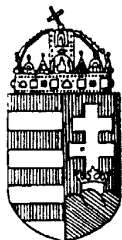


(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám

202283 B

(22) Bejelentés napja: 1987. 11. 27. (21) (5351/87)

Bejelentés elsőbbsége: (33) JP
(32) 1986. 11. 28.
(31) 285596/86

(41) (42) Közzététel napja: 1988. 11. 28.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma
a Szabadalmi Közlönyben: 1991. 02. 28.

(51)

NSZO5
C12P 7/62
C12N 9/8

(72) Feltaláló(k):
SUZUKI Takashi,
OHTA Kazuhiko Osaka
KIKUMOTO Fumio Nara, JP

(73) Szabadalmaz:
Takeda Chemical Industries, Ltd.,
Osaka, JP

(54) ELJÁRÁS KARBONSÁVÉSZTEREK ELŐÁLLÍTÁSÁRA ENZIMREAKCIÓ ÚTJÁN

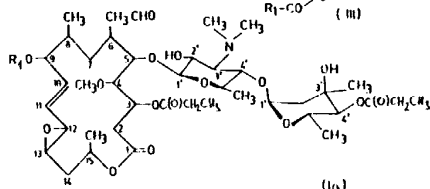
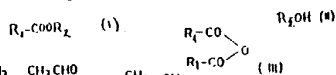
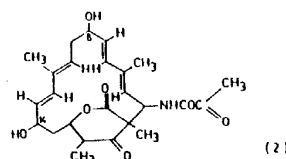
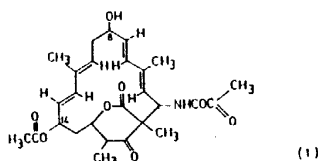
(57) KIVONAT

A találmány szerinti új eljárással (I) általános képletű karbonsavésztereket – ahol a képletben

R₁ jelentése egyenes vagy elágazó szénláncú 1–6 szénatomos alkil vagy fenilcsoport;

R₂ jelentése egyenes vagy elágazó szénláncú, adott esetben hidroxilcsoporttal szubsztituált 1–5 szénatomos alkilcsoport, vagy lankacidin C-ből a 14-helyzetű vagy maridomicinből a 9-helyezetű hidroxilcsoport elhagyásával képzett csoport – állítanak elő karboxil-észteráz katalizátor jelenlétében, oly módon, hogy egy (II) általános képletű hidroxilvegyületet – ahol R₂ jelentése a fentiekben megadott – egy (III) általános képletű karbonsavanhidriddel – ahol R₁ jelentése a fentiekben megadott – szerves oldószerben reagáltatnak.

A leírás terjedelme: 16 oldal, 1 ábra



HU 202283 B

A találmány tárgya új eljárás (I) általános képletű karbonsavészterek – ahol a képletben

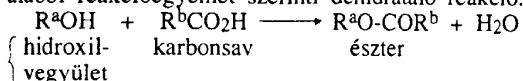
R₁ jelentése egyenes vagy elágazó szénláncú 1–6 szénatomos alkil- vagy fenilcsoport;

R₂ jelentése egyenes vagy elágazó szénláncú, adott esetben hidroxilcsoporttal szubsztituált 1–5 szénatomos alkilcsoport, vagy lankacidin C-ből a 14-helyzetű vagy maridomicinből a 9-helyzetű hidroxilcsoport elhagyásával képzett csoport –

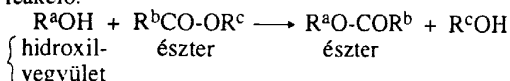
előállítására karboxil-észteráz katalizátor jelenlétében.

Karbonsavészterek előállítására eddig szintetikus szerveskéimiai eljárásokat és enzimreakciókat alkalmaztak.

A szerveskéimiai folyamatokon alapuló szintetikus reakciók például az észterezési eljárások, így az alábbi reakcióegyenlet szerinti dehidratáló reakció:



– ahol a hidroxilvegyület az acilcsoport-akceptor, és a karbonsav az acilcsoport-donor. Ilyen szerves reakció továbbá az alábbi egyenlet szerinti átészterező reakció:



– ahol a hidroxilvegyület az acilcsoport-akceptor, és az észtervegyület az acilcsoport-donor. Az ilyen típusú reakciók ismertek.

Az enzimreakció – azaz az enzimes észterező reakció – fordított hidrolízis, ahol a hidroxilvegyület és a karbonsav játssza a szubsztátum szerepét; az enzimes átészterező reakció során a hidroxilvegyület és valamilyen észtervegyület a szubsztátum. E reakciók is ismertek.

Ha azonban a hidroxilvegyület két vagy több hidroxilcsoportot tartalmaz, akkor az általánosan alkalmazott szerveskéimiai szintetikus reakciók útján egy vagy több hidroxilcsoport szelektíven és specifikusan nem alakítható át aciloxicsoporttá (aciloxicsoportokká).

Így például, ha az (I) képletű lankacidin A vegyületet, amely hatékony antibakteriális és antibiotikus hatású anyag például sertések vérhasfertőzésével szemben – lásd például a 3 676 300 és 4 480 033 számú Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásokat – a (2) képletű lankacidin C vegyületből kívánják előállítani, amely utóbbi vegyületben két hidroxilcsoport van a 8-as és 14-es helyzetben, akkor a 14-es helyzetű hidroxilcsoport szintetikus reakció útján szelektíven nem észterezhető aciloxicsoporttá.

Ennek alapján hidroxilcsoport(ok) aciloxicsoporttá (aciloxicsoportokká) szerves kéimiai szintetikus reakciókat alkalmazó eljárások útján szelektivitás szempontjából hatékonyan nem alakítható(k) át.

A szubsztátumként hidroxilvegyületet és karbonsavat vagy valamilyen karbonsavésztert alkalmazó enzimreakció lehetővé teszi hidroxilcsoport(ok) szelektív és specifikus átalakítását aciloxicsoporttá (aciloxicsoportokká) (lásd a 3 676 300 és 4 480 033 számú Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásokat).

Az ilyen enzimreakciók során azonban nagymennyiségű szubsztátum – például karbonsav vagy észtervegyület – szükséges, mivel az enzim mind az

előrehaladó, mind a megfordított reakciót katalizálja, és ez elsősorban a szubsztátumok koncentrációjától függ. Ezen túlmenően a célzott észtervegyület hozama is igen csekély.

5 Továbbá, ha az észterezést hidroxilvegyületből és karbonsavból kiindulva enzimreakcióval végzik, akkor a reakciót tökéletesen vízmentes körülmények között kell lejátszani. Ha átészterezést végeznek enzimreakcióval hidroxilvegyületből és valamilyen észtervegyületből kiindulva – aminek során az észtervegyület az acilcsoport-donor – akkor ez az észter gyakran hidrolizál a karboxil-észteráz katalizátor hatására, és ezzel egyidejűleg végbemegy a képződött észter hidrolízise is a karboxil-észteráz hatására. Ez szükségessé teszi a szubsztátumként alkalmazott észtervegyület – mint acilcsoport-donor – nagy feleslegben történő alkalmazását.

10 Ezen túlmenően hidroxilcsoport(ok) aciloxicsoporttá (aciloxicsoportokká) való teljes átalakítása nehéz, mivel az átészterező enzimreakció megfordítható folyamat.

A szerzők vizsgálták annak lehetőségét, hogy enzimreakció útján hidroxilcsoportot (hidroxilcsoportokat) miként lehet szelektíven és specifikusan, magas hozammal, kismennyiségű acilcsoport-donor alkalmazásával aciloxicsoporttá (-csoportokká) átalakítani.

Vizsgálataink eredményeként azt találtuk, hogy az enzimreakcióban a célzott észtervegyületek hozama és minősége jelentősen javítható úgy, hogy acilcsoport-donorként valamilyen karbonsavanhidridet alkalmazunk szerves oldószerben.

E megfigyelésünket további vizsgálatokkal egészítettük ki, és ennek eredményeként dolgoztuk ki a találmányunkat.

35 A jelen találmány tárgya új eljárás (I) általános képletű karbonsavészterek – ahol a képletben R₁ és R₂ jelentése a fentiekben megadott – előállítására karboxil-észteráz segítségével, amely abban áll, hogy egy (II) általános képletű hidroxilvegyületet – ahol R₂ jelentése a fentiekben megadott – egy (III) általános képletű karbonsavanhidriddel – ahol R₁ jelentése a fentiekben megadott – szerves oldószerben reagáltatunk.

45 A találmány szerinti eljárás segítségével a célzott karbonsavésztert könnyen, igen jó minőségben, magas hozammal kapjuk.

A találmány szerinti eljárás új észteráz enzimreakció, amely mindeddig nem volt ismert. A találmány szerinti eljárás alkalmazásával hidroxilcsoport(ok) szelektíven és specifikusan alakíthatók aciloxicsoporttá (-csoportokká), és az észtervegyület kismennyiségű acilcsoport-donor alkalmazásával is magas hozammal állítható elő, mivel a találmány szerinti észteráz-reakció csaknem teljesen megfordíthatatlan (irreverzibilis) folyamat. Ennek alapján a találmány szerinti eljárásnak az előnye ipari méretben történő alkalmazás szempontjából is jelentős.

60 A találmány szerinti eljárásban karboxil-észteráz-ként az „Enzyme Nomenclature, IUB, 3-1-1-1, Academic Press Inc. 1984” kézikönyvben meghatározott karboxil-észteráz alkalmazható. A találmány szerinti eljárásban alkalmazott karboxil-észteráz származhat baktériumokból (például Actinomyces-ből), mikroorganizmusokból (például Eumycetes-ből), valamint állatokból vagy növényekből.

A találmány szerinti eljárásban karboxil-észteráz-ként például alkalmazható: állati májból származó észteráz, így a sertésmáj-észteráz [forgalomba hozza a Sigma Co. USA; ez az észteráz előállítható a következő irodalmi hely szerint: *Methods in Enzymology*, 1, 657 (1955)] valamint T-2636 észteráz [lásd például: *The Journal of Antibiotics* 24, 1 (1971)], amely *Streptomyces rochei* var. *volubilis* mikroorganizmusból származik.

A karboxil-észteráz természetes (natív) vagy tisztított formában alkalmazhatjuk. A találmány szerinti eljárásban bármilyen mértékben tisztított karboxil-észteráz felhasználható: alkalmazhatunk például olyan nyers enzimszisztemeket, amelyeket fehérjék táptalajból való extrakciójával állítunk elő, vagy használhatunk tisztított, egyetlen fehérjét tartalmazó készítményeket is.

Ezenfelül a reakció sima előrehaladásának a biztosítása céljából szerves oldószerben oldható, kémiaiilag módosított karboxil-észteráz is felhasználhatunk a találmány szerinti eljárás megvalósítása során.

A karboxil-észteráz enzim kémiai módosításának vonatkozásában megemlítjük például a 2,4-bisz(O-metoxi-polietilén-glikol)-6-klór-s-triazint (ezt a továbbiakban röviden aktivált PEG₂-vel jelöljük), amely enzimfehérjékkel érintkezésbe hozva módosított fehérjékhez vezet, amelyek a polietilén-glikolhoz kapcsolódnak [lásd: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 122, 845 (1984)].

A találmány szerinti eljárásban mind szerves oldószerben oldható, mind szerves oldószerben oldhatatlan karboxil-észteráz alkalmazhatunk. Előnyös azonban a szerves oldószerben oldható karboxil-észteráz használata.

A karboxil-észteráz általában vizes oldószerrel készült oldatában alkalmazhatjuk. (Vizes oldószerként például valamilyen pufferoldat, így trisz(hidroximetil)-amino-metánt és maleinsavat tartalmazó pufferoldat használható).

A szerves oldószerben oldható karboxil-észteráz valamilyen szerves oldószerrel készült, kismennyiségű vizet tartalmazó oldata alakjában alkalmazhatjuk.

A karboxil-észteráz továbbá karboxil-észteráz-enzimet termelő mikroorganizmus kultúraszűrletének az alakjában is alkalmazhatjuk.

Továbbá, a karboxil-észteráz immobilizált enzim alakjában is használhatjuk. Ebben az esetben kívánatos a reakciót olyan körülmények között végezni, hogy vizes fázis csaknem egyáltalán ne alakuljon ki. A reakciót végezhetjük például úgy, hogy a szerves oldószerben oldható karboxil-észteráz oszlopon immobilizált enzim formájában alkalmazzuk, és az eluálást a hidroxilvegyületet és a karbonsavanhidridet tartalmazó szerves oldószerrel végezzük.

A találmány szerinti eljárásban (III) általános képletű karbonsavanhidrideket alkalmazhatunk, előnyösen ecetsavanhidridet, propionsavanhidridet, n-vajsavanhidridet, izovajsavanhidridet, n-pentánsavanhidridet, n-kaprónsavanhidridet és benzoészavanhidridet.

A (III) általános képletű vegyületekben R₁ jelentése metil-, etil-, n-propil-, izopropil-, n-butil-, terc.-butil-, n-pentil-, n-hexil-, vagy fenilcsoport.

A találmány szerinti eljárásban (II) általános képletű hidroxilvegyületként például a következő hidroxilvegyületek használhatóak: alkoholok, például egyér-

tékű alkoholok, így a metanol, etanol, n-propanol, izopropanol és n-butanol; kétértékű alkoholok, így az etilén-glikol, 1,4-butándiol; vagy többértékű alkoholok, például a glicerín; valamint lankacidin C.

5 Előnyösen 2-4 szénatomos alkoholokat, lankacidin C-t vagy maridomicint alkalmazunk hidroxilvegyületként.

A (II) általános képletű vegyületben R₂ jelentése előnyösen: metil-, etil-, n-propil-, izopropil-, n-butil-, terc-butil- vagy n-pentilcsoport.

10 A fentiekben említett alkilcsoportok szubsztituálva lehetnek például: hidroxilcsoporttal, mint pl. 2-hidroxietil-csoport.

15 Ha hidroxilvegyületként lankacidin C-t alkalmazunk, akkor célszerű a lankacidin C szerves oldószerrel készült oldatát, valamint valamilyen kultúratáptalaj szűrletét alkalmazni, amint ezt alább az 5. példában leírjuk.

20 A karbonsavanhidridet körülbelül 1-100 mólegyenérték, előnyösen 2-20 mólegyenérték mennyiségben alkalmazzuk a hidroxilvegyületre számítva.

A találmány szerinti eljárásban szerves oldószerként olyan oldószert alkalmazhatunk, amelynek pH-értéke körülbelül 3-10, és amely az adott reakció-körülmények között a karboxil-észteráz aktivitását nem csökkenti.

A találmány szerinti eljárásban szerves oldószerként alkalmazhatók például: nyílt szénláncú szénhidrogének, így n-hexán, n-heptán, n-pentán, izohexán, diklór-metán, kloroform, szén-tetraklorid, etilén-diklorid, etilidén-diklorid, vinilidén-diklorid, butil-klorid, amil-klorid, allil-klorid, etil-bromid-dibrom-etán, klór-etil-bromid és fluor-triklór-metán; gyűrűs szénhidrogének, például ciklohexán, metil-ciklohexán, dekalin, benzol, toluol, xilol, etil-benzol, 1,2,3,4-tetrahidronaftalin (tetralin), klór-benzol, o-diklór-benzol, bróm-benzol, o-klór-toluol és alfa-klór-naftalin; éterek, így a dietil-éter, di(klór-etil)-éter vagy etilén-glikol-mono-

35 metil-éter; acetálok, például a metilál vagy az acetaldhid-dietil-acetál; heterociklusos vegyületek, például a furán, furfurool, 2-metil-furán, tetrahidropirán, 1,2-propilén-oxid, epiklóridrin, 1,4-dioxán, piridin, morfolin; ketonok, például metil-etil-ke-ton, metil-n-propil-ke-ton, metil-n-butil-ke-ton, metil-izobutyl-ke-ton, metil-n-amil-ke-ton, dietil-ke-ton, etil-n-butyl-ke-ton, diacetone-alkohol, mezitil-oxid, ciklohexanon, metil-ciklohexanon, acetofenon és acetoneil-aceton; észterek, így a metil-formiát, etil-formiát, metil-acetát, etil-acetát, metil-propionát, metil-butirát, etil-aceto-acetát, metil-benzoát, metil-szalicilát, etil-abietát, dietil-oxalát, dietil-malonát, dietil-ftalát, és dioktil-adipát; foszfátok, például a trietil-foszfát; karbonátok, így a dietil-karbonát; aminok például a trimetil-amin; savamidok, így a formamid, N,N-dimetil-formamid; nitrilek, például az acetoneitril; kéntartalmú vegyületek, például a szén-diszulfid és a dimetil-szulfoxid; valamint a petróleum desztillációjából származó termékek, például a petroléter, benzín, és ligroin.

60 Előnyösen olyan szerves oldószert alkalmazunk, amely vízzel két fázist alkot.

Ezek közül előnyösen a ketonokat és észtereket alkalmazzuk. Különösen előnyös a metil-etil-ke-ton, metil-n-propil-ke-ton, metil-n-butyl-ke-ton, metil-izobutyl-ke-ton, metil-acetát és az etil-acetát használata.

A fentiekben leírt karbonsavanhidridek vagy hidroxilvegyületek a találmány szerinti eljárás megvalósítása során szerves oldószerként is szerepelhetnek.

A találmány szerinti reakciót előnyösen úgy hajthatjuk végre, hogy a karboxil-észterázt hozzáadjuk a karbonsavanhidridet és a hidroxilvegyületet tartalmazó szerves oldószeres keverékhez, és az így kapott keveréket alapos további keverésnek vetjük alá.

Ha a reakcióban nagy mennyiségű víz van jelen, azaz ha szerves oldószerben oldhatatlan karboxil-észteráz enzimet alkalmazunk, akkor a reakciót előnyösen egyfázisú rendszerben, erélyes keverés közben végzhetjük mindaddig, amíg víz/olaj emulzió képződik.

Ha a reakcióban kis mennyiségű víz van jelen, azaz ha szerves oldószerben oldható karboxil-észteráz enzimet alkalmazunk, akkor a reakciót erélyes keverés közben hajtjuk végre mindaddig, amíg homogén oldat képződik.

A reakció hőmérsékletét és pH-értékét a tenyészetekből származó, különböző típusú enzimek, a szubsztrátumok és oldószeres szerint kell változtatnunk; általában kívánatos a reakciót körülbelül 5 °C és körülbelül 90 °C közötti hőmérsékleten, előnyösen körülbelül 20–70 °C hőmérsékleten, körülbelül 2–10 pH-érték mellett, előnyösen körülbelül 3–9 pH-értéken lejártni.

Az így kapott észtervegyületet a szokásos eljárásokkal – például szűréssel, desztillációval, betöményítéssel, csökkentett nyomáson való betöményítéssel, kromatográfiával – például szilikagélen vagy alumínium-oxidon végzett kromatográfiával – kristályosítással vagy átkristályosítással különíthetjük el és tisztíthatjuk.

A találmány szerinti eljárást az alábbi nem-korlátozó jellegű példákban és referencia-példákban részletesen ismertetjük. Ezekben a példákban az összes százalék-értékek tömeg/térfogat-százalékot jelentenek, ha erre vonatkozóan más megjegyzést nem teszünk.

1. referencia-példa

Enzim előállítás

500 ml táptalajt, amely 3,0% glükózt, 1,0% Proflo-t (Traders Oil Mill Co., USA cég gyártmánya), 3,5% kukoricalevet, 0,02% magnézium-szulfátot, 0,1% dikálium-hidrogén-foszfátot, 0,05% szójababolajat és 0,5% kalcium-karbonátot tartalmaz, 20%-os vizes nátronlúgoldattal 7,0 pH-értékre állítunk.

A táptalajt 2 literes Sakaguchi-lombikba helyezzük, és vattával ledugaszolva sterilizáljuk majd *Streptomyces rochei* var. *volubilis* (IFO 12507) (ATCC-21250) ferdeagaros tenyésztéssel oltjuk (lásd a 183695/1984 számú japán közrebocsátási iratot), majd rázógépen (83 rázás percenként) 28 °C hőmérsékleten 24 órán át inkubáljuk.

A fentiekkel azonos összetételű 30 liter táptalajt 50 literes fermentorba helyezünk, és sterilizálunk. 500 ml fentiekben leírt táptalajt oltunk a fenti tenyésztőközegbe, és 24 °C hőmérsékleten 24 órán át inkubáljuk, miközben 1 VVM sebességgel levegőztetjük (a „VVM” jelenti a közeg térfogatán percenként áthaladó levegő térfogatát), és percenként 150 fordulat sebességgel keverjük.

Ezt alkalmazzuk oltótenyészetként. 200 literes fermentorba 100 ml táptalajt helyezünk, amely 10% glicerint, 2,0% Proflo-t (Traders Oil-Mill. Co. USA),

0,5% kukoricalevet, 1,0% Poliepton-t (Daigo Nutritive Chemicals Ltd., Japán), 0,1% vas(II)-szulfátot, 0,01% szójababolajat és 2,0% béta-ciklodextrint tartalmaz, majd hozzáadunk annyi 20%-os vizes nátronlúgoldatot, hogy a táptalaj pH-értéke 7,0 legyen, és utána gőzzel 120 °C-on 20 percig sterilizáljuk.

Ehhez a táptalajhoz 5 liter fentiekben leírt oltótenyészetet adunk, és az elegyet 24 °C hőmérsékleten 96 órán át inkubáljuk, miközben 1 VVM sebességgel levegőztetjük, és percenként 165 fordulatszámmal keverjük. 60 liter így kapott táptalajhoz 20 liter vizet és 2 kg Hyflo-Supercel-t (Johns Manville Products Co. készítménye, USA) adunk, és az elegyet szűrjük. Így 70 liter szűrletet kapunk.

60 literes edénybe 10 liter szűrletet helyezünk, 40 liter etanolt adunk hozzá, és alaposan átkeverjük egy keverőbottal. Ezután az elegyet 5 °C hőmérsékleten 12 órán át állni hagyjuk a fehérjék kicsapása céljából. A felülúszó folyadékot szifon segítségével eltávolítjuk, és így zavaros-fehér csapadékot kapunk.

A csapadékot 2000 x g sebességgel centrifugáljuk, miközben a hőmérsékletet 5 °C-on tartjuk, s így a csapadék víztartalmát a lehető legkisebb értékre csökkentjük. Az így kapott terméket etanollal mossuk, majd ugyanolyan módon centrifugáljuk, mint fentebb leírtuk. A csapadékokat összegyűjtjük, és 6,6 kPa vákuumban 10 °C hőmérsékleten 24 órán át szárítjuk. Így 200 g porszerű terméket kapunk. 500 ml 0,05 M trisz(hidroxi-metil)-amino-metán-sósav pufferoldatban (pH 7,4) 2000 x g sebességgel végzett centrifugálással 5 °C hőmérsékleten kapjuk a fehérjét tartalmazó oldatot.

Az így kapott oldathoz 2 liter etanolt adunk, és alaposan átkeverjük, hogy a fehérjék ismét kicsapódjanak, majd a keveréket 5 °C-on 24 óráig állni hagyjuk, és a felülúszó folyadékot szifonnal eltávolítjuk. A csapadékot 5 °C-on 2000 x g sebességgel centrifugáljuk a felülúszó folyadék teljes eltávolítása végett, utána etanollal mossuk, és a fentiekben leírt módon centrifugáljuk a csapadék összegyűjtése céljából. A csapadékot 6,6 kPa vákuumban 10 °C hőmérsékleten 24 órán át szárítjuk, és így körülbelül 100 g porszerű fehérjeterméket kapunk.

A port 300 ml 0,05 M trisz(hidroxi-metil)-amino-metán-sósav pufferoldatban (pH 7,4) oldjuk, és az oldhatatlan részt 50 °C hőmérsékleten 2000 x g sebességgel végzett centrifugálással eltávolítjuk.

Az így kapott oldatot gélészűrésnek vetjük alá, amihez 1500 mm hosszúságú, 200 mm átmérőjű oszlopot alkalmazunk, amely 0,05 M trisz(hidroxi-metil)-amino-metán-sósav pufferoldattal (pH 7,4) egyensúlyozott Sephadex G-50-t tartalmaz. Az oszlopot ugyanezzel a pufferoldattal, 20 ml/5 perc áramlási sebességgel eluáljuk.

A karboxil-észteráz p-nitro-fenil-ecetsav alkalmazásával megállapított aktivitásának az alapján [lásd: Journal of Biological Chemistry 170, 467 (1947)] 400 ml térfogatú, karboxil-észteráz-aktivitást mutató frakciókat gyűjtünk, amelyekhez 2,4 liter etanolt adunk, majd az így kapott elegyet mechanikusan keverjük egy 3 literes Erlenmeyer lombikban a fehérjék kicsapása végett. Ezután az elegyet 5 °C-on 24 órán át állni hagyjuk, a csapadékot 5 °C-on 2000 x g sebességgel végzett centrifugálással összegyűjtjük, 6,6 kPa vákuumban 10 °C hőmérsékleten 24 órán

át szárítjuk, és így 40 g porszerű fehérjeterméket kapunk.

Eport 100 ml 0,05 M trisz(hidroxi-metil)-amino-metán-sósav pufferoldatban (pH 7,4) oldjuk, és az oldatot gél-sűrítésnek vetjük alá, amihez 1500 mm hosszúságú, 100 mm átmérőjű oszlopot alkalmazunk, amelyet Sephadex G-100-zal töltünk, és az eluálást azonos összetételű pufferoldattal végezzük mint fentebb, 10 ml/5 perc áramlási sebességgel.

A karboxil-észteráz-aktivitást mutató frakciókat összegyűjtjük, és lineáris gradiens szerinti ioncserélő kromatográfiának vetjük alá, amelyhez növekvő só-koncentrációt használunk. Az alkalmazott oszlop hosszúsága 400 mm, átmérője 50 mm, töltete DEAE Sephadex A-50. Az eluálást 2 liter 0,05 M trisz(hidroxi-metil)-amino-metán-sósav pufferoldattal végezzük (pH 7,4), amely 1 mólos koncentrációban tartalmaz nátrium-kloridot az 1. edényben; majd 2 liter 0,05 M trisz(hidroxi-metil)-amino-metán-sósav pufferoldattal folytatjuk (pH 7,4) a 2. edényben.

Az eluátum minden 10 ml térfogatát Toyo 5F-160K típusú frakció- kollektor segítségével frakcionáljuk, és így 300 ml karboxil- észteráz-aktivitást mutató frakciót gyűjtünk össze. Ehhez 200 g kristályos ammónium-szulfátot adunk 1 literes Erlenmeyer lombikba keverés közben, kisózás céljából.

Az így kapott termékeket 5 °C hőmérsékleten 24 órán át állni hagyjuk a fehérjék teljes kicsapódása céljából, majd a csapadékot 5 °C hőmérsékleten 2000 x g sebességű centrifugálással összegyűjtjük. Az így kapott csapadékot 50 ml 0,05 M trisz(hidroxi-metil)-amino-metán-sósav pufferoldattal (pH 7,4) oldjuk, és az oldatot a fentebb leírt módon Sephadex G-100 alkalmazásával gél-sűrítésnek vetjük alá.

A karboxil-észteráz-aktivitást mutató frakciókat összegyűjtjük, és lineáris gradiens szerinti ioncserélő kromatográfiának vetjük alá a fentiekben leírt módon, DEAE Sephadex A-50 alkalmazásával. Így 250 ml karboxil-észteráz-aktivitással rendelkező frakciót gyűjtünk össze, amelyhez keverés közben 167 g ammónium-szulfátot adunk kisózás céljából.

A keveréket 5 °C-on 24 óráig állni hagyjuk, majd a csapadékot a fentebb leírt módon centrifugálással elkülönítjük. A csapadékot 30 ml 0,05 M trisz(hidroxi-metil)-amino-metán-sósav pufferoldatban (pH 7,4) oldjuk, és a fentiekben leírt módon, Sephadex G-100 alkalmazásával gél-sűrítésnek vetjük alá. Az így kapott karboxil-észteráz-aktivitással rendelkező frakciókat 100 mm hosszúságú, 10 mm átmérőjű oszlopon kromatografáljuk, amely 0,05 M trisz(hidroxi-metil)-amino-metán-sósav pufferoldattal (pH 7,4) egyensúlyozott DEAE Sephadex A-50 töltetet tartalmaz. Az eluálást 100 ml fentiekben leírt pufferoldattal, majd 20 ml azonos, azonban 1 mól koncentrációban nátrium-kloridot tartalmazó pufferoldattal végezzük.

A karboxil-észteráz-aktivitást mutató frakciókat összegyűjtjük, cellofánból készült csőbe fecskendezük dialízis céljából, és 2 liter víz alá helyezzük egy 3 literes Erlenmeyer lombikban. A dialízist 24 órán át folytatjuk, miközben a külső vizet mágneses keverővel keverjük. A dialízis befejezése után az oldatot 2 literes, padlizsánalakú lombikba vesszük, és 2,7 kPa vákuumban 24 órán át liofilizáljuk (ehhez No. 10-146, MR-BA típusú eszközt alkalmazunk, a Virtis Co. Inc., USA gyártmánya), és így poralakú

karboxil-észterázhoz jutunk [lásd: „Enzyme Nomenclature Section 3.1.1.1, Academic Press Inc. (1984)], amely *Streptomyces rochei* var. *volubilis* mikroorganizmusból származik, SDS gél- elektroforézissel és ultracentrifugás elemzéssel igazoltuk, hogy az így kapott karboxil-észteráz egyetlen fehérje. Az alábbiakban – egyes esetekben – az így kapott karboxil-észterázt röviden karboxil-észteráz készítménynek nevezzük.

2. referencia-példa

Kémiai módosított enzim előállítása

8 ml 0,1 M nátrium-borát pufferoldatban (pH 9,5) 50 mg karboxil-észteráz készítményt oldunk, és 1,0 g 2,4-bisz(O-metoxi- polietilén-glikol)-6-klór-s-triazint adunk hozzá (a polietilén-glikol molekulatömege 6000), majd az elegyet 5 °C hőmérsékleten 1 órán át keverjük. Ekkor a reakció leállítása céljából a reakcióelegyhez 72 ml 0,2 M kálium-foszfát pufferoldatot (pH 7,0) adunk.

Ezután a reakcióelegyet ultrasűrítésnek vetjük alá (8050 típusú ultrasűrítő, az Amicon Division of Grace Corp. USA cég gyártmánya) YM-10 millipor-sűrítő alkalmazásával, majd 400 ml 0,2 M kálium-foszfát pufferoldattal (pH 7,0) mossuk az elreagálatlan 2,4-bisz(O-metoxi-polietilén-glikol)-6-klór-s-triazin eltávolítása céljából.

Ezután a polietilén-glikollal módosított enzimet tartalmazó oldatot 500 ml-es, padlizsánalakú lombikba helyezük, és 2,7 kPa vákuumban 24 órán át liofilizáljuk. Így 600 mg polietilén-glikollal módosított karboxil-észterázt kapunk (ezt a továbbiakban röviden PEG-gel módosított észteráznak nevezzük).

1. példa: Lankacidin A előállítása

2 ml metil-izobutil-ketonos oldatot, amely 11 mM koncentrációban lankacidin C-t és 50 mM koncentrációban ecetsavanhidridet tartalmaz, 20 ml-es kémcsőbe helyezünk, és 0,3 ml PEG-gel módosított észterázt adunk hozzá 0,2 M trisz(hidroxi-metil)-amino-metán-maleinsav pufferoldatban (pH 7,0). A PEG-gel módosított észteráz koncentrációja 12 mg/ml. Ezután rázókészüléken percnként 80 rázatással 37 °C hőmérsékleten rázatjuk.

Ezután túlnyomásos folyadékkromatográfiával (ezt a következőkben röviden HPLC-módszerek nevezzük) az alábbiakban leírt módon megmérjük a képződött lankacidin A mennyiségét az 1. táblázatban feltüntetett időpontokban.

A HPLC-módszer paraméterei a következők:

Műszer: LC-5A típus (Shimadzu Seisakusho Ltd., Japán gyártmánya)

Oszlop: μ poracil oszlop (300x3,9 mm Ø, a Waters Division of Millipore, USA gyártmánya)

Hőmérséklet: 45 °C

Áramlási sebesség: 1,2 ml/perc

A lankacidin C retenció ideje 7,0 perc, a lankacidin A-é 3,5 perc.

A lankacidin A mennyiségét kvantitatív módon határoztuk meg UV abszorpciós detektorral 254 nm hullámhosszon.

Kontrollként 300 mM etil-acetát vagy 100 mM ecetsav alkalmazásával (50 mM ecetsavanhidrid helyett) megismételtük a fenti eljárást. Eredményeinket az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat

A különböző időközökben képződött lankacidin A mennyisége (mM)

Acetilcsop- -donor Reakcióidő perc	Ecetsavanhidrid 50 mM	Etil-acetát 300 mM	Ecetsav 100 mM
0	–	–	–
10	5,58	0,54	–
20	8,11	0,69	–
30	9,09	0,95	–
45	9,30	1,45	–
80	10,83	1,98	–
110	10,83	2,10	–

* a táblázatban 0,1 mM-t meg nem haladó értéket jelent

Az 1. táblázatból világosan látható, hogy a lankacidin A képződési sebessége és mennyisége szempontjából az ecetsavanhidrid alkalmazása kedvezőbb, mint akár az etil-acetáté, akár az ecetsavé. Az ecetsav gyakorlatilag használhatatlan.

2. példa: Lankacidin A előállítása az acetilcsop-
-donor mennyiségének változtatásával

Az acetilcsop-
-donor koncentrációját változtatjuk a 2. táblázatban bemutatott módon, 20 perc reakcióidő megtartásával, egyébként az 1. példában leírt eljárást követjük. A kapott eredmények a 2. táblázatban találhatók.

2. táblázat

Különböző acetilcsop-
-donorok alkalmazásával kapott lankacidin A mennyisége (mM)

Acetilcsop- -donor	mM	A képződött lankacidin A mennyisége mM
Ecetsavanhidrid	1	0,55
	2	1,06
	3	1,40
	5	2,51
	7	3,44
	10	4,76
	15	6,93
	20	7,28
	500	0,85
	1000	1,05
Etil-acetát	2000	1,76
	3000	2,39
	4000	3,28
	5000	3,95
	6000	4,33
	7500	4,95
	10000	6,13

* Ha acetilcsop-
-donorként az etil-acetáttal azonos koncentrációban ecetsavat alkalmazunk, akkor lankacidin A képződése nem figyelhető meg.

A²) formulával megadott Lineweaver-Burk-egyenlet alkalmazásával [Biochemical Dictionary, 1. kiadás,

1314 old. (1984), Tokyokagakudozin Ltd.], amely az ① formulájú Michaelis-Menten- egyenlet módosításából származik (idézett mű, 1239. old.) az acetilcsop-
-donorként ecetsavanhidrid alkalmazásával végzett reakciót összehasonlítottuk a donorként etil-acetátot alkalmazó reakcióval.

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]_0}{[S]_0 + K_m} \quad \dots\dots\dots 1$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \dots\dots\dots 2$$

– ahol v: a reakciósebesség

$V_{\max}$: a maximális reakciósebesség

$[S]_0$: a szubsztátumok koncentrációja

K_m : a Michaelis-állandó

Ha az acetilcsop-
-donor 2. táblázatban feltüntetett koncentráció-értékeit az $[S]_0$ helyére behelyettesítjük, és a képződött lankacidin A mennyiségeit, amely a 2. táblázatban látható, a v helyére helyettesítjük, akkor K_m és $V_{\max}$ értékei is a legkisebb négyzetek módszerével kiszámíthatók.

Az eredményeket a 3. táblázat mutatja.

3. táblázat

Acetilcsop- -donor	K_m mM	$V_{\max}$ mM/20perc
Ecetsavanhidrid	7,69	6,59
Etil-acetát	3010	5,40

A 3. táblázat világosan mutatja, hogy abban az esetben, ha ecetsavanhidridet alkalmazunk acetilcsop-
-donorként, akkor a reakciótermék kielégítően előállítható kismennyiségű szubsztátumokból, mivel a K_m értéke sokkal kisebb, mint abban az esetben, ha acetilcsop-
-donorként etil-acetátot használunk.

3. példa: Lankacidin A előállítása

10 literes, üvegbélésű, keverővel felszerelt reaktorba 2 liter metil-izobutil-ketont töltünk, és 37 °C-on tartva 10 g lankacidin C-t oldunk benne. Ehhez az elegyhez 300 ml 0,2 M trisz(hidroxi-metil)-aminometán-maleinsav pufferoldatban (pH 7,0) oldott 1,2 g PEG-gel módosított észterázt adunk. Összekeverés után az elegyhez 10 ml ecetsavanhidridet teszünk, majd 37 °C-on 40 percig keverjük.

Ekkor a reakcióelegyhez 2 liter desztillált vizet teszünk keverés közben. Keverés után a reakcióelegyet 10 literes választótölcsérbe visszük, és a vizes réteget elkülönítjük. Az így kapott szerves oldathoz 500 ml 2%-os vizes nátrium-hidrogén-karbonát oldatot adunk, alaposan keverjük, majd a vizes réteget ismét eltávolítjuk.

Az így kapott elegyet azonos összetételű vizes nátrium-hidrogén- karbonát oldattal mossuk az ecetsav feleslegének eltávolítására. Ezután kétszer 5 liter desztillált vízzel mossuk választótölcsérben, és utána a szerves fázist elválasztjuk.

Az így kapott szerves oldatot 3 literes Erlenmeyer lombikba visszük át, nátrium-szulfáton 2 órán át szárítjuk, majd vákuumban szárazra pároljuk. Így nyers, kristályos alakban 10 g lankacidin A-t kapunk. Az így kapott nyers terméket 1 liter kloroformban oldjuk, és az oldatot 500 mm hosszúságú, 80 mm átmérőjű szilikagél-oszlopon (Merck Co., USA gyártmánya) vezetjük át. Az oszlopot előzőleg kloroformmal egyensúlyozzuk. Ezután 2 liter kloroformmal mossuk az oszlopot, majd az eluálást etil-acetát és kloroform 3:7 térf./térf. arányú elegyével végezzük. Frakció- kollektorban (Toyo 5F-160K típusú) 20 ml térfogatú frakciókat fogunk fel, s a lankacidin A-t tartalmazó frakciókat összegyűjtjük. A lankacidin A-t UV spektroszkópiával mutatjuk ki.

Az így kapott oldatot vákuumban szárazra párolva a lankacidin A-t poralakban kapjuk.

Ehhez a porhoz 1 liter etil-acetátot adunk, az így kapott oldatot vákuumban 40 ml-re töményítjük, és utána 5 °C-on hűtjük. Az így kivált lankacidin A kristályokat üvegszűrőre gyűjtjük, n-hexánnal mossuk, és 2,7 kPa nyomáson 40 °C hőmérsékleten szárítjuk. Így 8,1 g kristályos lankacidin A-t kapunk.

Igazoltuk, hogy az így kapott kristályos termék olvadáspontja, optikai forgatóképessége, UV színe és elemanalízise azonos a Journal of Antibiotics 24, 13 (1971) irodalmi helyen leírt vegyület megfelelő adataival.

Igazoltuk továbbá, hogy az így kapott kristályos termék retenciós ideje a HPLC-módszer alkalmazása során azonos egy autentikus lankacidin A minta retenciós idejével.

4. példa: Lankacidin A előállítása

10 literes, üvegbeledésű, keverővel felszerelt reaktorba 2 liter metil-izobutil-ketont mérünk, amely 37 °C hőmérsékleten 10 g lankacidin C-t tartalmaz oldott állapotban. Ehhez az oldathoz az 1. referencia-példában kapott karboxil-észteráz-készítmény 1 liter térfogatú oldatát adjuk, amelyet 0,2 M trisz(hidroxil-metil)-amino-metán-maleinsav pufferoldattal (pH 7,0) készítettünk; a karboxil-észteráz készítmény koncentrációja ebben az oldatban 2 mg/ml.

Az elegyhez 10 ml ecetsavanhidridet adunk, majd 37 °C hőmérsékleten 40 percig keverjük. Ezután 2 liter desztillált vizet adunk hozzá, alaposan átkeverjük, majd 10 literes választótölcsérbe visszük át. A 3. példában leírt feldolgozást követve 5,8 g kristályos lankacidin A-t kapunk.

5. példa: Lankacidin A előállítása

Az 1. referencia-példában említett Streptomyces rochei var. volubilis tenyésztésével kapott kultúra szűrlete a Streptomyces rochei var. volubilis-ből származó karboxil-észteráz enzimet tartalmaz.

Ismert, hogy a Streptomyces rochei var. volubilis képes lankacidin C felhalmozására a táptalajban, azaz a Streptomyces rochei var. volubilis mikroorganizmus képes lankacidin C termelésére [The Journal of Antibiotics 24, 1 (1971)].

A kultúra szűrletének lankacidin C tartalmát az 1. példában leírt HPLC-módszerrel mértük meg. Kimutattuk, hogy ez a szűrlet a lankacidin C-t 3500 µg/ml koncentrációban tartalmazza.

Az 5. példában az 1. referencia-példában kapott kultúra szűrletét alkalmazzuk kiinduló anyagnak, amely egyrészt karboxil-észteráz, másrészt hidroxil-vegyületet tartalmaz. Keverővel ellátott, 10 literes, üvegbeledésű fermentorba 1 liter szűrletet helyezünk, és az elegy hőmérsékletét 37 °C-on tartjuk, majd az elegyhez 1 liter 37 °C hőmérsékletű metil-izobutil-ketont és 10 ml ecetsavanhidridet adunk, és utána 37 °C-on 60 percig keverjük. Ezután a reakcióelegyet 5 °C hőmérsékleten 2000 x g sebességgel centrifugáljuk alacsony hőmérsékletű centrifugális szeparátor segítségével (RD-2 IV típus, Tomy Seiko Co. Ltd., Japán cég gyártmánya).

Az így kapott oldatot 10 literes választótölcsérbe visszük, a felső fázist elkülönítjük, és 2 liter desztillált vízzel mossuk. A 3. példában leírt feldolgozást követve 2,8 g lankacidin A-t kapunk.

6. példa: Lankacidin-14-propil-észter előállítása

A 3. példában leírt eljárást követjük, azzal a kivétellel, hogy 10 ml ecetsavanhidrid helyett 10 ml propionsavanhidridet alkalmazunk. A reakcióelegy oldószeres fázisában felhalmozódott termékeket az 1. példában leírt HPLC-módszerrel azonosítjuk, és mérjük. Ennek során a Journal of Antibiotics 26, 647 (1973) irodalmi helyen leírt szintetikus módszerrel előállított lankacidin-14-propionátot alkalmazzuk autentikus mintaként.

A mérés szerint az oldószeres fázis a lankacidin-14-propionátot (amelynek retenciós ideje 2,40 perc) 9,1 g/liter koncentrációban tartalmazza. A 3. példában leírt feldolgozás szerint 7,2 g lankacidin-14-propionátot kapunk elkülönítés és tisztítás után.

Az olvadáspont, optikai forgatóképesség, elemanalízis és a molekuláris extinkció értéke alapján ez a termék azonosnak bizonyult a Journal of Antibiotics 26, 647 (1973) irodalmi helyen leírt vegyülettel.

7. példa: Lankacidin-14-észter előállítása

A 6. példában leírt eljárást követve propionsavanhidrid helyett vajsavanhidridet, izovajsavanhidridet, kapronsavanhidridet vagy benzoésavanhidridet alkalmazunk. A reakcióelegyet az 1. példában leírt HPLC-módszerrel vizsgáljuk, az elkülönítést és tisztítást a 3. példában leírt módszerrel végezzük.

Karbonsavanhidrid	Termék	Retenciós idő perc g	Hozam
Vajsavanhidrid	Lankacidin-14-n-butirát	2,03	5,70
Izovajsavanhidrid	Lankacidin-14-izobutirát	1,89	5,60
Kapronsavanhidrid	Lankacidin-14-kapronát	4,06	3,10
Benzoésavanhidrid	Lankacidin-14-benzoát	4,90	3,21

Az olvadáspont, optikai forgatóképesség, elemnalízis és molekuláris extinkciós együtharató alapján az így kapott vegyületek azonosnak bizonyultak a Journal of Antibiotics 26, 647 (1973) irodalmi helyen leírt megfelelő vegyületekkel.

8. példa: Etil-acetát előállítása

Keverővel ellátott 10 literes üvegbélésű reaktorba 1 mól etanol tartalmazó 20 liter metil-izobutil-ketont helyezünk, és az oldat hőmérsékletét 37 °C-on tartjuk, majd hozzáadjuk a 2. referencia- példa szerint előállított, PEG-gel módosított észteráz 300 ml térfogatú oldatát 0,2 M trisz(hidroximetil)-amino-metán-maleinsav pufferoldatban (pH 7,0), amelyben a PEG-gel módosított észterázkoncentrációja 12 mg/ml. Ezután az elegyhez a 4. táblázatban feltüntetett koncentrációban ecetsavat adunk, és utána az elegyet 37 °C-on 20 percig keverjük.

A metil-izobutil-ketonos réteget elkülönítjük, és az alábbi körülmények megtartásával gázkromatográfiás (GC) elemzésnek vetjük alá. A gázkromatográfiás elemzés körülményei az alábbiak:

Készülék: GC-9A típus, Shimazu Corporation, Japán

Oszlop: Porapak P (60–80 mesh finomságú, átmérője 3 mm, hosszúsága 2 m, Waters Co., USA)

Detektor: FID típus (Shimazu Corporation, Japán)

A hidrogén nyomása: 50 kPa

A légnyomás: 50 kPa

A hidrogén áramlási sebessége: 35 ml/perc

A levegő áramlási sebessége: 480 ml/perc

Az oszlop hőmérséklete: 140 °C

Az injektor és detektor hőmérséklete: 150 °C

A minta térfogata: 5 µl

A komponensek retenciósi ideje a következő:

Etil-acetát (termék): 4,1 perc

Etanol: 1,3 perc

Ecetsav: 2,6 perc

Metil-izobutil-keton: 6,0 perc

Valamennyi komponenst meghatároztuk különleges minőségű vegyszereket (Wako Pure Chem. Ltd., Japán) használva autentikus mintákként. Az eredményeket a 4. táblázatban tüntettük fel.

4. táblázat

Ecetsavanhidrid Kezdeti koncentráció az oldószerben mM	Etil-acetát Kialakuló koncentráció az oldószerben mM	Ecetsav Kialakuló koncentráció az oldószerben mM
0	0	0
2,5	2,4	2,5
5,0	5,2	4,9
10	9,8	8,2
15	15,2	12,3
20	19,3	18,3
30	24,0	23,8
40	25,1	24,5
50	26,2	25,1

9. példa: Etil-acetát elkülönítése

A 8. példában bemutatott 4. táblázatban az ecetsavanhidrid koncentrációját 30 mM-nek véve a képződött etil-acetátot az alábbiakban leírt eljárás szerint elkülönítjük.

A reakcióelegyhez 5 liter desztillált vizet adunk, alaposan átkeverjük, majd 10 literes választótölcsérbe visszük. Egy órási állás után a vizes fázist elkülönítjük, a szerves fázishoz 500 ml 2%-os vizes nátrium-hidrogén-karbonát oldatot adunk, és a választótölcsérben alaposan átkeverjük. Egy órási állás után a vizes fázist elkülönítjük, és a szerves fázishoz 5 liter desztillált vizet adunk. A fentebb leírt módon elkülönítjük a vizes réteget.

Az így kapott elegyet a fentiekben leírt módon háromszor mossuk vizes nátrium-hidrogén-karbonát oldattal az enzimefehérje, etanol és ecetsav eltávolítása céljából. Ezután további 5 liter desztillált vízzel mossuk, majd az elegyet atmoszféranyomáson desztilláló kolonnával 77 °C hőmérsékleten desztilláljuk, és így etil-acetátot kapunk.

A termék sűrűsége 20 °C-on, törésmutatója és a kapott vegyület forráspontja azt mutatja, hogy azonos a Merck Index 8. kiadásában (1968) leírt termékkel.

10. példa: Etil-acetát előállítása módosított észterázzal

2,4-bisz(O-metoxi-polietilén-glikol)-6-klór-s-triazin alkalmazásával olyan PEG-gel módosított karboxil-észteráz enzimet állítunk elő (Enzyme Nomenclature, 3.1.1.1) (a Sigma Co., USA terméke), amely sertésmájából származik. A 2. referencia-példában leírt eljárást követjük.

PEG-gel módosított észteráz alkalmazásával a 8. példában leírt eljárást követve ecetsavanhidridet etanollal reagáltatunk, és az így kapott etil-acetátot és ecetsavat a 8. példában leírt kvantitatív elemző módszer segítségével mérjük. Az eredményeket az 5. táblázatban foglaltuk össze.

5. táblázat

Ecetsavanhidrid Kezdeti koncentráció az oldószerben mM	Etil-acetát Kialakuló koncentráció az oldószerben mM	Ecetsav Kialakuló koncentráció az oldószerben mM
0	0	0
2,5	2,4	2,6
5,0	5,0	4,9
10	9,5	8,3
15	14,9	13,0
20	18,5	17,8
30	23,5	22,9
40	24,0	24,1
50	25,9	25,0

11. példa: Etil-acetát elkülönítése

Ha a 10. példa 5. táblázatában megadott ecetsavanhidrid kezdeti koncentrációja 30 mM, akkor az etil-acetátot a 9. példában leírt módon elkülönítve 3,05 g etil-acetátot kapunk.

A termék sűrűsége 20 °C-on, törésmutatója és forráspontja azt mutatja, hogy azonos a Merck Index 8. kiadásában (1968) leírt termékkel.

12. példa: Propionsav-etil-észter előállítása

10 literes, üvegbélésű, keverővel felszerelt reaktorba 1 mólos koncentrációban etanol tartalmazó 2 liter metil-izobutil-ketonos oldatot töltünk, és az oldat hőmérsékletét 37 °C-on tartjuk.

Ehhez az oldathoz 300 ml *Streptomyces rochei* var. *volubilis*-ből származó, PEG-gel módosított észteráz 300 ml oldatát adjuk, amelyet az 1. referencia-példában leírt eljárással állítunk elő. A módosított észteráz 0,2 M trisz(hidroxil-metil)-amino-metán-maleinsav pufferoldatban (pH 7,0) oldjuk olyan mennyiségben, hogy a PEG-gel módosított észteráz koncentrációja 12 mg/ml legyen.

Az így kapott elegyet 37 °C-on 10 percig keverjük, majd 7,8 propionsavanhidridet teszünk hozzá, és a keverést 37 °C-on 20 percig folytatjuk. Ekkor a reakcióelegyhez 5 liter desztillált vizet adunk, és alapos átkeverés után 10 literes választótölcsérbe visszük át, egy órán át állni hagyjuk, majd a vizes fázist elkülönítjük.

Az így kapott szerves fázishoz 500 ml 2%-os vizes nátrium-hidrogén-karbonát oldatot adunk, összerázás után (rázótölcsérben) egy órán át állni hagyjuk, a vizes fázist elválasztjuk, a szerves fázishoz 5 liter desztillált vizet adunk, majd a vizes fázist a fentebb leírt módon ismét elkülönítjük.

A szerves fázist egymás után háromszor a fentebb leírt módon vizes nátrium-hidrogén-karbonát oldattal mossuk a reakcióelegyben lévő enzimfehérje, etanol és ecetsav eltávolítása céljából. Az így kapott elegyet atmoszféranyomáson 99 °C hőmérsékleten frakcionáltan desztilláljuk, és így 5,5 g etil-propionátot kapunk.

A termék 20 °C-on mért sűrűsége, törésmutatója és forráspontja alapján azonos a Merck Index 8. kiadásában (1968) leírt termékkel.

13. példa: n-Vajsav-etil-észter előállítása

A 12. példában leírt eljárást követjük, azzal a kivétellel, hogy propionsavanhidrid helyett 9,4 g n-vajsavanhidridet alkalmazunk. A feldolgozás után kapott terméket atmoszféranyomáson 178 °C-on frakcionáltan desztillálva 6,3 g n-vajsav-etil-észtert kapunk.

Az így kapott termék 20 °C-on mért sűrűsége, törésmutatója és forráspontja alapján azonos a Merck Index 8. kiadásában (1968) leírt termékkel.

14. példa: n-Kaprónsav-etil-észter előállítása

A 12. példában leírt eljárást követjük, azzal a különbséggel, hogy propionsavanhidrid helyett 12,9 g n-kaprónsavanhidridet alkalmazunk. A feldolgozás után kapott terméket atmoszféranyomáson 178 °C-on frakcionáltan desztillálva 6,3 g n-kaprónsav-etil-észtert kapunk.

Az így kapott termék 20 °C-on mért sűrűsége, törésmutatója és forráspontja alapján azonos a Merck Index 8. kiadásában (1968) leírt termékkel.

15. példa: Propionsav-n-propil-észter előállítása

A 12. példában leírt eljárást követjük, azzal a

kivétellel, hogy etanol helyett n-propanolt alkalmazunk. A feldolgozás után kapott terméket atmoszféranyomáson kolonnával frakcionáltan 124 °C-on desztillálva 6,0 g n-propil-propionátot kapunk.

5 Az így kapott termék 20 °C-on mért sűrűsége, törésmutatója és forráspontja alapján azonos a Merck Index 8. kiadásában (1968) leírt termékkel.

16. példa: n-Vajsav-n-propil-észter előállítása

10 A 12. példában leírt eljárást követjük, azzal a kivétellel, hogy propionsavanhidrid helyett 9,4 g n-vajsavanhidridet és etanol helyett n-propanolt alkalmazunk. A feldolgozás után kapott terméket atmoszféranyomáson kolonnával frakcionáltan 143 °C-on desztillálva 5,8 g n-vajsav-n-propil-észtert kapunk.

15 Az így kapott termék 20 °C-on mért sűrűsége, törésmutatója és forráspontja alapján azonos a Merck Index 8. kiadásában (1968) leírt termékkel.

17. példa: z-propil-acetát előállítása

20 A 12. példában leírt eljárást követjük, azzal a kivétellel, hogy propionsavanhidrid helyett 6,1 g ecetsavanhidridet és etanol helyett izopropanolt alkalmazunk. A feldolgozás után kapott terméket atmoszféranyomáson kolonnával frakcionáltan 89 °C-on desztillálva 5,0 g izopropil-acetátot kapunk.

25 Az így kapott termék 20 °C-on mért sűrűsége, törésmutatója és forráspontja alapján azonos a Merck Index 8. kiadásában (1968) leírt termékkel.

18. példa: n-Butil-acetát előállítása

30 A 12. példában leírt eljárást követjük, azzal a kivétellel, hogy propionsavanhidrid helyett 6,1 g ecetsavanhidridet és etanol helyett n-butanolt alkalmazunk. A feldolgozás után kapott terméket atmoszféranyomáson kolonnával frakcionáltan 126 °C-on desztillálva 5,2 g n-butil-acetátot kapunk.

35 Az így kapott termék 20 °C-on mért sűrűsége, törésmutatója és forráspontja alapján azonos a Merck Index 8. kiadásában (1968) leírt termékkel.

19. példa: Propionsav-n-butil-észter előállítása

40 A 12. példában leírt eljárást követjük, azzal a kivétellel, hogy etanol helyett n-butanolt alkalmazunk. A feldolgozás után kapott terméket atmoszféranyomáson kolonnával frakcionáltan 147 °C-on desztillálva 5,1 g n-butil-propionátot kapunk.

45 Az így kapott termék 20 °C-on mért sűrűsége, törésmutatója és forráspontja alapján azonos a Merck Index 8. kiadásában (1968) leírt termékkel.

20. példa: Benzoésav-etil-észter előállítása

50 A 12. példában leírt eljárást követjük, azzal a kivétellel, hogy propionsavanhidrid helyett 13,6 g benzoésavanhidridet alkalmazunk. A feldolgozás után kapott terméket atmoszféranyomáson kolonnával frakcionáltan 212 °C-on desztillálva 9,2 g etil-benzoátot kapunk.

60 Az így kapott termék 20 °C-on mért sűrűsége, törésmutatója és forráspontja alapján azonos a Merck Index 8. kiadásában (1968) leírt termékkel.

21. példa: (2-Hidroxi-etil)-acetát előállítása

65 A 12. példában leírt eljárást követjük, azzal a kivétellel, hogy propionsavanhidrid helyett 12,2 g

ecetsavanhidridet és etanol helyett etilénlikolt alkalmazunk. A feldolgozás után kapott terméket atmoszféranyomáson kolonnával frakcionáltan 182 °C-on desztillálva 2,0 g (2-hidroxi-etil)-acetátot kapunk.

A frakcionált desztilláció során továbbá 191 °C hőmérsékleten desztilláló 2,2 g (2-acetoxi-etil)-acetátot kapunk.

Az így kapott termék 20 °C-on mért sűrűsége, törésmutatója és forráspontja alapján azonos a Merck Index 8. kiadásában (1968) leírt termékkel.

22. *példa:* Lankacidin A előállítása összehasonlító mérésekkel

200 literes fermentorba 100 liter olyan táptalajt viszünk be, amely 10% dextrint, 0,5% Proflo-t (Traders Oil Mill Co., USA terméke) 2,0% zsírmentesített szójabablisztet, 1,0% kukoricalét, 1,3% kukoricagluténlisztet, 0,025% p-amino-benzoesavat, 0,2% ammónium-szulfátot, 0,5% nátrium-kloridot, 0,1% vas(II)-szulfátot, 0,005% réz(II)-szulfátot, 0,03% nikkel-szulfátot, 2,4% béta-ciklodextrint és 0,2% FS habzágátlító F-20 készítményt (Dow Corning Co., USA cég készítménye) tartalmaz, majd az elegyet 120 °C-on gőzzel sterilizáljuk.

Ekkor a táptalajhoz 5 liter 1. referencia-példában leírt oltótenyészetet oltunk, és 25 °C hőmérsékleten 96 órán át inkubáljuk, miközben 1 VVM mennyiségű levegővel levegőztetjük, és 165 percnkénti fordulat-számmal keverjük.

60 liter így kapott tenyészethez 20 liter vizet és 2 kg Hyflosupercel-t (A Johns Manville Products Co., USA terméke) adunk, és az elegyet szűrjük. Így 70 liter szűrletet kapunk.

Az elegyben az 1. példában leírt HPLC-módszerrel meghatározzuk a lankacidin C tartalmát: ennek eredményeként az elegy a szűrlet 1 ml-ében 4100 µg lankacidin C-t tartalmaz. A szűrlet minden egyes liter térfogatát három 10 literes, üvegbelesű, keverővel felszerelt reaktorba visszük, a reaktorokat 1-től, 3-ig terjedő sorszámmal látjuk el.

Az 1. reaktorban 100 mM ecetsavanhidridet tartalmazó 1 liter metil-izobutil-ketont mérünk; a 2. reaktorba 200 mM etil-acetátot tartalmazó 1 liter metil-izobutil-ketont mérünk; és a 3. reaktorba 200 mM ecetsavat tartalmazó metil-izobutil-ketont viszünk be.

Az 1–3. reaktorokban lévő keverékeket 37 °C hőmérsékleten tartjuk keverés közben az acetilezési reakció lejátszatása céljából. Ezután minden egyes keverék szerves fázisából 1 ml-t kiveszünk, és az 1. példában leírt HPLC-módszerrel meghatározzuk a lankacidin A mennyiségét.

$$\text{A reakció hozama} = \left(\frac{\text{a képződött lankacidin A mennyisége}}{\text{a lankacidin C kezdeti mennyisége}} \right) \times 100$$

A képlet alapján kapott hozamokat a 6. táblázat mutatja.

Továbbá valamennyi reaktorból származó reakció-elegyből elkülönítjük, és tisztítjuk a lankacidin A-t a 3. példában megadott eljárással.

Az így kapott lankacidin A hozamát szintén a 6. táblázat mutatja.

A 6. táblázatból világosan kitűnik, hogy a lankacidin A-t akkor kapjuk a legmagyobb hozammal, ha acetil-donorként ecetsavanhidridet alkalmazunk.

5

6. táblázat

	1	2	3
A reakció hozama tömegszázalékban	95,6	10,1 (0,1% alatt)	–
Hozam g-ban	3,28	0,33	0

10

15

- 1: Ecetsavanhidrid 100 mM koncentrációban
2: Etil-acetát 200 mM koncentrációban
3: Ecetsav 200 mM koncentrációban
A reakció hozamát az alábbi képlettel számítjuk:

20

Az 1 liter szűrletben képződött lankacidin A mennyisége
x100
Az 1 liter szűrletben mint kiinduló anyagban lévő 4,1 g lankacidin C

25

A hozam: az elkülönített és tisztított lankacidin A mennyisége.

30

23. *példa:* 9-Propionil-maridomicin előállítása (Az Ia képletben R₁ jelentése propionil csoport)

Három kémcső közül (amelyek mindegyike 20 ml térfogatú, és csiszolt dugóval zárható) kettőbe egyenként 2 ml etil-propionátot töltünk, a harmadikba 2 ml metil-izobutil-ketont mérünk. Mindhárom kémcsőbe 10 mg (Ia) általános képletű maridomicint helyezünk [ahol a (Ia) képletben R₁ jelentése hidrogénatom], majd a kémcsövek tartalmát alaposan összekeverjük, hogy oldatot kapjunk.

35

Az elegyben az 1. példában leírt HPLC-módszerrel meghatározzuk a lankacidin C tartalmát: ennek eredményeként az elegy a szűrlet 1 ml-ében 4100 µg lankacidin C-t tartalmaz. A szűrlet minden egyes liter térfogatát három 10 literes, üvegbelesű, keverővel felszerelt reaktorba visszük, a reaktorokat 1-től, 3-ig terjedő sorszámmal látjuk el.

40

Az 1. reaktorban 100 mM ecetsavanhidridet tartalmazó 1 liter metil-izobutil-ketont mérünk; a 2. reaktorba 200 mM etil-acetátot tartalmazó 1 liter metil-izobutil-ketont mérünk; és a 3. reaktorba 200 mM ecetsavat tartalmazó metil-izobutil-ketont viszünk be.

45

Az 1–3. reaktorokban lévő keverékeket 37 °C hőmérsékleten tartjuk keverés közben az acetilezési reakció lejátszatása céljából. Ezután minden egyes keverék szerves fázisából 1 ml-t kiveszünk, és az 1. példában leírt HPLC-módszerrel meghatározzuk a lankacidin A mennyiségét.

50

Az elegyben az 1. példában leírt HPLC-módszerrel meghatározzuk a lankacidin C tartalmát: ennek eredményeként az elegy a szűrlet 1 ml-ében 4100 µg lankacidin C-t tartalmaz. A szűrlet minden egyes liter térfogatát három 10 literes, üvegbelesű, keverővel felszerelt reaktorba visszük, a reaktorokat 1-től, 3-ig terjedő sorszámmal látjuk el.

55

Az említett három mintán kívül, amelyek megfelelnek az 1., 2. és 3. reakciórendszernek, a (Ia) képletű maridomicin (ahol R₁ jelentése hidrogénatom), valamint a 9-propionil-maridomicin (ahol R₁ jelentése propionilcsoport) alkalmazásával szintén vékonyréteg-kromatogramot készítünk; futtatószernek acetont és toluolt 1:1 arányú elegyét használjuk.

60

Detektálásra jódgőzt alkalmazva a maridomicin R_f-értéke 0,46-nak, a 9-propionil-maridomicin R_f-értéke 0,57-nek adódik. Azokat a vékonyréteg-részeket, amelyek a mintákon a maridomicinnek, illetve 9-propionil-maridomicinnek megfelelnek, lekaparjuk a le-

65

mezről, összegyűjtjük, és kis térfogatú etil-acetáttal extraháljuk. A kivonatokban kvantitatív módon meghatározzuk a szubsztrátumként alkalmazott maridomicint és a reakciótermékként kapott 9-propionil-maridomicint. E meghatározáshoz a következő irodalmi helyen adott módszert alkalmazzuk: „Colorimetric Quantitative Determination Method of Maridomycin Antibiotics” [Agricultural and Biological Chemistry, 43 847 (1979)].

Az eredményeket a 7. táblázatban mutatjuk be.

7. táblázat

	Szubsztrátum (Maridomicin)	Reakciótermék (9-Propionil-maridomicin)
1. Reakciórendszer	9,3 mg	0,5 mg
2. Reakciórendszer	nyomokban	9,9 mg
3. reakciórendszer	nyomokban	9,8 mg

Megjegyzés:

Az 1. reakciórendszerben: 2 ml propionsav-etil-észter

A 2. reakciórendszerben: 2 ml propionsav-etil-észter és 20 µl propionsavanhidrid

A 3. reakciórendszerben: 2 ml metil-izobutil-keton és 20 µl propionsavanhidrid

24. példa: 9-Propionil-maridomicin előállítása

10 literes térfogatú, üvegbelesű, keverővel felszerelt reaktorba 2 liter előzőleg 28 °C-ra felmelegített olyan metil-izobutil- ketonos oldatot mérünk, amelyben előzőleg 10 g (Ia) általános képletű maridomicint, ahol az (Ia) általános képletben R₁ jelentése hidrogénatom, oldottunk. Ehhez az oldathoz 2 liter 0,2 M trisz(hidroxi-metil)-amino-metán-maleinsav puffertoldatban (pH 7,0) oldott, az 1. referencia-példa szerint előállított 500 mg karboxil-észterát adunk, az oldószeres réteghez 200 ml propionsavanhidridet teszünk, majd egy órán át keverés közben játszátjuk le a reakciót. A reakcióelegyet 10 literes választótölcsérbe visszük át, és a vizes fázist elválasztjuk. A maradékhoz 500 ml 2 tömegszázalékos nátrium-hidrogén-karbonát oldatot adunk, alaposan átkeverjük, majd a vizes fázist elkülönítjük. A nátrium-hidrogén-karbonátos mosást megismételjük, és utána a szerves fázist a választótölcsérben kétszer kirázzuk 1 liter desztillált vízzel. Ezután a szerves fázist 3 literes kúpos lombikba helyezük, 100 g vízmentes nátrium-szulfátot adunk hozzá, és a keveréket 2 órán át állni hagyjuk. A vízmentes nátriumszulfátot szűrőpapíron szűrjük, és a reakcióelegyet szárazra pároljuk. Így kristályos nyers terméként 10 g (Ia) képletű (ahol R₁ jelentése propionilcsoport) 9-propionil-maridomicint kapunk.

E kristályos nyersterméket 1 liter toluolban oldjuk, és az oldatot 80 mm átmérőjű, 500 mm hosszúságú Merck-szilikagélből készült oszlopra öntjük, amelyet előzőleg toluollal egyensúlyoztunk. A 9-propionil-maridomicin az oszlopon adszorbeálódik. Ezután 3 liter toluolt bocsátunk át az oszlopon, és utána az eluálást előbb 2,5 liter 1:0,5 arányú toluol-aceton eleggyel, majd 1:1 arányú toluol-aceton eleggyel végezzük. Az eluátumot 5F-160 típusú Tokyo frakció-kollektorban,

20 ml térfogatú frakciókban fogjuk fel. A vegyület azonosítását vékonyréteg-kromatográfiával végezzük, a 23. példában leírt módszerrel, a 9-propionil-maridomicin kimutatása céljából. A célvegyületet tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, és vákuumban bepároljuk. Így 9,1 g fehér, kristályos terméket kapunk. Az elemanalízis szerint e kristályos termék 59,7% szenet, 8,0% hidrogént és 1,6% nitrogént tartalmaz, [α]_D -61,3° (c=1 kloroformban). Ezek az elemzési értékek megegyeznek az Antimicrobial Agents and Chemotherapy 4, 142 (1973) irodalmi helyen leírt adatokkal. A termék színe megegyezik a Chemotherapy 21, 908 (1973) irodalmi helyen leírt színeképével.

A kristályos termék könnyen oldódik metanolban, etanolban és acetonban, viszonylag jól oldódik kloroformban, alig oldódik vízben.

Ha 5 mg kristályos terméket 2 ml acetonban oldunk, és 2 ml sósavval rázogatójuk, akkor bíborvörös szín jelenik meg. Ha ezt az oldatot 2 ml kloroformmal kirázzuk, és utána állni hagyjuk, akkor a kloroformos fázis enyhe bíborvörös színt ölt.

20 mg fenti kristályos terméket 2 mg tioszemikarbaziddal 2 ml etanolban 1 órán át visszafolyós hűtő alatt forralva lehűtés után 0,2 ml reakcióelegyet kivesszünk, és ehhez 50 ml etanolt adunk. Az így kapott elegy abszorpciós színeképét vizsgálva 270–273 nm hulláhhossznál abszorpciós maximumot figyelhetünk meg. A kristályos termék fentebb leírt sajátosságai és a vizsgált próbák eredményei egyezésben vannak az „Explanation of Minimum Requirements of Antibiotics, Japan” (1986, Yakugyojihosha) 457. oldalán leírt termék (propionil-maridomicin) sajátosságaival.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

- Eljárás (I) általános képletű karbonsavészterek – ahol a képletben R₁ jelentése egyenes vagy elágazó szénláncú 1–6 szénatomos alkil- vagy fenilcsoport; R₂ jelentése egyenes vagy elágazó szénláncú, adott esetben hidroxilcsoporttal szubsztituált 1–5 szénatomos alkilcsoport, vagy lankacidin C-ből a 14-helyzetű- vagy maridomicinből a 9-helyzetű hidroxilcsoport elhagyásával képzett csoport – előállítására karboxil-észteráz katalizátor jelenlétében, *azzal jellemezve*, hogy egy (II) általános képletű hidroxilvegyületet – ahol R₂ jelentése a tárgyi körben megadott – egy (III) általános képletű karbonsavanhidriddel – ahol R₁ jelentése a tárgyi körben megadott – szerves oldószerekben reagáltatunk.
- Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy (II) általános képletű vegyületként R₂ helyében egyenes vagy elágazó szénláncú, adott esetben hidroxilcsoporttal helyettesített 2–5 szénatomos alkilcsoportot tartalmazó alkoholokat, lankacidin C-t vagy maridomicint alkalmazunk.
- Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy karboxil-észterázként kémiaiilag módosított, szerves oldószerekben oldható karboxil-észteráz enzimet alkalmazunk. 4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szerves oldószerekben oldható karboxil-észterázként 2,4-bisz(O-metoxipolietilénlikol)-6-klór-s-triazinnal módosított karboxil- észteráz enzimet alkalmazunk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a karboxil-észterázt egy karboxil-észteráz enzimet termelő mikroorganizmus kultúra szűrletének az alakjában alkalmazzuk.
6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan szerves oldószert alkalmazunk, amely vízzel kétfázisú rendszert alkot. 5
7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szerves oldószerként ketonokat vagy észtereket alkalmazunk. 10
8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szerves oldószerként metil-etil-ketont, metil-n-propil-ketont, metil-n-butil-ketont, metil-izobutil-ketont, metil-acetátot vagy etil-acetátot alkalmazunk.
9. Az 1. igénypont szerinti eljárás lankacidin A előállítására, *azzal jellemezve*, hogy lankacidin C-t egy karboxil-észterázt termelő mikroorganizmus kultúraszűrletének jelenlétében metil-izobutil-ket-onban ecetsavanhidriddel reagáltatunk 5 és 90 °C közötti hőmérsékleten és 2-től 10-ig terjedő pH-tartományban.

