg dekánsavat, 40 mg undekánsavat, 40 mg laurinsavat, 40 mg tridekánsavat, 40 mg mirisztinsavat, 50 mg pentadekánsavat, 50 mg palmitin-

-savat, 50 mg heptadekánsavat, 50 mg sztearinsavat, 30 mg brasszidinsavat, 50 mg eikozánsavat és 50 mg tetrakozánsavat. Az elegyeket szobahőmérsékleten enyhén rázattuk, és a toluolt ezután óvatosan elpárologtattuk. Az immobilizált enzimpreparátumokat hidratáltuk, ionmentes vizzel mostuk, és vizsgálatnak vetettük alá. Amint az a 8. ábrán látható, egy 18 szénatomos sav, a sztearinsav kitűnő immobilizációs hozamot adott.

27. példa

Sztearinsav hatása a lipáz aktivitására.

0,45 g MY lipázt, 0,9 g dehidratált Amberlite DP-1-et, és 100 mg XAMA-7-et 4,5, 11,25 , 22,5 , 45 és 90 mg sztearinsavat tartalmazó 100 ml toluollal kevertünk össze a 24. példában bemutatott eljárás szerint. Az eredményeket a 9. ábrán mutatjuk be.

28. példa

Sztearinsav immobilizálás céljára szolgáló adagolásának optimalizálása.

200 ml nátrium-acetát pufferben (1 M; pH 3,5) oldott 3,6 g MY lipázt 27 g Amberlite DP-1-gyel összeráztunk, majd a pH-t ecetsavval 4,5-re beállitottuk. Az elegyet 4 ^{o}C-on egy éjszakán át rázattuk, a gyöngyöket kiszűrtük, ionmentes vizzel mostuk, majd liofilizáltuk. Így 8,1 g száritott gyöngyöt kaptunk. 1 g gyöngyöt ezután 100 mg XAMA-7-et és 10 , 25 illetve 50 mg szterainsavat tartalmazó 10 ml toluolhoz adtuk, és az elegyet enyhén kevertük. A vizsgálatokat a 24. példának megfelelően végeztük el, és azokat a 10. ábrán mutatjuk be.

29. példa

CSC-1 immobilizálása poliaziridinnel.

500 mg CSC-1 izoenzimet 0,5 g 75 %-ig hidrolizált poli(vinil-alkohol)-lal (molekulatömeg 3000) és 230 ml jéghideg ionmentes vizzel elegyitettünk, és az elegyet 15 percig kevertük. Az elegyhez 100 g száraz Amberlite DP-1 (Rohm-Haas) ioncserélő gyantát adtunk 7,0 pH-n.

Az elegyet 20 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, mielőtt liofilizáltuk volna. A liofilizálás befejeztével a gyöngyökhöz 140 ml toluol és 3,5 g sztearinsav keverékét adtuk, majd az elegyet egy órán át állni hagytuk. Az elegyhez ezután 40 ml toluol és 7 g XAMA-7 poliaziridin prepolimer elegyét adtuk, majd azt egy órával később megismételtük. Az elegyet lefedtük, és 4 órán keresztül lassan rázattuk, amely idő alatt a toluol lassan elpárolgott. Az immobilizált enzimpreparátumot ezután 2 x 250 ml ionmentes vizzel mostuk.

A tisztitott CSC-1 aktivitását oldható alakjában 550 µmol/óra/mg-nak határoztuk meg HPPA-Me HPPA-vá történő 35 %-os konverziójánál. Az ezen kisérlet során előállitott, immobilizált CSC-1 aktivitása 920 µmol/óra/g immobilizált gyöngy volt 37 %-os konverzió vagy a teljes ágyra számitottt 231 mmol/óra mellett. Úgy találtuk, hogy a gyöngyök mosása összesen 32 mmol/óra aktivitáscsökkenést jelentett. Ilyenformán az enzim aktivitásának 84 %-át immobilizáltuk ,12 %-a a mosófolyadékban található, és az aktivitás 4 %-a hiányzott.

30. példa

Ebben a példában polivinil-alkohol CSC-1 lipáz immobilizálására és aktivitására gyakorolt hatását mutatjuk be.

5 mg CSC-1 lipázt 5 ml ionmentes vizben 0,3 mg Amberlite DP-1-gyel és 0, 10, 20, 30, 40 és 50 mg poli(vinil-alkohol)-lal együtt (molekulatömeg 3000, 75 %-ban hidrolizálva vagy molekulatömeg 10 000 és 88 %-ban hidrolizálva) liofilizáltuk. Az enzimet ezután 6 ml toluolban oldott 50 mg sztearinsavval és 50 mg XAMA-7-tel immobilizáltuk. Miután a toluolt elpárologtattuk, az immobilizált enzimet HPPA-Me-vel megvizsgáltuk, és az enzim relativ aktivitását kiszámitottuk.

Poli(vinil-alkohol) (molekulatömeg 3000) (mg)	Relativ aktivitás (%)
0	100
10	149
20	145
30	143
40	136
50	153

Poli(vinil-alkohol) (molekulatömeg 3000) (mg)	Relativ aktivitás (%)
0	100
10	119
20	123
30	126
40	121
50	97

A fenti eredmények azt mutatják, hogy a poli(vinil-alkohol) adagolás növeli a CSC-1-lipáz relativ aktivitását.

31. példa

Nyers MY lipáz immobilizálása.

1 g MY lipázt 25 ml 25 mM dinátrium-hidrogén-foszfát-oldattal (pH=6,5) elegyitettünk, az elegyet 20 percig alaposan kevertük, majd lecentrifugáltuk. A felülúszó fázist 10 ^{o}C-ra lehűtöttük, és 13 ml száraz Amberlite DP-1-et (pH 7,0) adtunk hozzá. Az elegyet ezután liofilizáltuk. A liofilizált anyaghoz ezután 16 ml toluolban oldott 0,42 g sztearinsavat adtunk, és az elegyet egy órán keresztül rázattuk. Ezután egy órányi időtartam alatt 10 ml toluol és 2,5 g XAMA-7 elegyét adtuk hozzá. Az elegyet lefedtük, 4 órán keresztül rázattuk, ami alatt a toluol lassan elpárolgott. A gyöngyöket 2 x 100 ml vizzel mostuk. Az MY lipáznak és az immobilizált MY lipáznak a HPPA-Me-re gyakorolt hidrolizációs aktivitásainak összehasonlításából az adódott, hogy az MY lipáz aktivitása 4700 μmol/óra/g

volt HPPA-Me HPPA-vá történő 17 %-os konverziója mellett. Az immobilizált MY lipáz aktivitása 2160 µmol/óra/ágy volt 16 %-os konverzió mellett. A mosás okozta aktivitáscsökkenésnek 175 µmol/óra/ágy értéket számitottunk, Ilyenformán az enzim aktivitásának az eredeti aktivitáshoz viszonyitva 50 %-a megmaradt, 46 %-át immobilizáltuk, és 4% volt a mosási sebesség.

32. példa

R-2-(4-Hidroxi-fenoxi)propionsav izolálása

392 g (2 mol) R,S-HPPA-metil-észtert 1500 ml toluolban feloldottunk. A toluolos oldathoz 3 liter 0,58 M ammónium-acetát-oldatot (pH 6,5) és 3 g nátrium-ditionátot adtunk. A kapott kétfázisú elegyhez 160 ml 9. példa szerint előállitott immobilizált MY lipázt adtunk, és keverés közben 25 ^{o}C-on 120 órán keresztül hagytuk reagálni. Ezen idő alatt az észter 40,8 %-a hidrolizált el. A vizes fázist elkülönitettük a szerves fázistól és a pH-ját 7,0-ra állitottuk be. Ezt a fázist négyszer, egyenként 0,25-szörös mennyiségű metilén-dikloriddal extraháltuk az észter kinyerése céljából. A vizes fázis pH-ját 2,5-re állitottuk be, és négyszer extraháltuk egyenként 0,25-szörös mennyiségű etil-acetáttal. A viz eltávolitása céljából vizmentes magnézium-szulfátot adtunk az etil-acetáthoz, és a szerves fázist leszűrtük. Az etil-acetátot vákuumban, 50 ^{o}C-on ledesztilláltuk, és szilárd R-2-(4-hidroxi-fenoxi)propionsavat kaptunk. A sav 95 % R-savat és 5 % S-savat tartalmazott.

33. példa

Ez a példa az immobilizált CSC-1 katalizátor megnövekedett élettartamát szemlélteti.

A 29. példa szerint elkészitett 29 ml immobilizált CSC-1-gyel megtöltöttünk egy 1x24 cm-es kromatográfiás oszlopot. Ezt az anyagot ezután 50 oszloptérfogatnyi ionmentes vizzel mostuk a meg nem kötött fehérje eltávolitása céljából. 25 mM HPPA-Me szubsztrát oldatot készitettünk a következő módon: 34,8 g dikálium-hidrogén-foszfátot oldottunk 4 liter ionmentes vizben, 4 g nátrium-ditionitot adtunk hozzá, a pH-t foszforsavval 6,5-re állitottuk be, majd ezután 19,6 g R,S-HPPA-Me-t adtunk az elegyhez. Ezt az oldatot 0,7 ml/perc (2,4 oszloptérfogat/óra) sebességgel átengedtük az enzimen. A mintákat naponta megelemeztük, hogy meghatározzuk a katalizátor enzimatikus aktivitását.

Amint az a 11. ábrán látható, az oszlopot 40 napos periódusón keresztül működtettük a katalizátor aktivitásának látható csökkenése nélkül.

34. példa

Candida rugosából származó lipáz előállitása QA-Trisacryl M kromatográfia segitségével.

A CSC-1 lipáz izolálásának egyik alternativ módszereként 2,1 g MY lipázt (Meito Sangyo) 32 ml vizben feloldottunk, és 25 mM dinátrium-hidrogén-foszfát-oldattal (pH 6,3) szemben dializáltuk. A szilárd anyagot centrifugálással eltávolitottuk.

A fehérjét ezután egy 2,5 x 4,0 cm-es, 25 mM hisztidin.HCl (pH 6,0) eleggyel egyensúlyba hozott QA-Trisacryl M (IBF) oszlopra vittük fel 62 ml/óra adagolási sebességgel. Az oszlopot ugyanezen pufferrel addig mostuk, mig az abszorbció 280 nm-en vissza nem állt az alapvonalra. Egy nagy, meg nem kötött anyag csúcsot kaptunk 280 nm-es abszorbcióval, amely CSC-1 lipázt és 4-5 kisebb fehérjekomponenst tartalmazott a 3-9 között végzett izoelektromos fókuszálás alapján, amelynél Pharmacia Phast gélrendszert használtunk.

A QA-Trisacryl M oszlopon megkötött fehérjét 200 ml 0-0,3 M-ig változó nátrium-kloridot tartalmazó 25 mM hisztidin.HCl (pH 6,0) gradienssel eluáltuk.

A CSC-1 egy reprezentativ frakcióját az R,S-HPPA-metil-észter sztereoszelektiv hidrolizisére megvizsgáltuk a 3. példában leirtak szerint. 41 %-os konverzió mellett a termék 98 %-a R-sav volt.

35. példa

Ibuprofen-metil-észter hidrolizise.

200 mg ibuprofen-metil-észtert a 18. példában leirtak szerint enzimatikus hidrolizisnek vetettünk alá, mejd nagynyomású folyadékkromatográffal ODS-3 RAC oszlopon metanol:10 mM ammónium-dihidrogén-foszfát (80:20) elegyet 2 ml/perc adagolással használva meghatároztuk a keletkezett sav teljes mennyiségét 220 nm-en történő detektálással. Az előállitott sav enantiomer feleslegét a diasztereomer amiddá való konvertálással határoztuk meg a 18. példában leirtak

szerint. Az analizist nagynyomású folyadékkromatográffal végeztük Hibar RT Lichrosorb Si 60 oszlopon (5 μm, 4 mm x 25 cm; E.Merck) eluensként metilén-diklorid:acetonitril (96:4) elegyet használva 2 ml/perc adagolással, és 254 nm-en történő detektálással. Az eredményeket a 15. táblázat tartalmazza.

15. táblázat

Ibuprofen-metil-észter hidrolizisének eredményei

Lombik sorszáma	DMF** (μl)	Enzim	Sav (%)	Reakciósebesség μmol/óra/mg	S-sav (ee%)+
1*	200	enzim nélkül	0	-	-
4	200	MY lipáz (50mg)	29	0,2	96
5	0	MY lipáz (50mg)	28	0,2	96
6	200	CSC-2 (1mg)	32	11,3	97
7	0	CSC-2 (1mg)	28	11,4	98
8	200	CSC-1 (1mg)	4	1,8	96
9	0	CSC-1 (1mg)	5	2,1	95

* Ebben a kontroll kisérletben 100 mg ibuprofen-metil-észtert használtunk

** DMF = dimetil-formamid

+(ee %) = enantiomer-felesleg (%).

36. példa

Fenoprofen-metil-észter hidrolizise.

Az észtert magában dimetil-formamid nélkül használtuk. 56 mg, illetve 112 mg fenoprofen-metil-észtert a 18. példában leirtak szerint enzimatikus hidrolizisnek vetettünk alá, majd nagynyomású folyadékkromatográffal. ODS-3 RAC oszlopon metanol:10 mM ammónium-dihidrogén-foszfát-oldat (60:40) eluenst 4 ml/perc adagolással használva meghatároztuk a keletkezett sav teljes mennyiségét 254 nm-en végzett detektálással. Az előállitott sav enantiomer feleslegét a diasztereomer amidokká való konvertálással határoztuk meg a 18. példában leirtak szerint. Az analizist nagynyomású folyadékkromatográffal végeztük Hibar Lichrosorb Si60 (5 μm) oszlopon eluensként metilén-diklorid:acetonitril (96:4) elegyet használva 2 ml/perc adagolással, és 254 nm-en történő detektálással. Az eredményeket a 16. táblázat tartalmazza.

16. táblázat

Fenoprofen-metil-észter hidrolizise

Észter (mg)	Enzim	Sav (%)	Reakció-sebesség µmol/óra/mg	S-sav (ee %)*
56	Enzim nélkül	0		
56	MY lipáz (50 mg)	16	0,03	80
112	MY lipáz (50 mg)	17	0,07	89
56	CSC-2 (1 mg)	22	2,2	96
112	CSC-2 (1 mg)	13	2,2	96
56	CSC-1 (1 mg)	20	2,0	95
112	CSC-1 (1 mg)	14	2,8	96

*(ee %) = enantiomer felesleg (%).

37. példa

Ebben a példában 2-fenil-propionsav-metil-észter hidrolizisét mutatjuk be.

Az észtert dimetil-formamid nélkül a 18. példában leirtak szerint hidrolizisnek vetettük alá. A keletkezett sav teljes mennyiségét nagynyomású folyadékkromatográffal ODS-3 RAC oszlopon metanol:10 mM ammónium-dihidrogén-foszfát-oldat (60:40) eluenst 4 ml/perc adagolással használva határoztuk meg 220 nm-en végzett detektálással. A reakcióban előállitott savat a diasztereomer amidokká való konvertálással határoztuk meg a 18. példában leirtak szerint. Az analizist az enantiomer felesleg meghatározása céljából nagynyomású folyadékkromatográ-

fiával végeztük Hibar Lichrosorb Si 60 (50 μm) oszlopon eluensként metilén-diklorid:acetonitril (98:2) elegyet használva 2 ml/perc adagolással és 254 nm-en történő detektálással. Az eredményeket a 17. táblázat tartalmazza.

17. táblázat

2-Fenil-propionsav-metil-észter hidrolizise

Észter (mg)	Enzim	Sav (%)	Reakció-sebesség μmol/óra/mg	S-sav (ee %)*
43,7	MY lipáz (50 mg)	28	0,07	88
		31	0,08	88
46,7	CSC-2 (1 mg)	18	2,4	93
		17	2,1	93
47,4	CSC-1 (1 mg)	9	1,2	91
		9	1,2	89

*(ee %) = enantiomer felelsleg (%).

38. példa

Ebben a példában az indoprofen-monoglicerid hidrolizisét irjuk le.

50 mg indoprofen-monogliceridet a 18. példában leirtak szerint nagyobb enzimmennyiséggel hidrolizisnek vetettünk alá, amint az a 18. táblázatban látható. 68 óra elteltével a reakcióelegyet a 18. példában leirtak szerint extraháltuk, és a keletkezett sav teljes mennyiségét nagynyomású folyadékkromatográffal ODS-3 RAC oszlopon metanol:10 mM ammónium-dihidrogén-

-foszfát oldat (60:40) eluenst 4 ml/perc adagolással használva határoztuk meg 220 nm-en végzett detektálással. Az enantiomer felesleget a diasztereomer amid (a 18. példa szerint előállitva) nagynyomású folyadékkromatográfiás vizsgálatával határoztuk meg ugyanezen a rendszeren. Az eredeti R,S-indoprofen amidjainak R- és S-izomerjei kissé különböző területű csúcsokat adtak; az enantiomer felesleget ezen különbség figyelembevételével számitottuk ki. Ezen felül a reakcióelegy egy kis részletét nátrium-hidrogén-karbonát oldattal történő extrahálással szétválasztottuk savra és észterre, meghatároztuk ezek forgatóképességét, és azokat az alábbiakban közöljük. Más profenekkel analóg módon a pozitiv forgatóképességgel rendelkező savhoz, és annak D-(+)-(1-fenil-etil)-aminnal képezett diasztereomer amidjához, amelyet később, a nagynyomású folyadékkromatográfiás rendszerben eluáltunk, rendeltük az S-konfigurációt.

Az eredmények a 18. táblázatban láthatók.

18. táblázat

Indoprofen-monoglicerid hidrolizise

Enzim	Sav (%)	Reakció-sebesség	(S-R)sav (%)	Sav (%)	Mért forgatóképesség sav	észter
R,S-Indoprofen			15,8			
MY lipáz (100mg)	8,2	0,0017	-35,4	51,2(R)	+0,012	+0,005
CSC-2 (10mg)	2,3	0,0048	40,8	25,0(S)	-0,007	-0,005
CSC-1 (10mg)	1,8	0,0037	-43,8	59,6(R)	+0,013	+0,002

39. példa

Az alábbiakban Tween 80-nak ketoprofen-monoglicerid CSC-2-vel végzett hidrolizisére gyakorolt hatását mutatjuk be.

Egy felületaktiv anyagnak, mint például a Tween-nek a jelenléte megnöveli a lipofil vegyületek vizoldhatóságát. Kisérleteket végeztünk annak kideritésére, hogy a felületaktiv anyag képes-e megnövelni a ketoprofen-monoglicerid oldhatóságát, és hogy meghatározzuk annak CSC-2-vel végzett hidrolizisére gyakorolt hatását. 50 ml-es lombikban 1 mg CSC-2-t oldottunk fel 10 ml 100 mM ammónium-dihidrogén-foszfát (pH 5,5) pufferben. Annyi Tween 80-at adtunk az elegyhez, hogy 1 tf %-os illetve 2 tf %-os oldatot kaptunk. A két lombikba egyenként 10 mg marha-szérumalbumint (BSA) adagoltunk. Ezután mindegyikhez 200 µl dimetil-formamidban oldott 50 mg

ketoprofen-monogliceridet adtunk. 20 órás 250 fordulat/perc-cel 35 °C-on történő keverés után a reakcióelegyet megsavanyitottuk, extraháltuk, és a 18. példa szerinti szokásos nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárással analizáltuk. Az eredményeket a 19. táblázatban mutatjuk be.

19. táblázat

Tween 80 és marha-szérumalbumin hatása a hidrolizisre

Reakció	Relativ-sebesség (%)	S-sav (ee %)
Tween és marha-szérumalbumin nélkül	100	98
1 % Tween és marha-szérumalbumin	114	95
2 % Tween és marha-szérumalbumin	142	96
2 % Tween, marha-szérumalbumin nélkül	118	96

40. példa

Különböző felületaktiv anyagokat használtunk a reakcióelegy térfogatának 2 %-ában, hogy meghatározzuk az enzimatikus reakcióra gyakorolt hatásukat a ketoprofen-monogliceridnek ketoprofenné történő konverziójánál.

Erlenmeyer lombikba 200 µl felületaktiv anyagot, 200 µl dimetil-formamidban oldott 50 mg ketoprofen-monogliceridet, 1 ml pufferben oldott 1 mg CSC-2 enzimet és 9 ml 100 mM ammónium-dihidrogén-foszfát puffert (pH 5,5) adtunk. A lombikokat Parafilmmel zártuk le, és 250 fordulat/perc-cel 35 °C-os

vizfürdőben egy éjszakán keresztül inkubáltuk. A reakciót savanyitással megállitottuk, majd az elegyet 2x10 ml kloroformmal extraháltuk. A százalékos savtartalmat és a százalékos enantiomer felesleget a 18. példában leirt módszerrel határoztuk meg. A felületaktiv anyagok alkalmazásával végzett kisérletek eredményeit a 20. táblázatban adjuk meg. Meg kell jegyezni, hogy a hidrofil-lipofil egyensúly értékeknek látszólag nincs hatása a felületaktiv anyagoknak azon képességére, hogy megnöveljék a ketoprofen-monogliceridnek ketoprofénné történő konverzióját.

20. táblázat

Felületaktiv anyagok hatása ketoprofen-monoglicerid hidrolizisére

Adalékanyag		Hidrofil-liófil egyensúly	Relativ reakció-sebesség
0 (csak enzim, CSC-2 lipáz)			100
Arlacel	83	3,7	172
Brij	35	16,9	26
"	72	4,9	106
"	76	12,4	18
"	78	15,3	14
"	92	4,9	27
"	96	-	27
"	99	15,3	15
Igepal	CO-210	4,6	42
"	CO-430	8,9	27
"	CO-520	10,5	25
"	CO-530	10,9	23
"	CO-720	13,3	32
"	CO-890	17,1	30
PEG	P1	-	98
"	P4	-	96
"	P11	-	69
Pluronic	P2010	-	79
"	V10	-	39
"	P75	-	29
"	L64	-	33
"	L92	-	12
"	F147	-	82
Span	20	8,6	75
"	40	6,7	99
"	60	4,7	108
"	80	4,3	160
"	85	1,8	181
Tween	20	16,9	39
"	40	15,6	29
"	60	14,9	23
"	61	14,9	92
"	65	10,5	39
	80	15,0	136
"	85	11,0	27

A fentebb emlitett felületaktiv anyagok közül a Tween sorozat poli(oxietilén)-szorbitánokból készült, 20 polioxietilén egységgel, kivéve a Tween 61-et, amelyben 5 polioxietilén (POE) egység van. A Spon sorozat szorbitánokból áll (polioxietilén nélkül) ugyanolyan számú egységekből. Mindegyik felsorolt felületaktiv anyag Sigma beszerzés, kivéve, ha azt külön jeleztük. A Tween és Span 20 monolaurát, a 40 monopalmitát, a 60 monosztearát, a 61 (Serva) szintén egy monosztearát, 65 (Serva) egy trisztearát, a 80 egy monooleát és a 85 egy trioleát. Az Arlacel 83 egy szorszorbitán-szekszvioleát. A Brij sorozat poli(oxietilén)-éterekből készült. A Brij 35 POE-23 lauril-éter. A Brij 72 POE-2 sztearil-éter, a Brij 76 POE-10 sztearil-éter, a Brij 78 POE-20 sztearil-éter, a Brij 92 POE-2 oleil-éter és a Brij 99 POE-20 oleil-éter. Az Igepal sorozat (GAF) poli(oxietilén)-nónilfenol-éterekből áll, mindegyik tartalmaz $C_{15}H_{24}O$-t különböző számú (n) csatlakozó C_2H_4O egységgel. Az Igepal CO-210 $C_{15}H_{24}O$-$(C_2H_4O)_n$ n=1,5; CO-430-nál n=4; CO-520-nál n=5; CO-530-nál n=6; CO-720-nál n=2; és CO-890-nél n=40. 2000-es (P_4), 1000-es (P_1) és 250-es (P_{11}) hosszúságú poli(etilén-glikol)-dimetil-észtereket (PEG) is használhatunk (Hoechst). A felsorolt pluracol-ok és pluronics-ok poliolok.

41. példa

Az alábbiakban mutatjuk be az oleát-észter felületaktiv anyagoknak CSC-2 aktivitására gyakorolt hatását ketoprofen--monoglicerid hidrolizisénél.

75 mg ketoprofen-monogliceridet (dimetil-formamid nélkül) mértünk be 50 ml-es Erlenmeyer lombikokba. Hozzáadtunk 1 ml pufferben oldott 1 mg CSC-2-t, valamint 100, 200 és 500 µl oleát-észter felületaktiv anyagot, hogy igy a reakcióelegyre vonatkozóan 1, 2 és 5 tf %-os koncentrációt kapjunk. Ezután 9 ml 100 mM ammónium-dihidrogén-foszfát puffert (pH 5,5) adtunk a lombikokba, és a lombikokat 35 ^{o}C-os 250 ford/perc-es vizfürdős inkubátorba helyeztük 20 órára. A reakcióelegyet megsavanyitottuk, kloroformmal extraháltuk és nagynyomású folyadékkromatográfiás módszerrel analizáltuk a 18. példában leirtak szerint. A százalékos enantiomer felesleget a 18. példában leirtak szerint határoztuk meg. Az eredményeket a 21. táblázatban mutatjuk be.

21. táblázat

Adalék	Sav (%)	S-sav (%)
0	19	96
100 µl Tween 80	12	
200 µl "	22	96
500 µl "	18	
100 µl Span 85	28	
200 µl "	33	96
500 µl "	34	
100 µl Arlacel 83	30	
200 µl "	30	99
500 µl "	29	
100 µl Span 80	27	
200 µl "	28	97
500 µl "	27	

42. példa

Az olajsavnak és az olajsav egyéb észtereinek hatását a 41. példához hasonló receptúra felhasználásával határoztuk meg.

50 mg ketoprofen-monogliceridet 200 µl dimetil-formamidban feloldottunk, hozzáadtunk 1 ml pufferben feloldott 1 mg CSC-2-t- és 9 ml puffert. Az elegyhez különböző mennyiségű olajsavat illetve olajsav-észtereket adtunk, majd a reakciót a jelzett időben megállitottuk, az elegyet megsavanyitottuk, kloroformmal extraháltuk, és a 18. példában leirtak szerint analizáltuk. Az eredményeket a 22. táblázatban mutatjuk be.

22. táblázat

Idő (óra)	Adalék	Sav (%)	Reakcióesebesség	S-sav (ee%)
18	Nélkül	23	2	NM
18	Triolein, 100 µl	38	3	NM
18	Diolein, 100 µl	42	4	NM
18	Monoolein, 100 µl	43	4	NM
23	Nélkül	29	2	96
23	Olajsav, 200 µl	47	3	96
23	Olajsav-metil-észter 200 µl	51	3	97
23	Olajsav-etil-éter; 200 µl	52	4	96

NM = Nincs meghatározva

(ee %) = enantiomer feleslég (%)

43. példa

A következőkben olivaolajnak, mint a CSC-2 aktivitásfokozójának alkalmazását mutatjuk be.

A kisérletet a 41. példában leirtak szerint végeztük, de 100, 200 és 500 µl olivaolajat használtunk annak meghatározására, hogy vajon az megnöveli-e a ketoprofen-monoglicerid ketoprofenné történő konverziójának sebességét. A módszer ugyanaz, mint amit a 41. példában használtunk (50 mg ketoprofen-monoglicerid; 1 ml pufferben oldott 1 mg CSC-2; 9 ml puffer; olivaolaj; 35 °C hőmérséklet; 250 ford/perc-es keverés; 20 óra reakcióidő). 20 óra után mindegyik reakció-

elegyet megsavanyitottuk, kloroformmal extraháltuk, és nagynyomású folyadékkromatográffal analizáltuk a 18. példában leirtak szerint. Az eredményeket az alábbiakban adjuk meg;

Adalék	Sav (%)
Nincs	19
Olivaolaj 100 µl	34
Olivaolaj 200 µl	40
Olivaolaj 500 µl	42

44. példa

A következőkben olivaolajat és egyéb olajokat használtunk a CSC-2-vel végzett hidrolizálás szubsztátumaként.

1 g olivaolajat szuszpendáltunk 10 ml 100mM-es ammónium-foszfát pufferben (pH 5,5). Ugyanazon puffer 1 ml-ében oldott 1 mg CSC-2-t adtunk hozzá, és az elegyet 250 ford/perc-cel 35 °C-on 1 órán keresztül rázattuk. A reakciót 10 ml aceton:metanol (1:1) elegy hozzáadásával leállitottuk, az elegyet 50 ml vizzel higitottuk, és standard nátrium-hidroxid-oldattal fenolftalein indikátor mellett megtitráltuk. Az eredményt ezután összehasonlitottuk az enzim nélkül végzett kontrolreakció eredményével. Az enzimreakció 1,31 mmol.savat termelt egy óra alatt.

Más, természetes triglicerideket is vizsgáltunk mint az MY lipáz, a CSC-1 és CSC-2 enzimreakciójának szubsztrátumát. Mindegyik olajból 200 µl-t mértünk be egy szcintillációs küvettába, és hozzáadtunk a 2 ml pufferben (100 mM ammónium-

-dihidrogén-foszfát; pH 5,5) oldott enzimeket (1 mg CSC-1-et vagy CSC-2-t illetve 50 mg MY lipázt). Néhány lombikba 20-30 mg ketoprofen-monogliceridet (KPG) is bemértünk. Olajsavat is használtunk az átészterezés szubsztrátumaként. Egy éjszakán keresztül 35 ^{o}C-on 250 ford/perc-cel végzett inkubálás után a reakcióelegyeket vékonyréteg-kromatográfiával megelemeztük szilikagél lemezeket használva. Az oldószer rendszer kloroform:metanol (95:5) volt. A lemezeket jódgőzökkel hivtuk elő. Más kisérletek során azt tapasztaltuk, hogy a mirisztinsavat (14 szénatom), palmitinsavat (16 szénatom) és a szte-arinsavat (18 szénatom) nehezen lehet ilyen körülmények között kimutatni, és a 13 szénatomos telitetlen zsirsavak, az olajsav, linolsav, és linolénsav nem különül el megfelelően. A körülményeket és az eredményeket (foltok jelenlétét, amelyek a 18 szénatomos telitetlen zsirsavaknak, az olajsav tri-, di- és monoglicerid észtereinek felelnek meg), amelyeket olivaolaj, kukoricacsira olaj és olajsav szubsztrátként való alkalmazásával kaptunk a 23. táblázatban adjuk meg.

23. táblázat

Szubsztrát	Olivaolaj				Kukoricacsiraolaj				Olajsav			
	C18	tri	di	mono	C18	tri	di	mono	C18	tri	di	mono
Szubsztrát magában		+				+				+		
Szubsztrát CSC-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Szubsztrát CSC-2 + KPG*	+				+				+	+	+	+
Szubsztrát + CSC-1	+	+	+	+	+				+			
Szubsztrát + CSC-1 + KPG	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
Szubsztrát + MY lipáz	+	+	+	+	+	+			+			
Szubsztrát + MY lipáz + KPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* KPG = ketoprofen-monoglicerid

45. példa

Egyéb, a természetben előforduló természetes olajoknak (olajsav és egyéb savak triglicerid-észterei) a ketoprofen-monoglicerid CSC-2-vel végzett hidrolizisére gyakorolt hatását meghatározandó egy sor kisérletet végeztünk. 50 mg ketoprofen-monoglicerideket mértünk be Erlenmeyer lombikba. Ehhez 1 ml 100 mM ammónium-dihidrogén-foszfát pufferben (pH 5,5) oldott 1 mg CSC-2-t és 20 µl olajat valamint 9 ml puffert adtunk. A lombikokat 35 °C-on 250 ford/perc-cel 23 órán keresztül inkubáltuk. A reakciót savanyitással leállitottuk, az elegyet kloroformmal extraháltuk, és a 18. példában leirtak szerint analizáltuk. Az adalékok mellett megadtuk azoknak, mint olajsav glicerideknek százalékos összetételét is. A következő eredményeket kaptuk:

24. táblázat

Adalék	Oleátok az olajban (%)	Sav (%)	S-sav (ee%)
0		32	97
20 µl kukoricacsira olaj	43	41	96
20 µl földimogyoró olaj	42-61	42	96
20 µl szójaolaj	28-31	41	96
20 µl disznózsir	38-44	40	96
20 µl olivaolaj	64-84	41	96

(ee %) = enantiomer felesleg (%)

46. példa

S-Ketoprofen előállitása adalékok jelenlétében.

A reakcióelegyben lévő olajsavval illetve olajsav-észterekkel kapcsolatos problémák meghatározására a következő kisérletet végeztük. 250 ml-es Erlenmeyer lombikba 5 g ketoprofen-monogliceridet,50 mg CSC-2 enzimet és 5 g oleátot (olajakat vagy olajsavat) tettünk. A lombikokat 35 °C-os 250 ford/perc-es inkubátorba helyeztük, és a reakcióelegyet 200 µl-nyi alikvot mennyiségeket kivéve különböző időpontokban megmintáztuk. Ezeket a mintákat nagynyomású folyadékkromatográffal [ODS-3 RAC oszlop, metanol:10 mM ammónium-dihidrogén-foszfát (60:40) eluens, 4 ml/perc adagolás,254 nm-en végzett detektálás] analizáltuk, hogy meghatározzuk a reakció lefolyását. Amikor közelitőleg 40 % sav termelődött, a reakciót megállitottuk úgy, hogy a lombikokat -70 °C-os fagyasztóba helyeztük. Két extrakciós eljárást alkalmaztunk, hogy meghatározzuk a legjobb módszert az olajsavtól mentes S-ketoprofen izolálására. Az első módszernél (Extrakció I-gyel jelölve a következő táblázatban) az oldatot először nátrium-hidroxiddal meglúgositottuk (pH 10), majd hexánnal, utána kloroformmal extraháltuk. A vizes réteget azután sósavval pH 1,5-re savanyitottuk, hexánnal majd kloroformmal extraháltuk. A ketoprofen savat tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük, kloroformba extraháltuk, és a ketoprofen savat 5 %-os nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal kinyertük. Ezt azután kloroformmal extraháltuk, az oldószert elpárologtattuk, majd etanol segitségével kristályositottuk. Amint a 25. táblázatból is kitűnik

az olajsavat nem tudtuk a ketoprofentől tökéletesen elválasztani. A többi lombikot az Extrakció II eljárással extraháltuk. Az oldatokat először 6 M sósavval megsavanyitottuk (pH 1,5), majd a ketoprofen-savat és észtert kloroformmal extraháltuk. A ketoprofen-savat ezután 5 %-os nátrium-hidrogén-karbonát oldattal kivontuk, amelyet azután megsavanyitottunk, és kloroformmal extraháltuk. A kloroformot ledesztilláltuk és a ketoprofent kinyertük. Szilikagél lemezeken kloroform:metanol (95:5) elegy segitségével és jódgőzös előhivással végzett vékonyréteg-kromatográfiával illetve NMR vizsgálattal is a ketoprofen-sav olajsav tartalmát 5 % alatt találtuk. Az eredményeket a 25. táblázatban mutatjuk be.

25. táblázat

Eljárás	Sav (%)	Végsebesség µmol/óra/mg	Izolált sav (g)	Izolált S-sav (ee %)	Extrakció
CSC-2 magában	40,5	0,53	0,86	95,8	II
+Olivaolaj	37	1,1	1,07	95,4	II
+Olajsav	39	1,2	?	88,0	I
+Kukoricacsira-olaj	31	0,95	?	84,8	I
+Tween 80	34,9	0,46	0,78	94,3	II
+Span 85	28,9	0,87	0,84	95,1	II

(ee %) = enantiomer felesleg (%).

47. példa

Ebben a példában ásványolajnak ketoprofen-monoglicerid CSC-2-vel végzett hidrolizisére gyakorolt hatását mutatjuk be.

Azért, hogy meghatározzuk azt, hogy a paraffin-olajoknak van-e valamilyen, nem specifikus sebességnövelő hatása a ketoprofen-monoglicerid ketoprofenné történő, CSC-2-vel elősegitett konverziójára, megismételtük a 44. példában leirt, enzimatikus hidrolizis eljárást. Ezen kisérletben a reakcióelegy 2 tf %-ának megfelelő mennyiségű ásványolajat használtunk. A reakciót 23 óra elteltével leállitottuk,a reakcióelegyet megsavanyitottuk, kloroformmal extraháltuk, és a 18. példában leirtak szerint nagynyomású folyadékkromatográffal analizáltuk. Ásványolaj alkalmazásával nem volt jelentősebb sebességnövekedés megfigyelhető a savtermelődésben.

	Sav (%)
CSC-2	29
CSC-2 + 200 µl ásványolaj	30

48. példa

Ebben a példában a CSC-2 reakciósebesség növelő hatásának specifikusságát mutatjuk be olajsav használata esetén.

Az olajsavhoz és észtereihez (a már emlitett felületaktiv anyagokon kivül) közel hasonló vegyületek hatásának megállapitására egy kisérletsorozatot hajtottunk végre a 40. példában leirtakhoz hasonlóan, beleértve a szubsztrát oldatba vitelének elősegitésére használt 200 µl dimetil-formamid adagot is. A reakci-

ókat a 26. táblázatban jelzett időpontokban leállitottuk, a reakcióelegyet megsavanyitottuk, kloroformmal extraháltuk, és a 18. példában leirtak szerint nagynyomású folyadékkromatográfiával analizáltuk. Az eredmények a 26. táblázatban láthatók.

26. táblázat

Idő (óra)	Adalék		Sav (%)
18	0		23
18	200 µl	Triacetil	12
18	100 µl	Tributirin	3
23	0		29
23	200 µl	Linolsav	21
23	200 µl	Linolsav-metil-észter	34
23	200 µl	Linolsav-etil-észter	26
23	100 µl	Dilinolein	20
23	100 µl	Trilinolein	20
23	0		32
23	25 µl	Monosztearin	31
23	25 µl	Disztearin	30
23	25 µl	Trisztearin	25
23	20 µl	Linolénsav	13

49. példa

Ebben a példában az olajsavnak az MY lipázra, a CSC-1-re és a CSC-2-re gyakorolt sebességnövelő hatását mutatjuk be.

Annak meghatározására, hogy az MY lipázpreparátumban lévő melyik enzim reagál az olajsavra és annak észtereire a ketoprofen-észterek és különösen a ketoprofen-monoglicerid ketoprofenné történő konverziójakor a reakciósebesség megnövelésével, egy lombikba bemértünk 50 mg ketoprofen-monoglicerídet dimetil-formamid nélkül, és vagy 1 ml pufferben oldott 1 mg CSC-2-t vagy 1 ml pufferben oldott 1 mg CSC-1-et vagy 1 ml pufferben oldott 50 mg MY lipázt adtunk hozzá. Ezután a lombikba 9 ml puffert (100 mM ammónium-dihidrogén-foszfát; pH 5,5) adtunk, és néhány lombikba 200 µl olajsavat is. A lombikokat 35 °C-on 250 ford/perc mellett 21 órán keresztül inkubáltuk. A reakciót savanyitással leállítottuk, a rekacióelegyet kloroformmal extraháltuk, és a 18. példában leirtak szerint nagynyomású folydékkromatográffal analizáltuk. A 27. táblázatban látható eredményeket kaptuk:

27. táblázat

Enzim		Sav (%)	S-sav (ee %)
50 mg MY lipáz	0	31	81
	200 µl olajsav	46	83
1 mg CSC-1	0	6	85
	200 µl olajsav	5	84
1 mg CSC-2	0		
	200 µl olajsav	33	97
		52	97

(ee %) = enantiomer felesleg (%)

50. példa

Ebben a példában olajsavnak különböző ketoprofen-észterek MY lipázzal és B, Candida lipázzal (Biocatalyst) végzett hidrolizisére gyakorolt sebességnövelő hatását mutatjuk be.

Miután az olajsav megnövelte a ketoprofen-monoglicerid ketoprofenné történő konverziójának sebességét MY lipáz és CSC-2 esetén, egy sor ketoprofen-észtert vetettünk vizsgálat alá. 50 mg ketoprofen-észtert tettünk egy Erlenmeyer lombikba, és 1 ml pufferben oldott 50 mg MY lipázt vagy Biocatalyst lipázt (egy feltüntetett esetben 10 mg-ot; 16 óra reakcióidővel megismételtük) és 9 ml puffert adtunk hozzá. Néhány lombikba 200 µl olajsavat is tettünk. A reakcióelegyet 35 ^{o}C-on 250 ford/perc mellett 17 órán keresztül inkubáltuk, majd megsavanyitottuk, kloroformmal extraháltuk, és nagynyomású folyadékkromatográffal analizáltuk. Az adatokat a 28. táblázatban adjuk meg.

28. táblázat

Ketoprofen-észter szubsztrát	MY lipáz		Candida lipáz B	
	egyedül Sav(%)	+olajsav Sav(%)	egyedül Sav(%)	+olajsav Sav(%)
Metil	4	4	14	15
Propil	15	13	43	33
Hexil	4	7	26	15
2,2,2-Triklór-etil	34	13	41	39
Monoglicerid	23	40	44*	53*

*10 mg enzim, 16 óra reakcióidő

51. példa

Ebben a példában az olajsav okozta reakciósebesség- és sztereoszelektivitás-javulást mutatjuk be ketoprofen-2-klór-etil-észter esetében.

50 mg ketoprofen-(2-klór-etil)-észter felhasználásával (dimetil-formamid nélkül) kisérleteket végeztünk. A felhasznált enzim 50 mg MY lipáz vagy Candida lipáz B (Biocatalyst) volt, illetve 1 mg CSC-1 vagy CSC-2, mindegyik 1 ml pufferben oldva. Az olajsavat 200 µl-es adagokban használtuk, és a rendszerhez 9 ml puffert adtunk. A reakcióelegyet 35 °C-on 250 ford/perc mellett 15,5 órán keresztül inkubáltuk, majd megsavanyitottuk, és kloroformmal extraháltuk. Az analizist a 18. példában leirtak szerint végeztük el. A kapott adatokat a 29. táblázatban tesszük közzé.

29. táblázat

Ketoprofen-(2-klór-etil)-észter

Enzim	Adalék	Sav (%)	S-sav (ee %)
50 mg MY lipáz	0	12	21
	200 µl olajsav	20	87
1 mg CSC-2	0	12	93
	200 µl olajsav	26	99
1 mg CSC-1	0	4	89
	200 µl olajsav	2	55
50 mg Candida lipáz B	0	8	25
	200 µl olajsav	9	85

(ee %) = enantiomer felesleg (%).

52. példa

Ebben a példában az olajsavnak egyéb enzimek reakciósebességére és sztereospecifitására gyakorolt hatását mutatjuk be egyéb ketoprofen-észterek esetében.

Annak eldöntésére, hogy az olajsavat lehet-e más lipázok illetve szubsztrátok reakciósebességének illetve szelektivitásának fokozására használni a következő kisérletet végeztük. 50 mg dietilén-glikol-észtert vagy trietilén-glikol-monometil-észtert vagy monoglicerid-észtert vagy etilén-glikol-észtert 50 ml-es Erlenmeyer lombikba tettünk. Hozzá-

adtunk 50 mg MY lipázt, 50 mg Mucor miehei lipázt, 2,5 mg Candida cylindracea lipázt (Biocatalyst) vagy 5 mg OF lipázt, mindet 1 ml pufferben oldva. Használtunk 10 µl sertésmáj észterázt is. Egyes lombikokba 200 µl olajsavat is tettünk. A lombikok tartalmát pufferrel 10 ml-re kiegészitettük, majd a lombikokat 35 ^{o}C-on 250 ford/perc-nél inkubáltuk, a tartalmukat megsavanyitottuk, kloroformmal extraháltuk, és a 18. példában leirtak szerint nagynyomású folyadékkromatográffal analizáltuk. A kapott adatokat a 30. táblázatban mutatjuk be.

30. táblázat

Egyéb ketoprofen-észterek

	Dietilén-glikol		Monometil--trietilén-glikol		Monoglicerid		Etilén-glikol	
	Sav(%)	(ee%)	Sav(%)	(ee %)	Sav(%)	(ee%)	Sav(%)	(ee %)
MY lipáz	38	48	16	62	18	70	9	60
+olajsav	41	66	16	81	37	82	27	95
Mucor miehei	24	41R	26	36R	20	40R	17	54R
+olajsav	20	2R	6	1R	4	35R	10	42R
Sertésmáj észteráz	11	?	20	2R	10	36R	3	51R
+olajsav	5	8	5	15	1	14R	3	64R
Biocatalyst								
Candida lipáz	24	54	9	60	19	57	7	47
+olajsav	33	53	10	70	34	78	25	91
OF lipáz	40	39	17	61	35	41	13	31
+olajsav	48	60	18	81	48	69	39	88

53. példa

Ebben a példában az olajsav hatását a ketoprofen észterek hidrolizisének elősegitésére szabad vagy immobilizált enzimek esetében mutatjuk be.

200 mg ketoprofen-etilén-glikol-észtert vagy ketoprofen-monogliceridet tettünk egy Erlenmeyer lombikba, és 1 ml pufferben oldott 1 mg CSC-2-t vagy 200 mg szilikagélen (279-SD1)immobilizált CSC-2-t adtunk hozzá a 24. példa 16. kisérlete szerint (1 mg szabad enzimmel egyenértékű mennyiségnek határoztuk meg). 0, 50, 200, 500 és 1000 µl olajsavat adtunk az elegyhez, majd azt pufferrel 10 ml végső reakciótérfogatra egészitettük ki. A reakciót 14 és 21 óra reakcióidő között savanyitással leállitottuk, az elegyet kloroformmal extraháltuk, és a százalékos savtartalmat valamint a százalékos enantiomer felesleget (S-sav %) a 18. példában leirtak szerint meghatároztuk. A kapott eredményeket a 31. táblázatban közöljük.

31. táblázat

Enzim	Szubsztrát	Olajsav (µl)	Sav (%)	S-sav (ee%)
Immobilizált CSC-2	Ketoprofen--etilén-glikol--észter	0	2	95
		50	2	95
		200	5	97
		500	11	97
		100	18	98
Szabad CSC-2	Ketoprofen--etilén-glikol-észter	0	3	93
		50	5	97
		200	12	98
		500	28	97
		1000	33	97
Immobilizált CSC-2	Ketoprofen--monoglicerid--észter	0	1	87
		50	2	92
		200	4	93
		500	5	92
		1000	7	92
Szabad CSC-2	Ketoprofen--monoglicerid--észter	0	1	91
		50	3	93
		200	9	95
		500	15	94
		1000	21	96

54. példa

Ebben a példában olajsavnak, hexánnak és viznek CSC--2-vel történő ketoprofen előállitásra gyakorolt hatását mutatjuk be.

Annak eldöntésére, hogy vajon az átészterezés lehetséges-e enzimatikus hidrolizis nélkül, és hogy elkerüljük az olajsav-vizes puffer kétfázisú rendszerben eredendően felléphő problémákat, megkiséreltük a ketoprofen-észterek ketoprofenné történő enzimatikus konverzióját különböző arányú hexán-olajsav elegyekben végrehajtani. Ebben a kisérletben 200 mg ketoprofen-etilén-glikol-észtert és 200 mg, szilikagélen (279-SDl) immobilizált CSC-2-t (1 mg szabad enzimmel egyenértékű mennyiség) használtunk a fenti, 53. példában leirtak szerint, valamint különböző mennyiségű hexánt és olajsavat (10 ml: 0 ml aránytól 0 ml:10 ml arányig). Néhány lombikba 50 µl puffert (0,5 tf % a reakcióelegyre vonatkoztatva) is adtunk. A lombikokat 35 °C-on 250 ford/perc mellet inkubáltuk, majd 17,5 óra elteltével 200 µl-es mintákat vettünk, metanollal higitottuk, és közvetlenül a nagynyomású folyadékkromatográfba fecskendeztük. A standard ODS-3 RAC oszlopot metanol:10 mM ammónium-dihidrogén-foszfát (60:40) eleggyel eluáltuk 4 ml/perc adagolás mellett, és 254 nm-en detektáltunk. Az adatokat a 32. táblázatban adjuk meg:

32. táblázat

Hexán (ml)	Olajsav (ml)	Puffer (µl)	Sav (%)	Reakciósebesség µmol/óra/mg
10	0	0	1	<1
10	0	50 µl	0	0
8	2	0	18	6
8	2	50 µl	15	5
2	8	0	5	2
2	8	50 µl	13	4
0	10	0	5	2
0	10	50 µl	10	4

55. példa

Ebben a példában szerves oldószereknek a ketoprofen termelésre gyakorolt hatását mutatjuk be.

Az olajsav jelenlétében használt szerves oldószerek optimalizálására számos szerves oldószert próbáltunk ki számos ketoprofen-észterrel együtt. Ezen kisérlet során 50 mg ketoprofen-észtert mértünk be a lombikokba, és 1 ml olajsavat valamint 9 ml szerves oldószert adtunk hozzá. A lombikokat lezártuk, és 35 °C-on 250 ford/perc mellett 10-26 órán keresztül inkubáltuk, mielőtt a reakciót leálliottuk volna, először 4 ml kloroformot adtunk hozzá, hogy oldhatóvá tegyük a szubsztrátokat és a termékeket, majd egy 0,2 µm-es Gelman Nylaflo szűrőn leszűrtük. A mintákat ezután metanollal higitottuk, és a 18. példában leirtak szerint nagynyomású folya-

dékkromatográffal analizáltuk. A kisérletet 200 µl olajsav és 10 ml puffer alkalmazásával is elvégeztük, utána savanyitottuk, kloroformmal extraháltuk, és nagynyomású kromatográffal analizáltuk, mint az előbb. Az adatokat a 33. táblázat tartalmazza.

33. táblázat

Ketoprofen-észter	10 ml puffer 200 µl OA Sav (%) (ee %)	9 ml hexán 1 ml OA Sav (%) (ee %)	9 ml toluol 1 ml OA Sav (%) (ee %)	9 ml izooktán 1 ml OA Sav(%) (ee %)	9 ml $CHCl_3$ 1 ml OA Sav (%) (ee %)
Etilén-glikol-észter	21 (98)	29 (95)	0	47 (98)*	0
Monoglicerid-észter	26 (96)	47 (97)	0	31 (96)	0
2-klór-etil-észter	18 (96)	7 (92)	1 (<1)	18 (97)	2 (3)
Dietilén-glikol-észter	32 (30)	56 (13)*	NM	60 (17)*	NM
Metil-észter	2 (96)	0,8	0	2 (93)	0

* Reakció 10 óra elteltével megállitva

OA = Olajsav; NM = nincs meghatározva

56. példa

Mivel úgy tűnt, hogy a ketoprofen-monoglicerid és a ketoprofen-etilén-glikol-észter a leghatékonyabb észter szerves oldószerekben, kisérleteket végeztünk ketoprofen-monoglicerid és ketoprofen-etilén-glikol-észter felhasználásával számos oldószerrel illetve pufferrel, minden esetben 1 ml olajsav jelenlétében. 50 mg ketoprofen-monogliceridet vagy ketoprofen-etilén-glikol-észtert bemértünk egy Erlenmeyer lombikba 100 mg, szilikagélen (279-SD-1) immobilizált CSC-2-vel együtt, amely 0,5 g szabad enzimmel volt egyenértékű. Ehhez hozzáadtunk 1 ml olajsavat és 9 ml puffert (100 mM ammónium-dihidrogén-foszfát; pH 5,5) vagy oldószert. A lombikokat 35 ^{o}C-os inkubátorba helyeztük és 250 ford/perc-cel rázattuk 13 órán keresztül. A reakciót 5 ml kloroform hozzáadásával megállitottuk, hogy a szerves anyagot oldhatóvá tegyük, majd az oldatot 0,2 µm-es Gelman Nylaflo membránon átszűrtük, hogy az enzimet eltávolitsuk. A mintákat egy ODS-3 RAC oszlopon analizáltuk, eluensként metanol:10 mM ammónium-dihidrogén-foszfát (60:40) elegyet használva, 4 ml/perc adagolással 254 nm-en végzett detektálással. A százalékos enantiomer felesleget a diasztereomer amidoknak a fenti nagynyomású folyadékkromatográfiás rendszeren végzett resolválásával határoztuk meg a 18. példában leirtak szerint. Az eredményeket a 34. táblázatban adjuk meg:

34. táblázat

Oldószer 9 ml/1 ml olajsav	Ketoprofen--monoglicerid-észter		Ketoprofen--etilén-glikol-észter	
	Sav (%)	S-sav (ee%)	Sav (%)	S-sav (ee%)
Puffer/Olajsav	17	97	19	97
Hexán/Olajsav	12	94	16	87
Izooktán/Olajsav	39	98	48	97
Ciklohexán/Olajsav	38	98	29	83
Ciklohexén/Olajsav	12	94	3	52
Ciklooktén/Olajsav	38	98	16	92
Tetrahidronaftalin/Olajsav	2	68	1	1
1,1,1-Triklór-etán/ Olajsav	1	0	0	0
Tetraklór-etilén/Olajsav	1	0	0	0

57. példa

Egy másik, az Enzyme Development Corporation-től beszerezhető, Candida rugosaból származó lipázt, az Enzeco Rxx-et SDS-PAGE-sel és izoelektromos fókuszálással (IEF) is megvizsgáltuk. Az SDS-PAGE alapján az Enzeco Rxx molekulatömege egy kissé nagyobb volt, mint a CSC-2-é (12.ábra). Mindazonáltal az izoelektromos fókuszálásnál egy fő sáv ugyanazon az izoelektromos ponton mutatkozott, mint a CSC-2-nél.

Az Enzeco Rxx aktivitásának 50 mg, 10 ml 100 mM ammónium-dihidrogén-foszfát pufferben (pH 5,5) oldott 50 mg

ketoprofen-gliceriddel vagy ketoprofen-etilén-glikol-észterrel, 200 µl olajsav adalékolással vagy anélkül végzett vizsgálatának eredményei 35 °C-on 750 ford/perc mellett történő 18 órás inkubálási poriódus után a 35. táblázatban láthatók.

35. táblázat

Enzim	Olajsav	Ketoprofen-monoglicerid			Ketoprofen-etilén-glikol-észter		
		Sav (%)	Reakcióse-besség (mmol/óra/mg)	S-sav (ee%)	Sav (%)	Reakcióse-besség (mmol/óra/mg)	S-sav (ee %)
CSC-2	200 µl	44	4	98	60	5	97
CSC-2	0	75	1	95	20	2	93
Enzeco Rxx	200 µl	33	3	66	36	3	83
Enzeco Rxx	0	33	3	22	20	20	19

58. példa

Ebben a példában az MY lipáz izoenzimjeinek szétválasztását és tisztitását mutatjuk be izoelektromos fókuszálás alkalmazásával.

Az ioncserélő oszlopok alkalmazásával szemben, alternativ módszerként egy preparativ izoelektromos fókuszáló cellát használtunk, hogy az MY lipáz izoenzimjeit egyedi elektromos töltésük alapján szétválasszuk. Az MY lipázt, amelyet előzőleg egy Trisacryl GF-05 oszlopon sómentesitettünk, liofilizáltuk és 400 mg-ot 50 ml, 2 ml 2,5-5,0 pH-jú amfolitokat tartalmazó ionmentes vizben feloldottunk. Ezt a mintát a preparativ izoelektromos fókuszáló cellában 12 W teljesitménnyel 4 ^{0}C-on 4 órán keresztül fókuszáltuk. A feszültség és az áramerősség lényegében nem volt korlátozva (3000 V és 150 mA). 4 óra elteltével vákuum-leszivóval mintát vettünk, pH-jukat és fehérjetartalmukat (az amfolit eltávolitása céljából végzett) dializálás nélkül meghatároztuk. Az eredményeket a 13. ábra diagramján mutatjuk be. A frakciók egy 3-9 pH-jú analitikai izoelektromos fókuszálás géljén látható a kapott CSC-2 lipáz (8-12. frakció) és CSC-1 lipáz (13-17. frakció) elválasztása. A frakciók aktivitásának demonstrálására mindegyik frakció 1 ml-ét vizes pufferben megvizsgáltuk sztereospecifikus hidrolizációs aktivitásukra nézve 50 mg ketoprofen-monoglicerid esetén 200 µl olajsav jelenlétében, vagy anélkül a 18. példában leirt módszer szerint. A frakciók aktivitását és a százalékos enantiomer felesleget a 36. táblázaton mutatjuk be:

36. táblázat

pH	Frakció %	Sav	S-sav (ee %)
3,9	2	3	63
	2 + olajsav	6	86
4,15	4	8	92
	4 + olajsaV	23	96
4.1	5	4	85
	5 + olajsav	14	94
4,2	7	8	90
	7 + olajsav	30	96
4,3	9	18	96
	9 + olajsav	43	98
4,4	11	11	95
	11 + olajsav	40	97

59. példa

Ebben a példában AY lipáz CSC-1 és CSC-2 előállitására való felhasználását mutatjuk be.

40 mg AY 30 lipázt (Amano) 40 ml ionmentes vizben feloldottunk, egy 2000 molekulatömegű részeket áteresztő, zárt dializáló zsákban dializáltunk kétszer 10 l ionmentes vizben 18 órán keresztül. A visszamaradt anyagot 7500 ford/perc-cel, 20 percig centrifugáltuk, és a kivált anyagot eldobtuk. A felülúszó fázist ezután egy SP-Trisacryl M ioncserélő gyantával töltött oszlopon (13x25 cm) kromatografáltuk. Az SP-Trisacryl M

oszlopot előzőleg 25 mM nátrium-acetáttal (pH 3,3) hoztuk egyensúlyba. A felülúszó fázist 50 ml/óra adagolással vittük fel az oszlopra; az oszlopot az egyensúlyi pufferrel alapvonalig mostuk, és 25 mM acetát pufferrel (pH 4,6) eluáltuk, amelyet egy 25 mM acetát pufferrel (pH 6,4) történő eluálás követett. A futtatás során összegyűjtött frakciókat izoelektromos fókuszálással analizáltuk. A CSC-1-et és a CSC-2-t ezen eljárás során sikerült hatékonyan szétválasztani.

60. példa

Ezen a példán mutatjuk be, hogyan nő az MY lipáz sztereoszelektivitása az immobilizálással és a használattal.

150 mg szabad vagy immobilizált lipázt 10 ml pH 7 puffer és 5 ml 1 M HPPA-Me elegyében megvizsgáltunk. Az immobilizált enzim szelektivebbnek mutatkozott. A hidrolizis mindazonáltal nem állt le azután, hogy az R-észter teljesen elfogyott.

37. táblázat

Szabad enzim és immobilizált enzim összehasonlitása

Idő (óra)	Szabad %R(%konv.)	XAMA-2 %R(% konv.)	XAMA-7 %R(% konv.)
4	73 (16)	87 (15)	84 (17)

61. példa

Reakciókörülmények

400 mg (R,S)-HPPA —Me szubsztrátot egy 500 ml-es Erlenmeyer lombikba tettünk, és 200 ml 0,20 M kálium-dihidrogén--foszfát-puffert (pH 6,5) adtunk hozzá, amelyet 0,3 g MY lipáz követett. Az elegyet szobahőmérsékleten (25 °C) 250 ford/perc mellett egy Dubnoff rázógépen 21,5 óráig rázattunk. 0 és 6,5 óra reakcióidő között félóránként, azután 21,5 óra reakcióidő elteltével mintát vettünk analizis céljára.

pH optimalizálás

196 mg (R,S)-HPPA-Me-t adtunk egy sor 100 ml-nyi foszfát puffer oldatot tartalmazó 250 ml-es Erlenmeyer lombikba, amelyek pH tartománya 4 és 8,5 között változott 0,5-es különbségekkel. Az elegyet 20 percig rázattuk, hogy az észtert feloldjuk. 1 mg/ml-es MY lipázoldatot készitettünk, 20 percig 7500 ford/perc-cel centrifugáltuk, majd a felülúszó fázisból 0,5 ml-t adtunk mindegyik lombikhoz. A lombikokat ezután egy szobahőmérsékletű Dubnoff rázógépbe tettük, és 7 óránként mintát vettünk az (R,S)-HPPA-Me (R)-HPPA-vá történő százalékos konverziójának és a végtermék enantiomerikus tisztaságának meghatározása céljából.

Nagy (R,S)-HPPA-Me koncentrációk hatása

1,5 mol (R,S)-HPPA-Me-t elegyitettünk 1 l 0,5 M foszfátpufferrel (pH 7,0). A reakcióelegy hőmérsékletét vizfürdőben 40-45 °C között állitottuk be, majd 1 g MY lipázt adtunk az elegyhez. A reakcióelegyet 114 órán keresztül mechani-

kusan kevertük, és különböző időpontokban mintát vettünk a termelt (R)-HPPA enantiomer tisztaságának és koncentrációjának meghatározása céljából.

Az optimális hőmérséklet

294 g (R,S)-HPPA-Me-t tettünk egy 2 l-es Erlenmeyer lombikba 1 l 1 M ammónium-acetáttal (pH 7,05), 150 ml toluollal és 2 g MY lipázzal együtt. A reakcióelegy hőmérsékletét egy hűtött illetve fűtött vizfürdővel 12, 21, 35 és 45 ^{o}C-on tartottuk. A vizes rétegből időnként mintát vettünk a termelt HPPA koncentrációjának és az (R)- illetve (S)-HPPA relativ mennyiségének meghatározása céljából.

Termék inhibició

A. A hidrolizis során keletkező alkohol aktivitást gátló hatása.

Két hidrolizis reakciót játszattunk le a HPPA-Me hidrolizisének melléktermékeként keletkező metanolnak az MY lipáz aktivitására gyakorolt hatásának meghatározására. 1,5 mol (R,S)-HPPA-Me-t, 1,5 l 1M ammónium-acetát-oldatot (pH 6,5), 150 ml toluolt és 2 g MY lipázt tettünk a lombikokba 0,75 mol metanollal és anélkül. Az elegyeket enyhén rázattuk, és különböző időpontokban mintát vettünk a keletkezett HPPA sztereoizomerjei koncentrációjának meghatározása céljából.

B. Az aktivitás gátlása az (R)-HPPA által

Az (R,S)-HPPA-Me hidrolizise során keletkező (R)-HPPA-nak az MY lipáz aktivitására gyakorolt hatásának meghatározása céljából egy három kisérletből álló kisérlet-

sorozatot végeztünk. 200 ml 0,04 M ammónium-acetát-oldatot (pH 7,0) elegyitettünk 30 ml toluollal, 40 mmol (R,S)-HPPA--Me-vel, 25 mg MY lipázzal és 0,30 és 100 mmol (R)-HPPA-val. A reakcióelegyeket 136 órán keresztül enyhén rázattuk, és különböző időpontokban megmintáztuk a keletkezett HPPA sztereoizomerjei koncentrációjának meghatározása céljából.

C.A A higitás hatása

Az alapanyag koncentrációjának az MY lipáz aktivitására gyakorolt hatása meghatározásának céljából olyan reakcióelegyeket készitettünk, amelyekben 25, 175 és 375 ml viz, 0,04 mol HPPA-Me, 0,04 mol ammónium-acetát (pH 7,0-ra beállitva), 30 ml toluol és 25 ml vizben oldott 25 mg MY lipáz volt. Az elegyet 164 órán keresztül rázattuk. A vizes rétegből különböző időpontokban vett mintákat megelemeztük a keletkezett HPPA sztereoizomerjei koncentrációjának meghatározása céljából.

Kilogramm léptékű reakció

25 g MY lipázt 1 l 0,2 M ammónium-acetát-oldatban (pH 6,5) 20 percen keresztül kevertünk, majd az elegyet 10 000 g-vel lecentrifugáltuk és a felülúszó fázist 9 l vizben és 2,5 l toluolban oldott 1,176 (R,S)-HPPA-Me-hez adtuk, majd az elegyet 29 órán keresztül enyhén kevertük. Időközönként mintát vettünk, és nagynyomású folyadék-kromatográffal analizáltuk. A reakció végeztével a vizes fázist elkülönitettük és metilén-dikloriddal extraháltuk. A vizes fázis pH-ját ezután 2,1-re állitottuk, majd etil-acetáttal extra-

háltuk. A viznyomok eltávolitása végett magnézium-szulfátot adtunk a rendszerhez. Az etil-acetátot vákuum alatt lehajtottuk, és a terméket világosbarna por formájában kaptuk meg.

Eredmények

A megadott nagynyomású folyadékkromatográfiás paraméterek biztositották az észter és az enantiomer savizomerek alapvonalának szétválasztását (14. ábra). Az (R,S)-HPPA-Me eluciós ideje 1,3 perc, az (R)-HPPA eluciós ideje 8,8 perc és az (S)-HPPA- eluciós ideje 12,4 perc volt.

A kiindulási reakcióparaméterek esetén 88 % enantiomer feleslegű optikai tisztaságot kaptunk az (R,S)-HPPA-Me 35 %-os hidrolizisét követően.

A pH-nak a hidrolizis sebességére és a sztereospecifitásra gyakorolt hatását a 38. táblázatban mutatjuk be. Az enzimatikus hidrolizisre optimális pH 8,0 volt, amikoris 51 %-os konverziót értünk el 7 órás reakcióidőt követően (146,6 mmol/óra/mg). A sebességoptimumnak elég széles tartománya volt a hidrolizis sebességével együtt, pH 6,5 és 8,5 között alig változott, A sztereoszelektivitás optimális pH-ja 3-4 volt, ahol az enantiomer felesleg 88 % volt az (R)-HPPA-ra vonatkoztatva. Ezen pH tartományban az aktivitás azonban alacsony volt. Az összes további kisérletet pH 6,5-en játszattuk le, hogy kielégitő aktivitást és enantiomer tisztaságot tudjunk fenntartani. Az enzim nélkül végzett kontrolkisérletek azt mutatják, hogy a pH 7 fölötti értékek fokozták az (R,S)-HPPA-Me kémiai hidrolizisét, és csökkentették az enantiomer tisztaságot. A keletkezett HPPA enantiomer tisztasága

csökkent akkor is, amikor a százalékos konverzió az 50 %-ot megközelitette (lásd az 50. ábrát) Ez az MY lipáz HPPA-Me szubsztrátra vonatkozó nem tökéletes specifitásnak tudható be.

Egy kisérletet végeztünk annak meghatározására, hogy az (R,S)-HPPA-Me telitett, vizes oldatának milyen hatása van az enzim aktivitására és a termék enantiomer tisztaságára. A HPPA-Me vizoldhatósága 25 mmol/l-nél is kisebb pH 6,5-en, mig a HPPA jól oldódik vizben pH 6,5-nél. Az enzimnek mind a sztereoszelektivitása, mind az aktivitása károsodott, ha az oldatot (R,S)-HPPA-Me-rel telitettük. Az enzim sztereoszelektivitása tökéletesen megszűnt (R,S)-HPPA-Me-rel telitett oldatokban. Az enzim aktivitása 25 mM (R,S)-HPPA-Me-ben 4 % konverzió mellett 6,5 mmol/óra/mg volt. Ha összehasonlitjuk ezt az értéket a szubsztrát telitettség esetében kapott értékkel (lásd a 39. táblázatot), az aktivitás 6,5-szer volt magasabb 25 mM HPPA-Me oldat esetén.

Az (R,S)-HPPA-Me enzimatikus hidrolizisének optimális hőmérséklete pH 7,0-nél és 20 %-os hidrolizis mellett 21 ^{o}C volt (lásd a 40. táblázatot). A kezdeti aktivitás 35 ^{o}C vagy 45 ^{o}C esetében lényegesen magasabb volt, azonban amint az várható volt, az aktivitás gyorsan csökkent, ezáltal jelezve az enzim inaktiválódását. A reakciók hőmérsékletében történt eltérések nem befolyásolták az enzim sztereoszelektivitását.

A HPPA-Me hidrolizisének termékeit, a metanolt és a HPPA-at egymástól függetlenül vizsgáltuk, hogy meghatározzuk az enzimre gyakorolt hatásukat. Ha a hidrolizis reakció kezde-

tekor 0,5 mol/l-nyi metanolt adtunk a rendszerhez, ez az enzim HPPA-Me-rel szemben mutatott aktivitásának 39 %-os csökkenéséhez vezetett. Különböző mennyiségű (R)-HPPA-nak a hidrolizis reakció kezdetekor történt beadagolása az enzim aktivitásának 10-67 %-os csökkenéséhez vezetett (lásd a 16. ábrát). A HPPA növekvő koncentrációja ennek megfelelő csökkenést okozott az enzim aktivitásában.

A higitásnak az enzimre gyakorolt hatását egy kétfázisú rendszer esetében a 17. ábrán mutatjuk be. A vizes fázis higitásával a reakciósebesség lényegesen megnőtt, bár az észter szinte teljes egészében a toluolos rétegben volt található.

Kilogrammos léptékű reakcióban, miután a fent kapott optimális paramétereket alkalmaztuk, az előállított (R)-HPPA optikai tisztasága 84 % enantiomer felesleg volt 39 %-os konverzió mellett (lásd a 18. ábrát). Az ilyenformán kapott termék optikai tisztaságát többféle szerves oldószerből, igy etil-acetátból és kloroformból történő átkristályositással növelni lehet.

38. táblázat

MY lipáz, aktivitása és sztereospecifitása az oldat pH-jának függvényében*

pH	Konverzió (%)	Aktivitás µmol/óra/mg	(ee %)
3,0	34	96	89
4,0	33	95	88
4,5	35	100	87
5,0	36	103	86
5,5	38	109	84
6,0	42	121	80
6,5	47	134	78
7,0	46	133	77
7,5	50	142	76
8,0	51	147	67
8,5	48	136	52

* 196 mg (R,S)-HPPA-Me-t, 100 ml megadott pH-jú foszfátpuffert és 0,5 ml 20 perces, 7500 ford/perc-cel végzett centrifugálással előállitott 1 mg/ml-es MY lipáz oldatot hét órán keresztül reagáltattunk, és az elegyet nagynyomású folyadékkromatográffal analizáltuk.

39. táblázat

(R,S)-HPPA-Me-vel történő telítés hatása az enzim aktivitására*

Idő (óra)	HPPA (mM)	Aktivitás µmol/óra/mg (%-os konverzió)		(R)-HPPA (ee %)
18	19,8	1,1	(2)	18
45	41,4	0,92	(4)	8
65	66,2	1,0	(7)	4
114	114	0,8	(11,4)	6

* 1,5 mol(R,S)-HPPA-Me-t 1 l 0,5 M foszfátpufferben (pH 7,0) 1g MY lipázzal 40-45 ^{o}C-on 114 órán keresztül kevertünk, és a mintákat az ábrán jelzettnek megfelelően analizáltuk.

40. táblázat

Hőmérséklet hatása az aktivitásra és a sztereoszelektivitásra*

Idő	12 °C		21 °C		35 °C		45 °C	
(óra)	[HPPA]	(ee %)	[HPPA]	(ee %)	[HPPA]	(ee %)	[HPPA]	(ee %)
1	-	-	-	-	28	94	31	92
3	-	-	-	-	67	96	52	92
20	-	-	-	-	154	92	101	90
31	115	90	178	-	-	-	-	
44	201	92	255	94	209	92	162	90
51	202	92	269	94	-	-	-	-
69	227	92	248	90	-	-	-	-
88	253	92	289	88	-	-	-	-

* 294 g HPPA-Me-t, 1 l 1 M ammónium-acetát-oldatot (pH 7,05), 150 ml toluolt és 2 g MY lipáz elegyét a megadott hőmérsékleten tartottunk. A vizes réteg mintáit az 1. ábrának megfelelően analizáltuk.

A mellékelt ábrák a következők:

Ábrák jegyzéke

1. ábra MY lipáz, AY lipáz és Biocatalyst lipáz SDS-PAGE analizise
2. ábra Kereskedelemben beszerezhető C. rugosa lipázok izoelektromos fókuszálási gélje, pI 3-9.
3. ábra MY lipáz SP-TrisAcryl M-en felvett kromatogramja.
4. ábra MY lipáz SP-TrisAcryl M-en kapott oszlop frakcióinak izoelektromos fókuszálási gélje, pI 3-9.
5. ábra MY lipáz SP-Sephadex-en felvett kromatogramja
6. ábra MY lipáz SP-TrisAcryl LS-en kapott oszlop frakcióinak izoelektromos fókuszálási gélje, pI 3-9.
7. ábra MY lipáz SP-TrisAcryl LS-en felvett kromatogramja.
8. ábra Szerves savak hatása az MY lipáz immobilizálására
9. ábra Sztearinsav (0-20 %) hatása az MY lipáz immobilizálására
10. ábra Stearinsav (0-10 %) hatása az MY lipáz immobilizálására
11. ábra Az immobilizált CSC-1 lipáz stabilitása
12. ábra C. rugosa lipázok, CSC-2 és ENZECO Rxx SDS-PAGE analizise
13. ábra MY lipáz preparativ izoelektromos fókuszálása.
14. ábra Kromatogram
15. ábra Konverzió enantiomer felesleg diagram
16. ábra Keletkezett HPPA reakcióidő diagram
17. ábra Keletkezett HPPA reakcióidő diagram
18. ábra Százalékos konverzió reakcióidő diagram

ÁBRÁK MAGYARÁZATA

1. ábra MY lipáz AY lipáz és Biocatalyst lipáz SDS-PAGE analizise

1. és 4. sáv Biocatalyst lipáz; 2. és 5. sáv AY lipáz (Amano); 3. és 6. sáv MY lipáz (Meito Sangyo). (Lásd az 1. példát).

2. ábra Kereskedelemben beszerezhető C. rugosa lipázok izoelektromos fókuszálás gélje, pI 3-9.

A gélt 390 volt.óra-val futtattuk. 1. sáv Sigma lipáz; 2. sáv OF lipáz; 3. sáv MY lipáz; 4. sáv AY lipáz; 5. sáv Biocatalyst lipáz; 6. sáv pI standardok. (Lásd a 10. példát).

3. ábra MY lipáz (C.rugosa) SP-TrisAcryl M-en felvett kromatogramja.

25 mM nátrium-dihidrogén-foszfát-oldattal (pH 3,3) egyensúlyba hozott 2,5x20 cm-es oszlopra 25 mM nátrium-dihidrogén-foszfátban oldott 1 g MY lipázt vittünk fel. A fehérjét két frakcióként eluáltuk pH 4,75-ös citrát-foszfát puffer majd 6,80-as citrát-foszfát-puffer alkalmazásával. (Lásd a 11. példát).

4. ábra MY lipáz SP-TrisAcryl M-en kapott oszlop frakcióinak izoelektromos fókuszálás gélje, pI 3-9.

1. sáv MY lipáz; 2. sáv áttört frakció; 3. sáv az 1. csúcs fehérjéje; 4. sáv a 2. csúcs fehérjéje; 5. sáv a 3. csúcs fehérjéje; 6.sáv pI 3-9 standardok. A gél ezüst festéssel lett előhiva. (Lásd a 11. példát).

5. ábra MY lipáz (C.rugosa) SP-Sephadex-en felvett kromatogramja.

1,3 g citrát-foszfát pufferben (pH 3,3) oldott MY lipázt vittünk fel egy ugyanezen pufferrel egyensúlyba hozott 2,5x20 cm-es oszlopra: Lépcsőzetes eluálást alkalmaztunk pH 4,70-es citrát-foszfát pufferrel, amelyet egy pH 6,80-as citrát-foszfát puffer követett.

6. ábra MY lipáz SP-TrisAcryl LS-en kapott oszlopfrakcióinak izoelektromos fókuszálás gélje, pI 3-9.

1. és 8. sáv izoelektromos fókuszálás pI standardjai; 2. és 3. sáv MY lipáz minták; 4. és 5. sáv pH 6,8o-as pufferrel eluált, összegyűjtött fehérje (CSC-1); 6. és 7. sáv pH 4,75-nél eluált, összegyűjtött fehérje (CSC-2). A gél ezüst festéssel lett előhiva. (Lásd a 13. példát)

7. ábra MY lipáz SP-TrisAcryl LS-en felvett kromatogramja

Az oszlopot (9x45 cm) 25 mM nátrium-foszfáttal (pH 3,2) hoztuk egyensúlyba. 150 g MY lipázt oldottunk 3 liter 25 mM-es nátrium-dihidrogén-foszfát-oldatban (pH 6,5), a szilárd anyagot eltávolitottuk, és a pH-t 3-ra állitottuk be. Az eluálás részleteit a 3. ábra magyarázatában adtuk meg. (Lásd a 14.ábrát).

8. ábra. Szerves savak hatása az MY lipáz immobilizálására.

0,45 g MY lipázt, 0,9 g Amberlite OP-1-et és 100 mg XAMA-7-et 10 ml-nyi 30-50 mg telitett savat tartalmazó toluollal elegyitettünk. Kezelés, hidratálás

és mosás után az enzimet a HPPA-Me észter hidrolizisére gyakorolt aktivitására megvizsgáltuk. (Lásd a 26. példát).

9. ábra. Stearinsav (0-20 %) hatása az MY lipáz immobilizálására.

MY lipázt immobilizáltunk különböző sztearinsav koncentrációkat alkalmazva a 8. ábra magyarázatában leirtak szerint. Megvizsgáltuk a HPPA-Me észter hidrolizisére gyakorolt aktivitást. (Lásd a 27. példát).

10. ábra Sztearinsav (0-10 %) hatása az MY lipáz immobilizálására.

MY lipázt és DP-1 gyantát elegyitettünk, majd a kapott anyagot pH 4,5-es pufferből liofilizáltuk, mielőtt XAMA-7-et és sztearinsavat tartalmazó toluolt adtunk volna hozzá. Az oldószert elpárologtattuk, hogy megtörténjen a polimerizáció. Az aktivitást a 8. ábra magyarázatában leirtak szerint megvizsgáltuk.

11. ábra Az immobilizált CSC-1 lipáz stabilizálása

Izolált, XAMA-7-tel és Amberlite DP-1 gyantával immobilizált CSC-1 lipázt (lásd a 13. példát) használtunk katalizátorként 25 mM HPPA-Me-észter konvertálására. Az oszlopot (1x24 cm) 0,75 ml/perc adagolással működtettük 1 g/l nátrium-ditionit jelenlétében. Az enzimatikus aktivitást naponta vizsgáltuk. (lásd a 33. példát).

12. példa C.rugosa lipázok, CSC-2 és ENZECO Rxx SDS-PAGE analizise

A fehérjemintákat egy 8-15 % gradiensű poliakril-amid gélen választottuk szét. 1. sáv Enzeco Rxx lipáz; 2. sáv CSC-2 lipáz; 3. sáv molekulatömeg standardok. A fő, 60 kilodaltonos lipázsávot nyil mutatja. (Lásd az 57. példát).

13. ábra MY lipáz preparativ-izoelektromos fókuszálása

400 mg MY lipázt sómentesitettünk, és a szilárd anyagokat eltávolitottuk. A mintát 2 ml amfolittel (pH 2,5-5) elegyitettük, és 12 W-tal, 4 ^{o}C-on, 4 órán keresztül fókuszáltuk.

14. ábra (R,S)-HPPA, (R)-HPPA és (S)-HPPA kromatogramja

Kromatográfiás paraméterek: oszlop Resolvosil BSA-7 Macherey-Nagel; mobil fázis 5 tf % propanol 10 mM kálium-dihidrogén-foszfát pufferben (pH 5,0); adagolás 2,7 ml/perc; hőmérséklet 22 ^{o}C; ultraibolya detektálás 220 nm-en.

15. ábra Az elméleti konverzióhatár megközelitésének hatása a százalékos enantiomer feleslegre

16. ábra A HPPA hatása a HPPA-Me hidrolizisére

200 ml 0,04 M ammónium-acetátot (pH 7,0) kevertünk össze 30 ml toluollal, 40 mmol HPPA-Me-rel, 25 mg MY lipázzal és a megadott mennyiségű (R,S)--HPPA-val. A reakcióelegyből a megadottaknak megfelelően mintát vettünk, és az 1. ábrának megfelelően analizáltuk.

17. ábra A higitás hatása az enzimreakció sebességére

Megadott mennyiségű vizet, 0,04 mol HPPA-Me-t, 0,04 M ammónium-acetátot (pH 7,0), 30 ml toluolt és 25 ml vizben feloldott 25 mg MY lipázt reagáltattunk 164 órán keresztül. A vizes rétegből vett mintákat az 1. ábrának megfelelően analizáltuk.

18. ábra Kilogrammos léptékű (R)-HPPA előállitása

25 g MY lipázt, 1 l 0,2 M ammónium-acetátot (pH 6,5), 9 l vizet, 2,5 l toluolt és 1,176 kg (R,S)-HPPA-Me-t reagáltattunk 29 órán keresztül. A mintákat nagynyomású folyadékkromatográffal analizáltuk az 1. ábrának megfelelően.

Mint ahogyan az előbbiekből is kitűnik, a találmány megvalósitásakor számos módositást lehet figyelembe vennünk. Ennek megfelelően a jelen találmányt a következő szabadalmi igénypontok határozzák meg:

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás 2-szubsztituált savak — 2-halogén-propionsavakat kivéve — észterei racém keverékének savakká, nagy enantiomer felesleggel történő sztereoszelektiv hidrolizisére, azzal jellemezve, hogy az emlitett racém keveréket Candida rugosa lipázával érintkeztetjük egy szerves oldószer jelenlétében.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szerves oldószer egy aromás oldószer.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az aromás oldószer toluol.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az észter a 2-ariloxi-propionsavnak egy észtere.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az észter 2-(4-hidroxi-fenoxi)-propionsav egy észtere.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az észter a 2-(4-hidroxi-fenoxi)-propionsav metil- vagy etil- észtere.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az emlitett lipáz immobilizált állapotban van.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az emlitett lipáz immobilizált állapotban van, és az immobilizáláshoz egy poliaziridint használtunk.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett lipáz immobilizált állapotban van, és hordozóként egy ioncserélő gyantát használtunk.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az ioncserélő gyanta karboxil csoporttal szubsztituált.

11. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett lipáz egy szerves sav jelenlétében van immobilizálva.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett szerves sav szénlánca hét szénatomosnál hosszabb.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szerves sav 12-18 szénatomos.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szerves sav sztearinsav.

15. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy redukáló anyagot használunk adalékként.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a redukáló anyag nátrium-hidrogén-szulfit, nátrium-szulfit vagy egy bór-hidrid.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a redukáló anyag nátrium-szulfit.

18. A 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a Candida rugosa lipáz az MY lipáz vagy AY lipáz összetételének felel meg.

19. Eljárás egy enzim tisztitására, azzal jellemezve, hogy az tartalmazza egy enzimkeverék immobilizálását.

20. Eljárás egy Candida rugosa enzim tisztitására, azzal jellemezve, hogy az tartalmazza az abból előállitott enzimek keverékének immobilizálását.

21. Eljárás egy Candida rugosa enzim tisztitására, azzal jellemezve, hogy az tartalmazza az abból előállitott enzimek keverékének immobilizálását, és az emlitett keveréket ismételten felhasználjuk.

22. Eljárás egy Candida rugosa enzim tisztitására, azzal jellemezve, hogy az tartalmazza az abból előállitott enzimek keverékének immobilizálását, és az emlitett keveréket egy szerves oldószerben ismételten felhasználjuk.

23. A 20. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a tisztitás megnövelt aktivitást eredményez.

24. A 23. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a tisztitás megnövelt sztereoszelektivitást eredményez.

25. Eljárás a Candida rugosa lipáz enzimjeinek tisztitására és szétválasztására, azzal jellemezve, hogy az tartalmazza ioncserélő kromatográfia alkalmazását és az eredményként kapott lipáz izoenzimeknek egy megfelelő eluációs programmal

történő szétválasztását.

26. A 25. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az eluációs program egy lépcsőzetes pH program vagy egy pH gradiens program.

27. A 26. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az eluációs program egy lépcsőzetes pH program.

28. A 25. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az emlitett ioncserélő kromatográfia tartalmazza továbbá egy erős savval derivált kromatográfiás hordozó alkalmazását.

29. A 28. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kromatográfiás hordozó egy szulfo-propil funkcionál csoporttal van deriválva.

30. A 29. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kromatográfiás hordozó az N-akriloil-2-amino-2-hidroxi--1,3-propándiol szulfo-propillal derivált polimerje.

31. A 29. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kromatográfiás hordozó egy szulfo-propillal derivált keresztkötésű dextrán.

32. A 29. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kromatográfiás hordozó egy szulfo-propillal derivált keresztkötésű dextrán N,N'-metilén-bis-akril-amid polimerrel.

33. A 29. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a kromatográfiás hordozó egy szulfopropillal derivált agaróz.

34. Eljárás a Candida rugosa lipáz enzimjeinek tisztitására és szétválasztására, azzal jellemezve, hogy az tartalmazza izoelektromos fókuszálás alkalmazását.

35. Egy lipáz izoenzim, azzal jellemezve, hogy N-terminális aminosav szekvenciája a következő:
Ala-Pro-Thr-Ala-U-Leu-Ala-Asn-Gly-V-
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-
Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-W-X-Ala-Glu-
Pro-Pro-Y-Z-Asn-P,
ahol U, V, W, X, Y és Z aminosavak és P a peptid fennmaradó része.

36. A 35. igénypont szerinti lipáz izoenzim, azzal jellemezve, hogy N terminális aminosav szekvenciája a kö
Ala-Pro-Thr-Ala-Lys-Leu-Ala-Asn-Gly-V-
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-
Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-Pro-Phe-Ala-Glu-
Pro-Pro-Val-Gly-Asn-P,
ahol V egy aminosav és P a peptid fennmaradó része.

37. A 35. igénypont szerinti lipáz izoenzim, azzal jellemezve, hogy aminosav szekvenciája a következő:
Ala-Pro-Thr-Ala-Thr-Leu-Ala-Asn-Gly-Asp-
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-
Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-W-X-Ala-Glu-
Pro-Pro-Y-Z-Asn-Leu-Phe-Ile-ZZ-Leu-P,
ahol, W, X, Y, Z és ZZ aminosavak és P a peptid fennmaradó része.

38. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a lipáz egy vagy több, 35. igénypontban meghatározott izoenzimet tartalmaz.

39. A 38. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a Candida rugosa lipáz MY lipáz vagy AY lipáz.

40. Eljárás észterek hidrolizálására, észterek vagy savak átészterezésére, savak vagy alkoholok észterezésére, azzal jellemezve, hogy az emlitett észtert vagy savat vagy alkoholt a Candida rugosa egy izoenzimjével hozzuk érintkezésbe.

41. Eljárás észterek sztereoszelektiv hidrolizálására, észterek vagy alkoholok sztereoszelektiv átészterezésére, alkoholok vagy savak sztereoszelektiv észterezésére, azzal jellemezve, hogy az emlitett észtert, savat vagy alkoholt a Candida rugosa egy izoenzimjével hozzuk érintkezésbe.

42. Eljárás észterek hidrolizálására, azzal jellemezve, hogy az emlitett hidrolizist egy, a 35. igénypontban meghatározott lipáz izoenzim jelenlétében végezzük.

43. Eljárás észterek hidrolizálására, azzal jellemezve, hogy az emlitett hidrolizist egy, a 36. igénypontban meghatározott izoenzim jelenlétében végezzük.

44. Eljárás észterek hidrolizálására, azzal jellemezve, hogy az emlitett hidrolizist egy, a 37. igénypontban maghatározott lipáz izoenzim jelenlétében végezzük.

45. Eljárás észterezésre, azzal jellemezve, hogy az emlitett észterezést egy, a 35. igénypontban meghatározott lipáz izoenzim jelenlétében végezzük.

46. Eljárás észterezésre, azzal jellemezve, hogy az emlitett észterezést egy, a 36. igénypontban meghatározott lipáz izoenzim jelenlétében végezzük,

47. Eljárás észterezésre, azzal jellemezve, hogy az emlitett észterezést egy, a 37. igénypontban meghatározott lipáz izoenzim jelenlétében végezzük.

48. Eljárás átészterezésre, azzal jellemezve, hogy az emlitett átészterezést egy, a 35. igénypontban meghatározott lipáz izoenzim jelenlétében végezzük.

49. Eljárás átészterezésre, azzal jellemezve, hogy az emlitett átészterezést egy, a 36. igénypontban meghatározott lipáz izoenzim jelenlétében végezzük.

50. Eljárás átészterezésre, azzal jellemezve, hogy az emlitett átészterezést egy, a 37. igénypontban meghatározott lipáz izoenzim jelenlétében végezzük.

51. Eljárás észterek racém keverékének sztereoszelektiv hidrolizisére, azzal jellemezve, hogy az emlitett hidrolizist egy, a 35. igénypontban meghatározott lipáz izoenzim jelenlétében végezzük.

52. Eljárás észterek racém keverékének sztereoszelektiv hidrolizisére, azzal jellemezve, hogy az emlitett hidrolizist egy, a 36. igénypontban meghatározott lipáz izoenzim jelenlé-

tében végezzük.

53. Eljárás észterek racém keverékének sztereoszelektiv hidrolizisére, azzal jellemezve, hogy az emlitett hidrolizist egy, a 37. igénypontban meghatározott lipáz izoenzim jelenlétében végezzük.

54. Eljárás savak vagy észterek racém keverékének sztereoszlektiv átészterezésére, azzal jellemezve, hogy az emlitett átészterezést egy, a 35. igénypontban meghatározott lipáz izoenzim jelenlétében végezzük.

55. Eljárás savak vagy észterek racém keverékének sztereoszelektiv átészterezésére, azzal jellemezve, hogy az emlitett átészterezést egy, a 36. igénypontban meghatározott lipáz izoenzim jelenlétében végezzük.

56. Eljárás savak vagy észterek racém keverékének sztereoszelektiv átészterezésére, azzal jellemezve, hogy az emlitett átészterezést egy, a 37. igénypontban meghatározott izoenzim jelenlétében végezzük.

57. Eljárás alkoholok vagy savak racém keverékének sztereoszelektiv észterezésére, azzal jellemezve, hogy az emlitett észterezést egy,a 35. igénypontban meghatározott lipáz izoenzim jelenlétében végezzük.

58. Eljárás alkoholok vagy savak racém keverékének sztereoszelektiv észterezésére, azzal jellemezve, hogy az emlitett észterezést egy, a 36. igénypontban meghatározott lipáz izoenzim jelenlétében végezzük.

59. Eljárás alkoholok vagy savak racém keverékének sztereoszelektiv észterezésére, azzal jellemezve, hogy az említett észterezést egy, a 37. igénypotben meghatározott lipáz izoenzim jelenlétében végezzük.

60. A 49.-59. igénypontok szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az emlitett izoenzim immobilizált állapotban van.

61. A 60. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az emlitett izoenzim immobilizált állapotban van, és az immobilizáláshoz egy poliaziridint használtunk.

62. A 61. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az emlitett izoenzim immobilizált állapotban, és hordozóként egy ioncserélő gyantát használtunk.

63. A 62. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az ioncserélő gyanta karboxil csoporttal van szubsztituálva.

64. A 60. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az emlitett izoenzim egy szerves sav jelenlétében van immobilizálva.

65. A 64. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az emlitett szerves savnak hét szénatomosnál hoszabb lánca van.

66. A 64. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az emlitett szerves savnak 12-18 szénatomja van.

67. A 66. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett szerves sav sztearinsav.

68. A 60. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett izoenzim polivinil alkohol jelenlétében van immobilizálva.

69. A 60. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett izoenzim szilikagélen van immobilizálva.

70. A 60. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett izoenzim a 36. igénypont szerinti izoenzim.

71. A 60. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett izoenzim a 37. igénypont szerinti izoenzim.

72. A 42.-44. és 51.-53. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy szerves oldószer jelenlétében hajtjuk végre.

73. A 72, igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az izoenzim immobilizált állapotban van.

74. A 73. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az izoenzim a 61.-69. igénypont szerint van immobilizálva.

75. A 45.-47. és 57-59. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy szerves oldószer jelenlétében hajtjuk végre.

76. A 75. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az izoenzim immobilizált állapotban van.

77. A 76. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az izoenzim a 61-69. igénypontok bármelyike szerint van immobilizálva.

78. A 48-50. és 54-56. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy szerves oldószer jelenlétében hajtjuk végre.

79. A 78. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az izoenzim immobilizált állapotban van.

80. A 79. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az izoenzim a 61-69. igénypontok bármelyike szerint van immobilizálva.

81. Eljárás észterek racém keverékének sztereoszelektiv hidrolizálására, azzal jellemezve, hogy az a mondott racém keverék egy lipáz izoenzimmel történő érintkeztetéséből áll.

82. A 81. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a lipáz izoenzim immobilizált állapotban van.

83. A 81.igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy szerves oldószer jelenlétében hajtjuk végre.

84. A 81. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szerves oldószer toluol.

85. A 81-83. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a lipáz a 35. vagy 36. igénypont szerinti izoenzim.

86. A 85. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a lipáz a 36. igénypont szerinti izoenzim.

87. A 81-83. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az észter egy 2-ariloxi-propionsav--észter.

88. A 87. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az észter egy 2-(4-hidroxi-fenoxi)-propionsav-észter.

89. A 88. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az észterek a 2-(4-hidroxi-fenoxi)-propionsavnak metil- vagy etilészterei.

90. A 88. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy redukáló anyagot is használunk adalékként.

91. A 90. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a redukáló anyag nátrium-hidrogén-szulfit, nátrium--szulfit vagy bór-hidrid.

92. A 91. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a redukáló anyag nátrium-hidrogén-szulfát.

93. A 81. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az észterek a 2-aril-propionsavak észterei.

94. A 82. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az észterek a 2-aril-propionsavak észterei.

95. A 83. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az észterek a 2-aril-propionsavak észterei.

96. A 93-95. igénypontok : bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az izoenzim a 35., 36. vagy 37. igénypontok bármelyike szerinti izoenzim.

97. Eljárás 2-aril-propionsavak észterei racém keverékének sztereoszelektiv átészterezésére, azzal jellemezve, hogy egy lipáz izoenzimet használunk.

98. A 97. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy immobilizált enzimet használunk.

99. A 97. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az izoenzim a 35., 36. vagy 37. igénypontok bármelyike szerinti izoenzim.

100. A 97. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy szerves oldószert használunk.

101. A 95. vagy 100. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szerves oldószer egy alifás szerves oldószer.

102. A 93.-101. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az észterek a ketoprofen észterei.

103. A 93.-96. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a ketoprofen észter metil-, etil-, propil-, butil-, hexil- vagy oktil- vagy más alkil-észter.

104. A 93-101. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a ketoprofen-észterek halogén-szubsztituált észterek, úgymint 2-klór-etil-, 2,2,2-triklór-etil- vagy 2,2,2-trifluor-etil-észterek.

105. A 93-101. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a ketoprofen-észterek monoglicerid-, 2-hidroxi-etil-, dietilén-glikol- vagy trietilén-glikol-monometil- vagy más hidroxi-szubsztituált-észterek.

106. A 93-101. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az észterek az ibuprofen észterei.

107. A 93-96. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az észterek a fenoprofen észterei.

108. A 93-96. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az észterek a 2-fenil-propionsav észterei.

109. A 93-96. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az észterek az indoprofen észterei.

110. Eljárás, azzal jellemezve, hogy a racém észterek keveréke enzimmel történő hidrolizisének sztereoszelektivitását vagy sebességét zsirsav vagy zsirsav-észter hozzadásával megnöveljük.

111. A 110. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az enzim egy izoenzim.

112. A 110. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az izoenzim a 35., 36. vagy 37. igénypontok bármelyike szerinti izoenzim.

113. A 110. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az enzim egy lipáz.

114. A 113. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a lipáz a Candida rugosa egy lipáza.

115. A 93-101. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy zsirsavból vagy egy zsirsav-észterből álló adalékanyagot használunk, és a reakció sebessége vagy sztereoszelektivitása megnő.

116. A 115. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az adalékanyag az olajsav-észterek, növényi olajok, állati olajok vagy felületaktiv anyagokat tartalmazó oleátok közül lett kiválasztva.

117. A 115. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az adalékanyag olajsav.

118. A 115. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az adalékanyag linolsav-metil-észter.

119. A 115. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a racém elegy észterének alkoholrésze egy elektrofil csoportot tartalmaz.

120. A 115. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az észter alkoholrésze egy vagy több szabad hidroxilcsoportot tartalmaz.

121. A 115. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az észter alkoholrésze egy 2-klór-etil-észter.

122. A 120. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az észterek racém keveréke ketoprofen-monogliceridből, ketoprofen-2-hidroxi-etil-észterből, ketoprofen-dietilén-glikolból vagy ketoprofen-trietilén-glikol-monometil-éterből áll.

123. A 95-100. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szerves oldószer olajsav.

124. Eljárás mono-, di- vagy trigliceridek hidrolizisére, azzal jellemezve, hogy egy lipáz izoenzimet használunk akár szabad, akár immobilizált állapotban.

125. A 124. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az izoenzim a 35., 36. vagy 37. igénypontok bármelyike szerinti izoenzim.

126. A 124. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy szerves oldószer jelenlétében hajtjuk végre.

127. Eljárás mono-, di- vagy trigliciredik átészterezésére, azzal jellemezve, hogy az emlitett glicerid egy, akár szabad akár immobilizált állapotban lévő lipáz izoenzimmel történő érintkeztetéséből áll.

128. A 127. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az izoenzim a 35., 36. vagy 37. igénypontok bármelyike szerint meghatározott izoenzim.

129. A 127. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy szerves oldószer jelenlétében hajtjuk végre.

130. Eljárás mono-, di-, tri- vagy polifunkcionális alkohol egy akár szabad akár immobilizált állapotban levő lipáz izoenzimmel szerves oldószer jelenlétében vagy anélkül történő érintkeztetéséből áll.

131. A 130. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az izoenzim a 35., 36. vagy 37. igénypontok bármelyike szerint meghatározott izoenzim.

132. A 130. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy szerves oldószer jelenlétében hajtjuk végre.

A meghatalmazott

Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Irodá tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3739, Fax: 153-3664

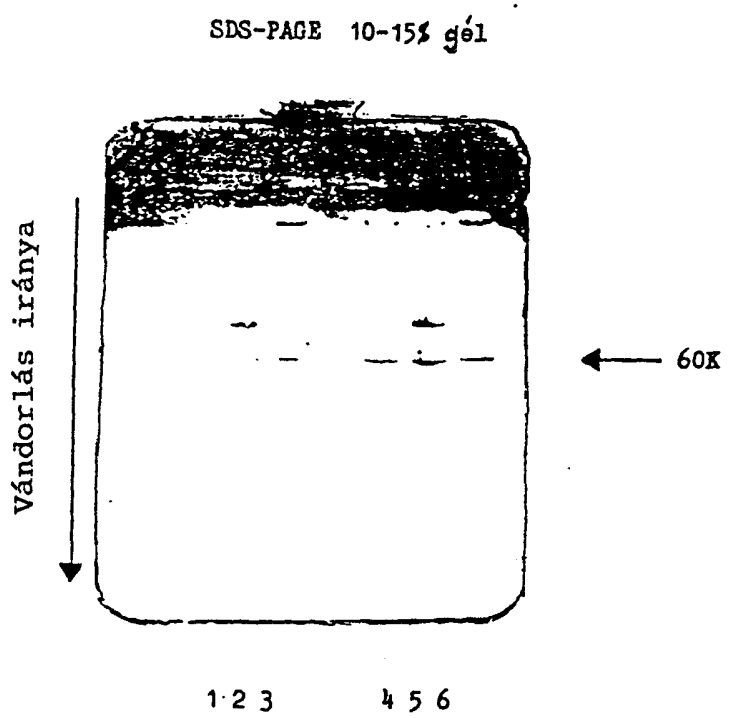
4853/00 Közzétételi példány

55.559/BE

18/1

1.ábra

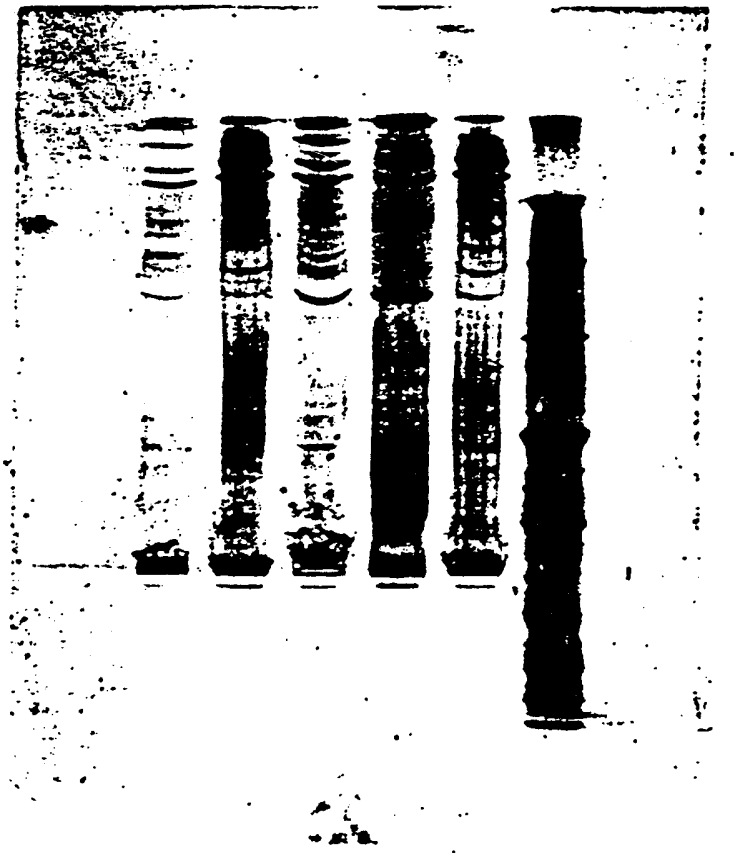
MY lipáz, AY lipáz és Biocatalyst lipáz SDS-PAGE analízise.



Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

2.ábra

Kereskedelmi C.rugosa lipázok IEF géljei; pI 3 - 9 .

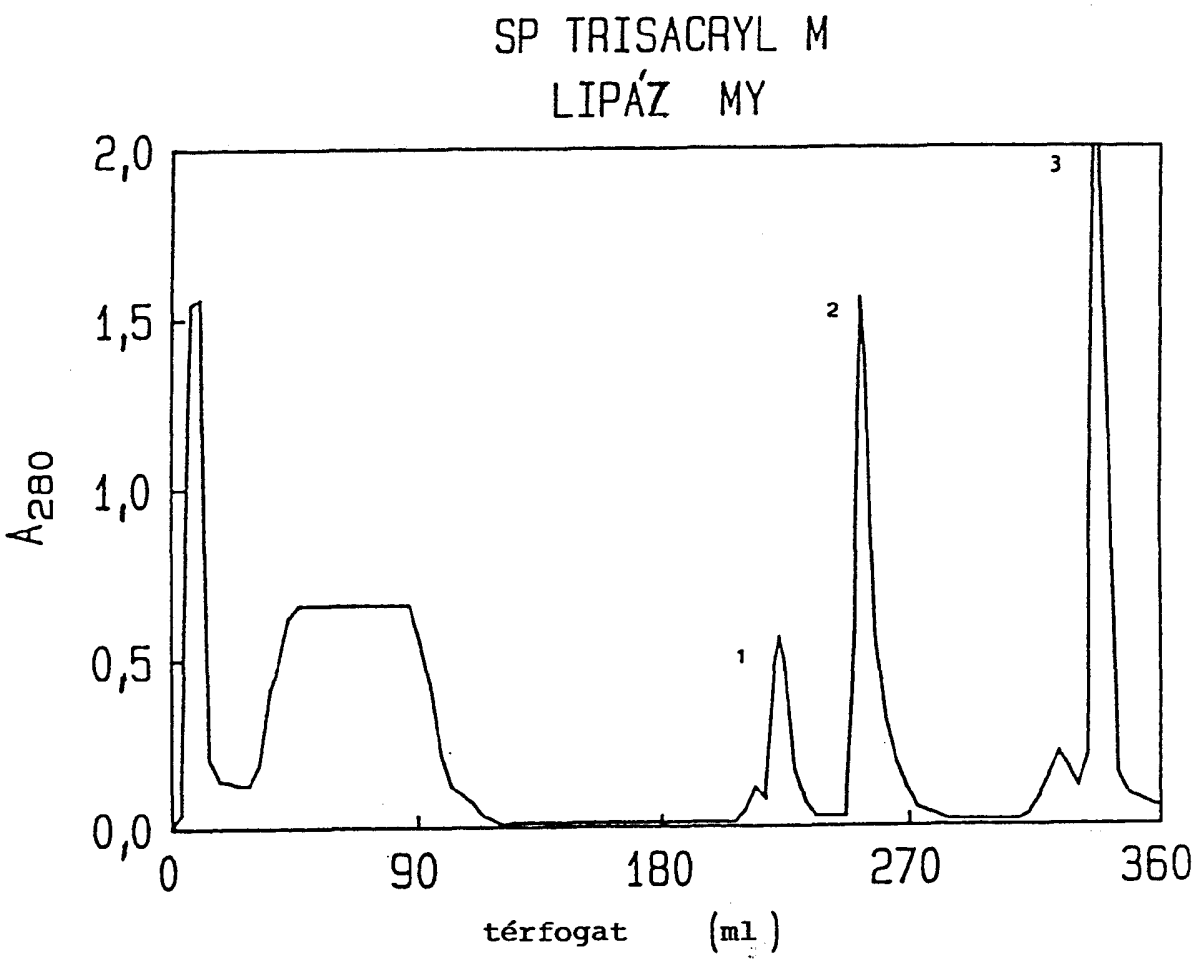


1 2 3 4 5 6

Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

3.ábra

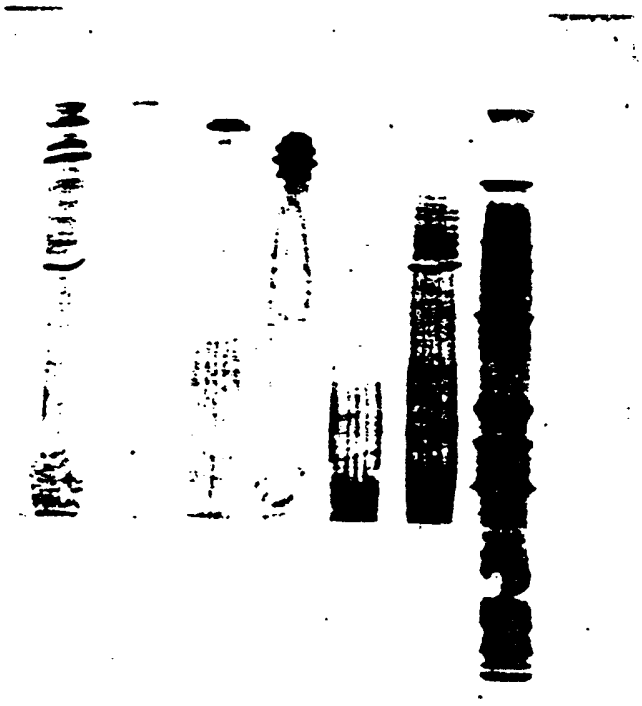
MY lipáz kromatogramja SP-TrisAcryl M-en.



Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3723, Fax: 153-3664

4.ábra

MY lipáz SP-TrisAcryl oszlopon kapott frakcióinak IEF gélje; pI 3 - 9 .

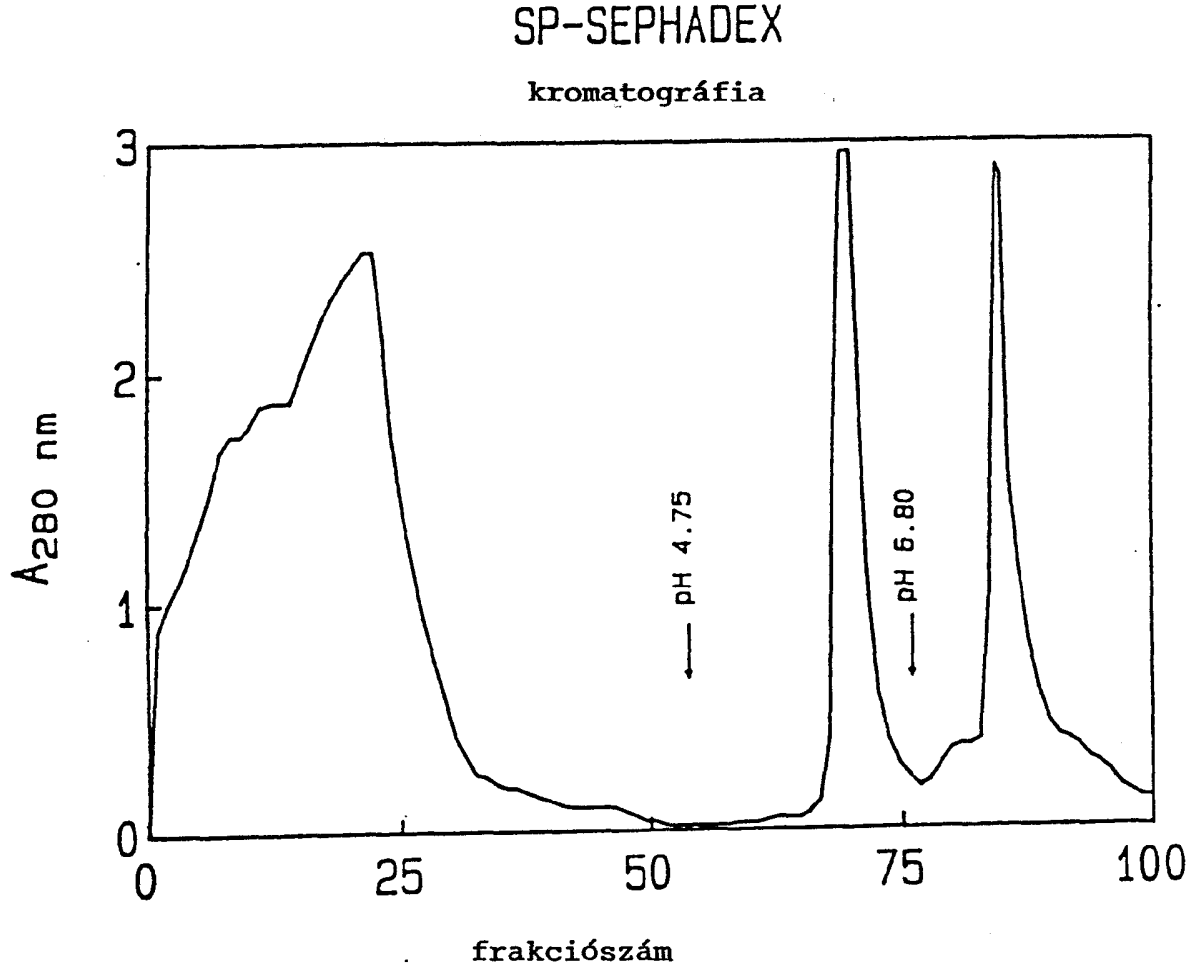


1 2 3 4 5 6 7

Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

5.ábra

MY lipáz oszlopkromatográfiája SP-Sephadex-en.



Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

6.ábra

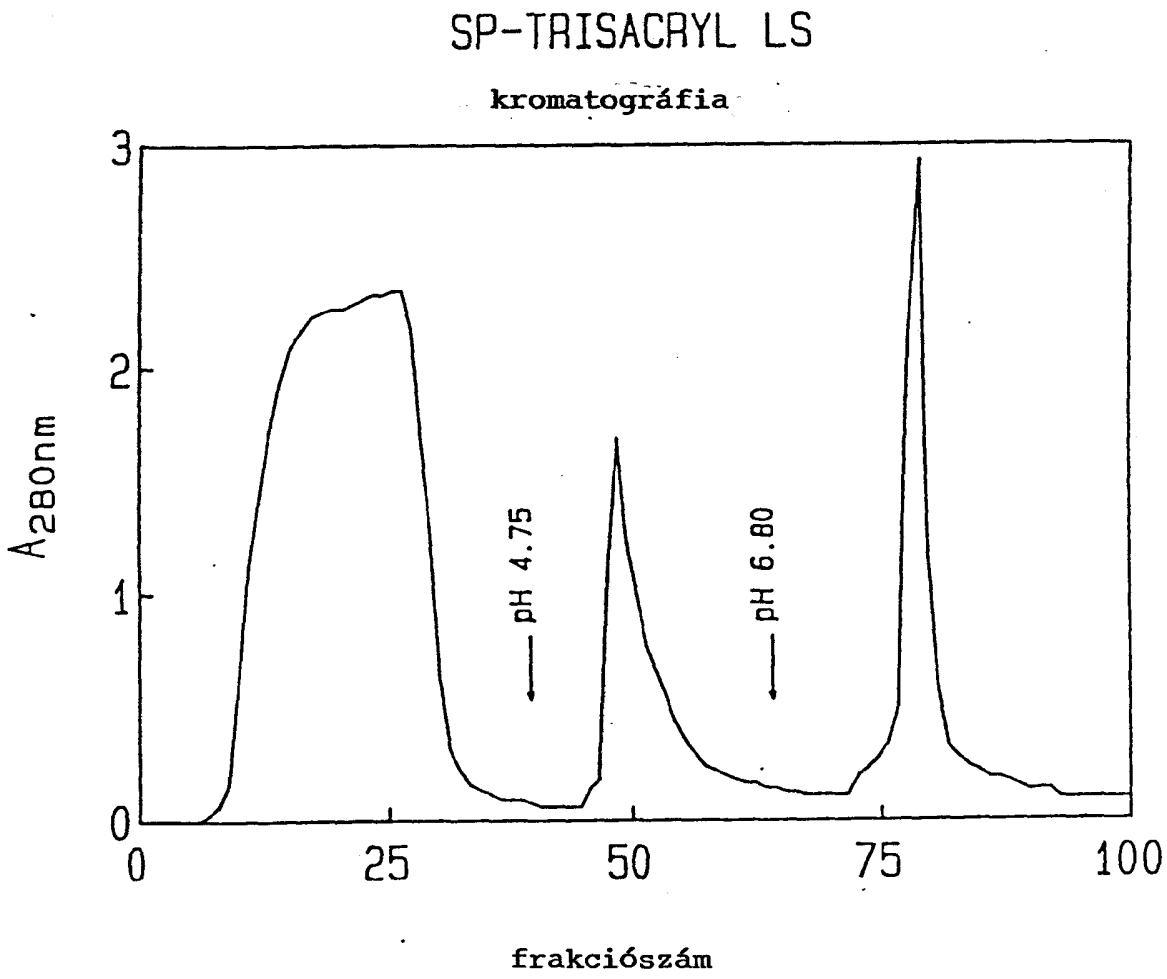
MY lipáz SP-TrisAcryl oszlopon kapott frakcióinak IEF gélje ; pI 3 - 9 .

1 2 3 4 5 6 7 8

Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

7.ábra

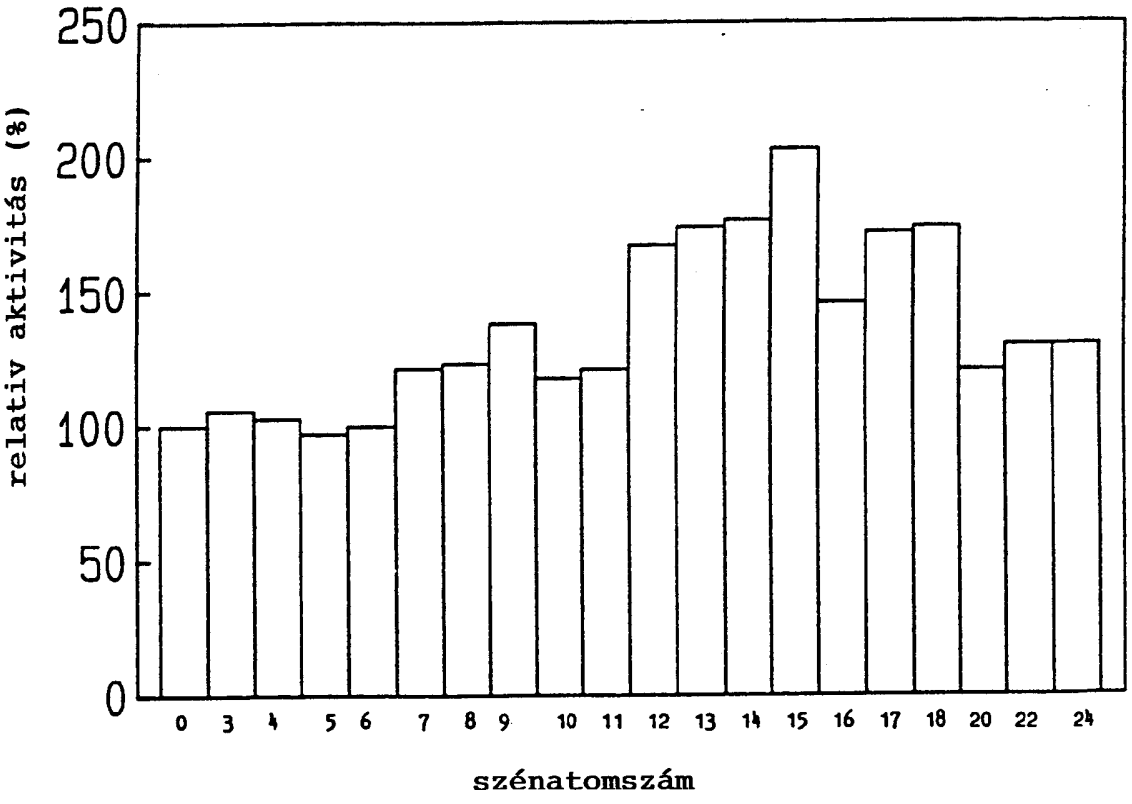
MY lipáz kromatografálása SP-TrisAcryl LS oszlopon.



Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

8.ábra

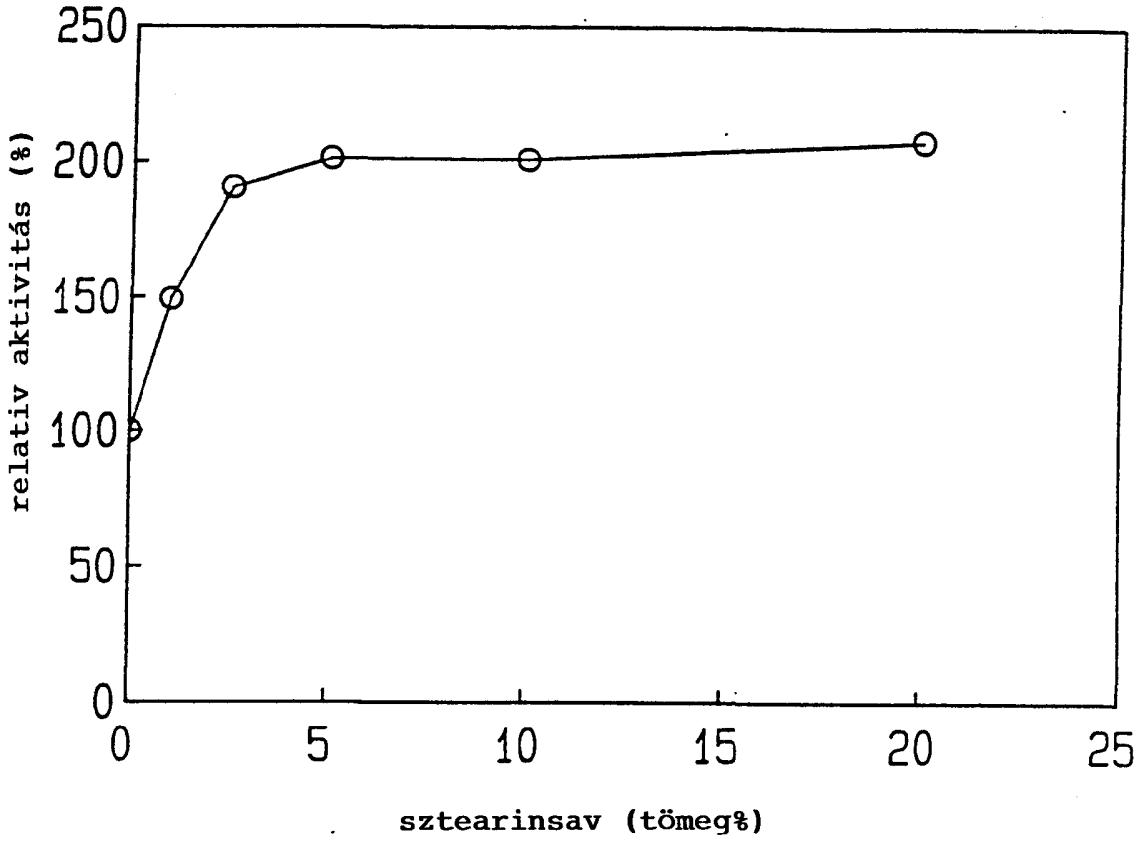
Szerves savak hatása MY lipáz immobilizálására.



Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

9.ábra

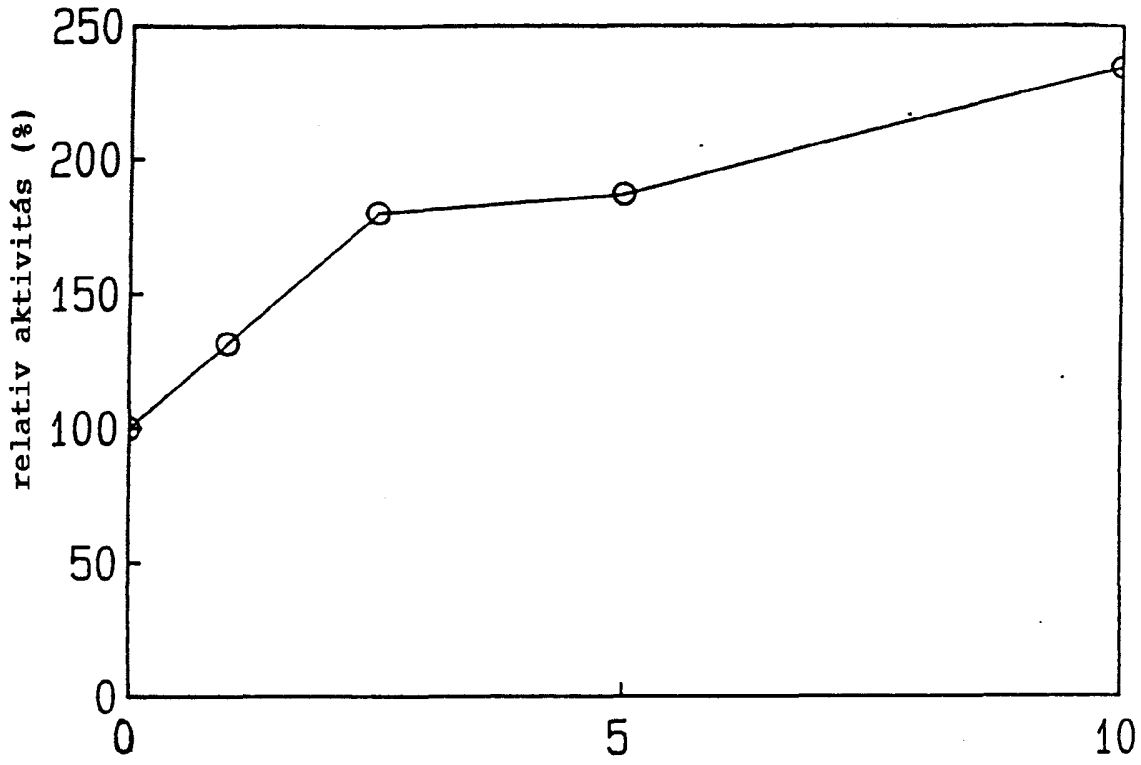
Sztearinsav (0 - 20%) hatása MY lipáz immobilizálására.



Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

10. ábra

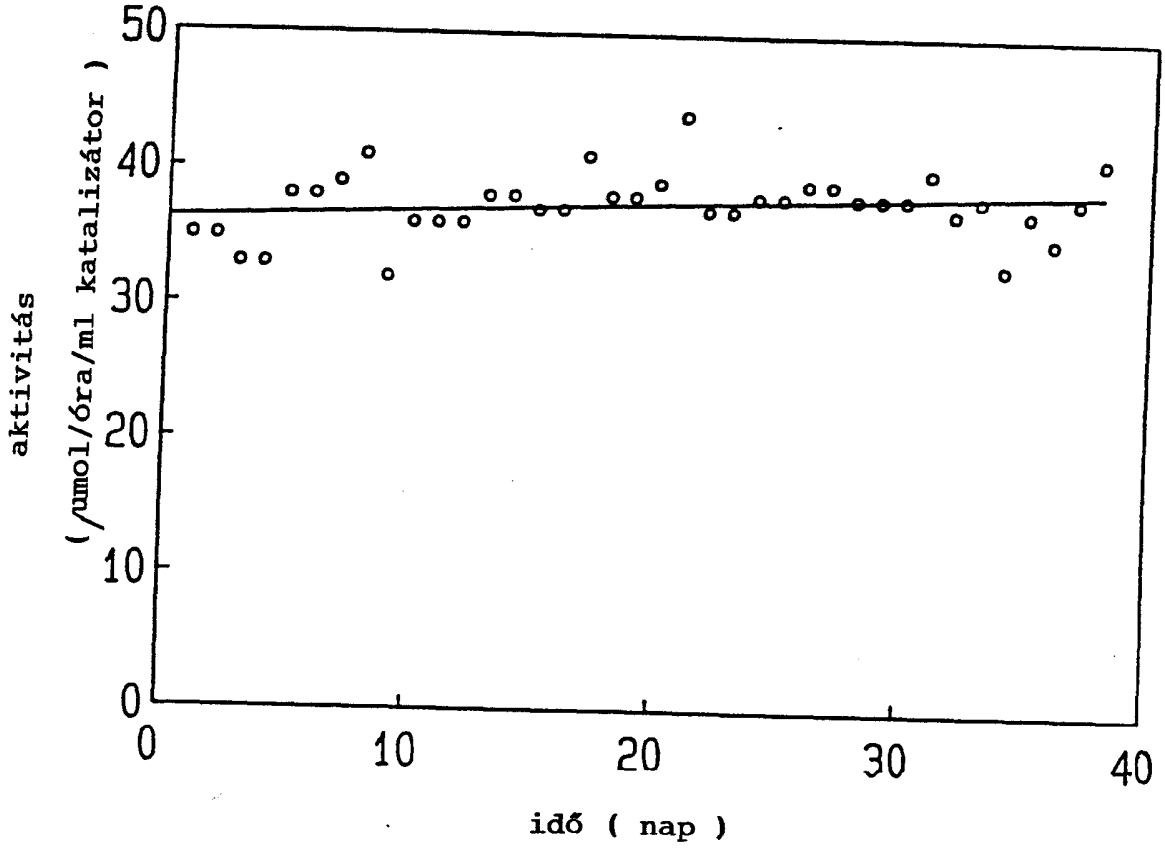
Sztearinsav (0 - 10%) hatása MY lipáz immobilizálására.



Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Fax: 153-3664

11.ábra

Immobilizált CSC-1 lipáz stabilitása.

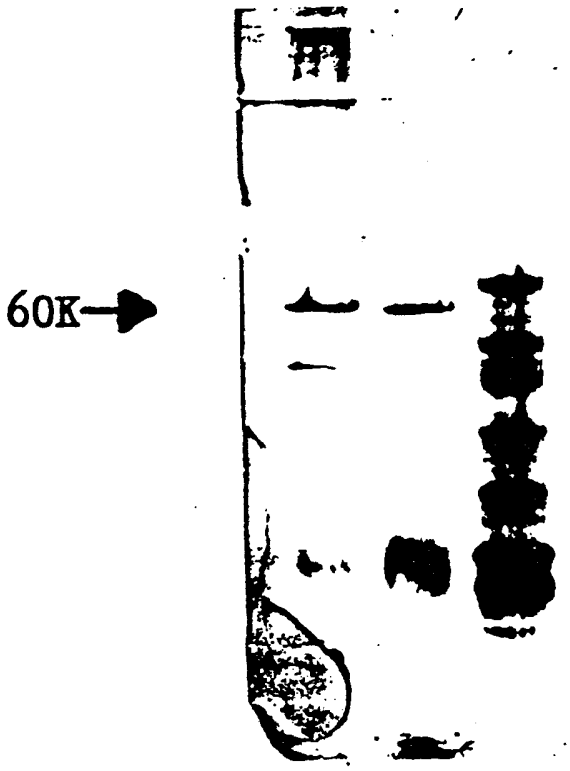


Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

12. ábra

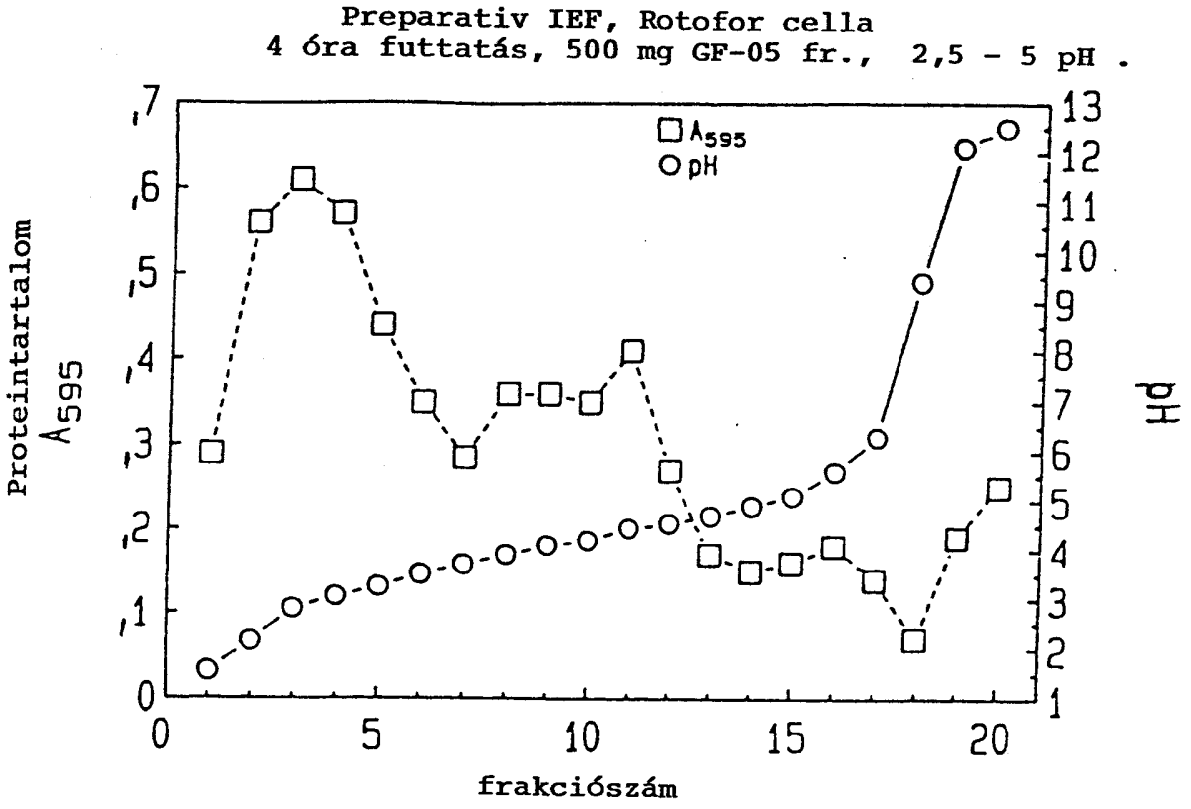
C.rugosa lipázok, CSC-2 és ENZECO Rxx SDS-PAGE analízise.

SDS-PAGE 8 - 15% gél

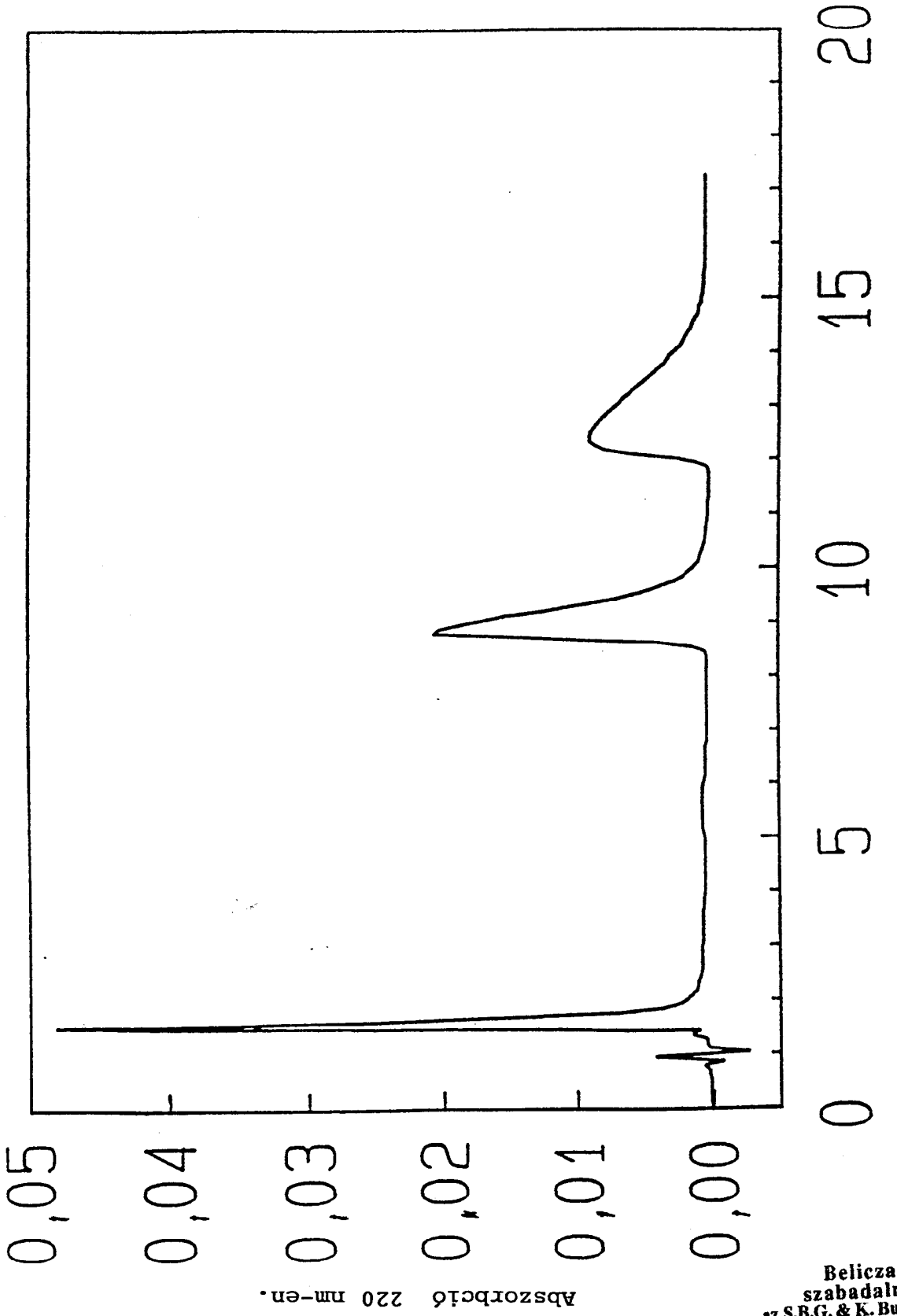


Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

13. ábra

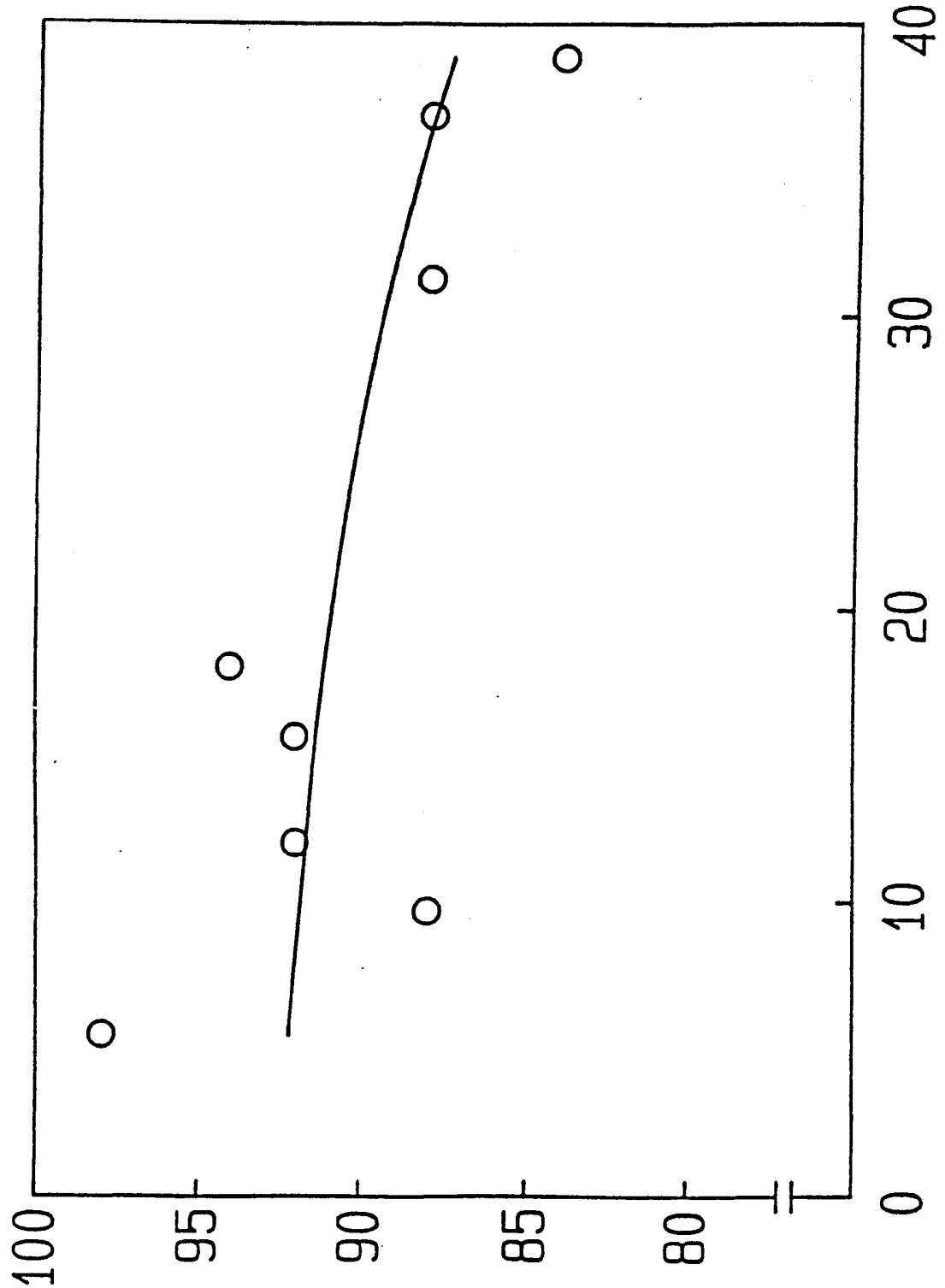


Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
Budapest, Vígszínház u. 10.
Fax: 153-3664



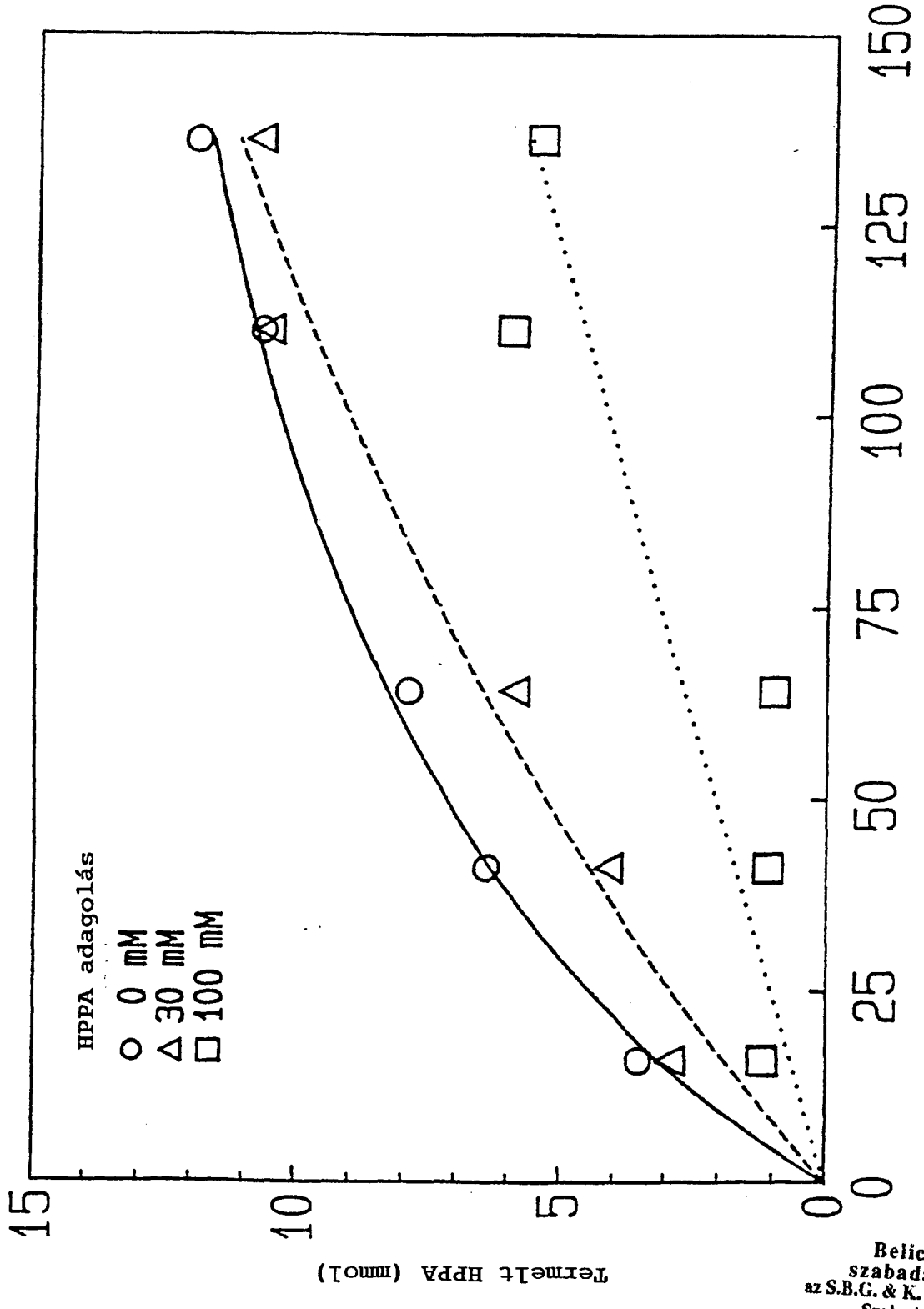
14.ábra

Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-0733, Fax: 153-3664



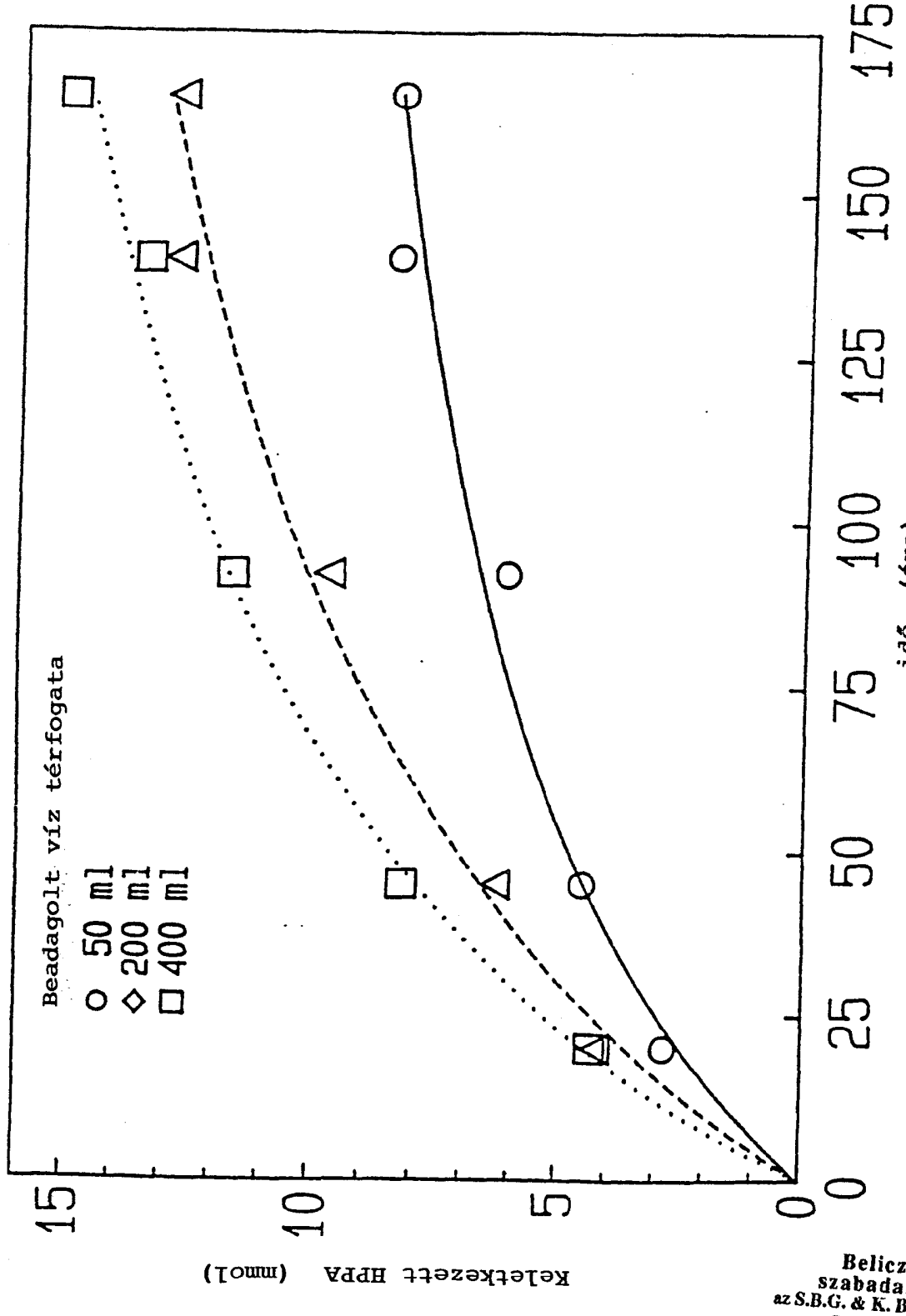
15.ábra

Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Tel.: 153-1703, Fax: 153-3664



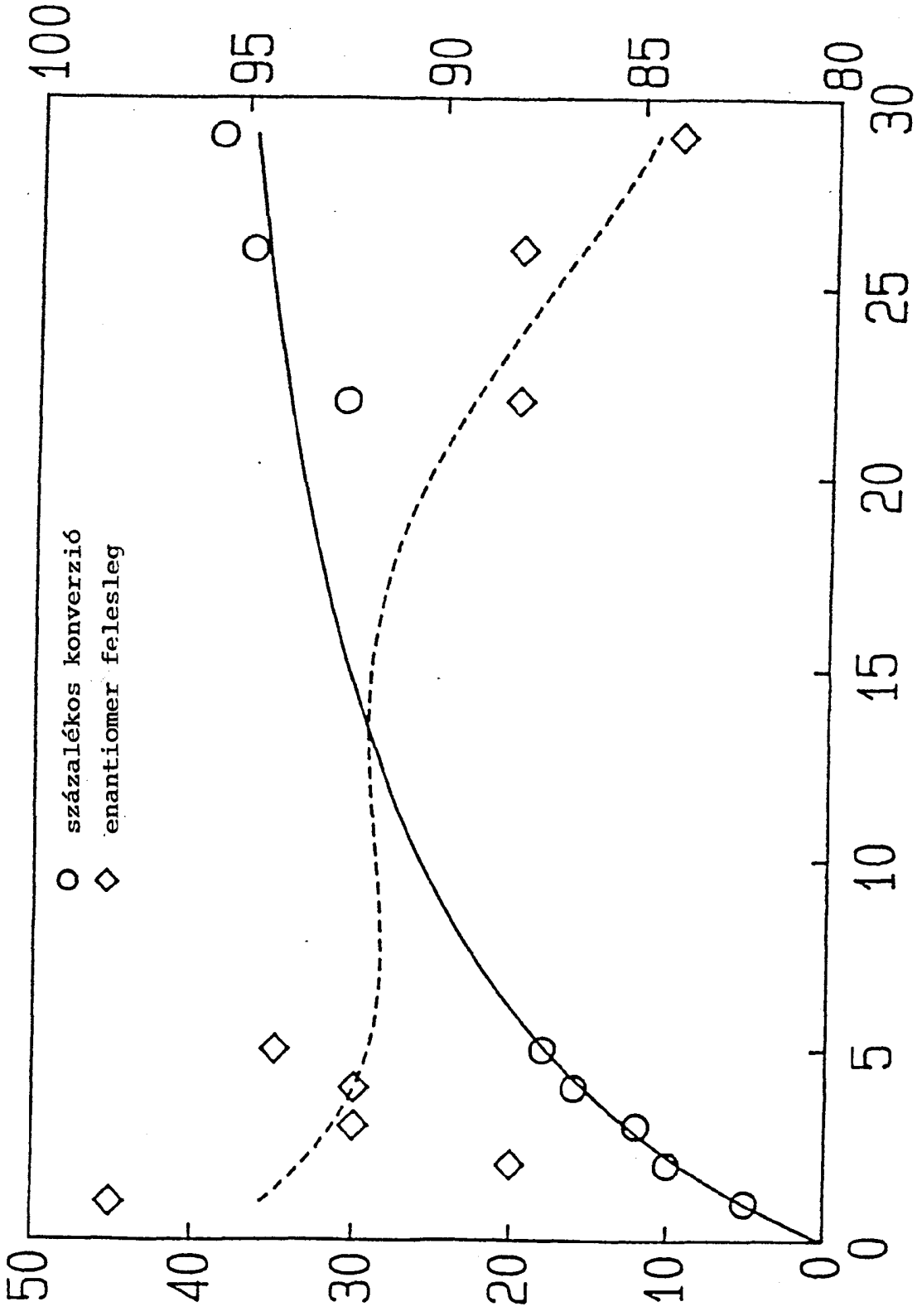
16. ábra

Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664



17.ábra

Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664



18. ábra

Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3723, Fax: 153-3664