



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

87231

C (11) Patentti ja rekisterihallitus
Patentti- ja rekisterihallitus 10 10 1993

(51) Kv.lk.5 - Int.cl.5

C 12N 9/02, C 12P 7/40

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	843436
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	31.08.84
(24) Alkuperäpäivä - Löpdag	31.08.84
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	10.03.85
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.08.92
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	

09.09.83 DE 3332562 P

(71) Hakija - Sökande

1. **BASF Aktiengesellschaft**, 6700 Ludwigshafen, BRD, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. **Günther, Helmut**, Amperblick 11, 8051 Den Haag, BRD, (DE)
2. **Neumann, Stefan**, Lessindstrasse, 8057 Eching, BRD, (DE)
3. **Simon, Helmut**, Egilbertstrasse 31, 8050 Freising, BRD, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: **Oy Kolster Ab**

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

2-oksokarboksyliihapporeduktaasi, sen valmistus ja käyttö
Förfarande för framställning av 2-oxo-karboxylsyreareduktas och dess användning

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Studies in Organic Chemistry, vol. 13, 1983, p. 207-227, Chemical Abstracts, vol. 98, 1983, 105259t,
Chemical Abstracts, vol. 84, 1976, 55732e

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee uutta entsyymiä, 2-oksokarboksyliihapporeduktaasia, joka on pyridiininukleotidistä riippumaton eikä sisällä lainkaan flaviiniryhmiä, sen valmistusta sekä sen käyttöä 2-oksokarboksyliihappojen pelkistykseen.

Uppfinningen hänför sig till ett nytt enzym 2-oxokarbon-syreareduktas, vilket är oavhängigt av pyridinnykleotid och saknar flavingrupper, samt till dess framställning och användning vid reduktion av 2-oxokarbonsyror.

2-oksokarboksyylihapporeduktaasi, sen valmistus ja käyttö

Keksintö koskee uutta 2-oksokarboksyylihapporeduktaasia, sen valmistusta samoin kuin sen käyttöä 2-oksokarboksyylihappojen ja niiden estereiden pelkistykseen.

On tunnettua pelkistää 2-oksokarboksyylihappoja entsyymaattisesti. Näihin pelkistykseen käytetään entsyymejä, jotka tarvitsevat kosubstraatiksi pyridiin nukleotideja. Esimerkkinä tällaisesta reaktiosta mainittakoon L-laktaatin valmistus pyruvaatista (J. Org. Chem. 47, 2816 (1982)). On lisäksi tunnettua valmistaa 2-hydroksikarboksyylihappojen raseemisia seoksia optisesti puhtaiden 2-hydroksikarboksyylihappojen enantioselektiivisen, mikrobialaisen hajottamisen avulla (Appl. Environ. Microbiol. 45, 884 (1983)). Entsyymaattisella pelkistyksellä pyridiin nukleotidista riippuvaisten reduktaasien avulla on kuitenkin se epäkohta, että tällöin tarvitaan vielä toinen entsyymi, joka regeneroi uudelleen hapetetun pyridiin nukleotidin. Tämän lisäksi pyridiin nukleotidit hajoavat pitemmässä käytössä.

Nyt on keksitty entsyymi, jolla ei ole näitä haittoja.

Keksinnön kohteena on pyridiin nukleotidista riippumaton ja flaviiniryhmiä sisältämätön 2-oksokarboksyylihapporeduktaasi, sen valmistus ja käyttö. Keksinnölle on tunnusomaista se, mitä vaatimuksissa on mainittu.

Oksokarboksyylihapporeduktaasin molekyylipaino on noin 500 000. Sen isoelektrinen piste on arvossa 4,9. Sen käyttökelpoinen pH-alue on välillä 6-8 maksimin ollessa arvossa 6,8. Seuraava taulukko osoittaa entsyymin aktiiviteetin riippuvuutta lämpötilasta. Tarkistusarvona on aktiiviteetti lämpötilassa 24 °C, jonka aktiiviteetiksi merkittiin 100 %.

Taulukko 1

T (°C)	Aktiviteetti (%)	T (°C)	Aktiviteetti (%)
14	46	34	220
19	72	39	306
5 24	=100	44	368
29	150	49	440

45 °C:n lämpötilassa on hapetetun entsyymin puoliintumisaika fosfaattipuskuriliuoksessa tetrasyklinin läsnäollessa noin 13 tuntia. 35 °C:ssa tämä aika on noin 55 tuntia ja pelkistetyssä tilassa pelkistetyn metyyliologiogeenin läsnäollessa noin 100 tuntia. Aktiviteettikäyrän muoto ei ole 1. asteen käyrä. 8 vast. 40 tunnin kuluttua ei hapetetussa entsyymissä ole havaittavissa vielä mitään aktiviteetin heikkenemistä. EDTA:lla ei ole mitään vaikutusta entsyymin aktiviteettiin.

Ainoana prosteettisena ryhmänä on tähän saakka voitu todeta hapolle labiili rikki, joka on luultavasti peräisin Fe/S-kasautumista. Flaviiniryhmiä ei ole spektrofotometrisesti todettavissa.

E erityisen kiintoisaa on se, että entsyymin aktiviteettia voidaan kohottaa hapetetun metyyliologiogeenin avulla. Suurenevien MV²⁺-konsentraatioiden ja 0,15 mM MV⁺:n läsnäollessa suhtautuvat alkunopeudet seuraavalla tavalla:

MV ²⁺	U/ml	
mM	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>
0,01	18,1	13,3
0,08	41,9	24,4
0,16	46,0	31,3
30 0,75	62,0	41,5

(2 mm:n kyvetissä oli 0,3 ml 0,1 M trisasetatipuskuria pH 7,0, 2 µmol 2-okso-4-metyylipentanoaattia, kussakin haudottiin sama entsyymimäärä samoin kuin 0,2 mM pelkistettyä metyyliologiogeenia ja taulukossa ilmoitetut konsentraatiot hapetettua metyyliologiogeenia).

2-oksokarboksyylihapporeduktaasia saadaan liuennalla mekaanisesti entsyymiä sisältävä mikro-organismi, esim. *Proteus vulgaris* DSM 30 118 tai *Proteus mirabilis* DSM 30 115, sentrifugoimalla, ultrasentrifugoimalla sakkaa peittävä neste, liettämällä sakka detergenttiliuokseen ja poistamalla kiinteät epäpuhtaudet uudistetulla ultrasentrifugoinnilla.

Ensimmäisen sentrifugoinnin tarkoituksena on poistaa karkeat epäpuhtaudet. Se suoritetaan yleensä keskivakooiikiihtyvyyden ollessa välillä 5000 - 20 000 g 5 - 10 minuutin pituisen ajan. Sakka heitetään pois. Sakkaa peittävä neste sentrifugoidaan sen jälkeen välillä 0 - 10 °C ja kiihtyvyyden ollessa 80 000 - 120 000 g 1-2 tunnin ajan. Näin saatu sakka lietetään kylmään puskuriliuokseen ja sentrifugoidaan uudelleen kiihtyvyydsarvo-välillä 80 000 - 120 000 g. Sakkaan lisätään dispergoimisainetta, kuten [®]Triton X 100 tai [®]Tween 80 - ja puskuriliuosta (pH 6 - 8) ja sentrifugoidaan uudelleen kiihtyvyydsarvoilla 80 000 - 120 000 g. Näin saatu sakkaa peittävä neste sisältää entsyymin liuenneessa muodossa.

Uuden entsyymin avulla ovat yllättävästi useat 2-oksokarboksyylihapot ja niiden esterit pelkistettävissä stereospesifisesti vastaaviksi (2R)-hydroksikarboksyylihapoiksi vast. niiden estereiksi. Esimerkkejä tällaisista hapoista ovat: 2-oksopropaanihappo (=palorypähappo), 3-fluori-2-oksopropaanihappo, 3-metyyli-2-oksopentaanihappo (molemmat enantiomeeriset muodot), 4-metyyli-2-oksopentaanihappo, fenyyliketoetikkahappo, fenyylipalorypähappo, 5-bentsyylioksi-β-indolyylipalorypähappo, ketomeripihkahappo, 2-oksoglutaarihappo, 2-oksoadipiinihappo, 2-oksoatselaiinihappo, 2-oksosebasiinihappo, 2-oksoundekaanidikarboksyylihappo, 2-okso-4-(metyyllitio)voihappo, indolyylipalorypähappo, 2-okso-4-metyyllifosfinovoihappo. Esimerkki esteristä on palorypähappo-etyyliesteri. Pelkistystuotteet ovat yleensä jopa yli 98 %:sestikin optisesti

puhtaita. Osaksi on optinen puhtaus jopa yli 99,5 %.

Uusi entsyymi ei myöskään tarvitse toimintaansa varten mitään pelkistettyjä pyridiin nukleotidejä. Se pysyy siirtämään elektroneja suoraan elektronien kantajalta - kuten metyyli- tai bentsyyli viologeenilta pelkistetyssä tilassa - substraatille.

Esimerkki 1

Proteus mirabilis'ta (DSM 30 115) viljeltiin täyselatusväliaineessa (hiivauutetta 5,0 g, glukosia 5,0 g, lihasta saatua peptonia 20,0 g, K_2HPO_4 5,0 g, H_2O 1000 ml, pH 7,2) 35 °C:ssa kaasuttamalla seoksella, jossa oli 97 % N_2 ja 3 % O_2 . Korkeampia entsyymiaktiiviteetteja saadaan raakautoksessa käyttämällä Proteus vulgaris (DSM 30118). Tässä tapauksessa täytyy kuitenkin viljellä siten, että hapen luoksepääsy on täysin estetty. Raakautoksissa on saavutettavissa spesifisiksi entsyymiaktiiviteeteiksi 7 - 9 U/mg proteiinia. Näin saadut solut korjattiin talteen aikaisessa stationäärisessä faasissa. 1 paino-osa kosteata bakteerimassaa lietettiin 3 osaan 20 mM kaliumfosfaattipuskuria pH 7,0 ja käsiteltiin jäähauteessa N_2 -atmosfäärin alaisena ultraäänivärähtelygeneraattorin avulla siksi kunnes yli 90 % soluista oli avautunut, mikä todettiin mikroskooppisesti.

64 ml näin saatua raakautetta sentrifugoitiin 10 minuuttia kiihtyvyydsarvolla 10 000 g ja 4 °C:ssa ja sakka heitettiin pois. Sakkaa peittävää nestettä sentrifugoitiin 90 minuuttia kiihtyvyydsarvolla 100 000 g ja 4 °C:ssa ja sakkaa peittävä neste heitettiin pois. Sakka pestiin 32 ml:lla 20 mM kaliumfosfaattipuskuria pH 7,0 ja sentrifugoitiin vielä 60 minuuttia kiihtyvyydsarvolla 100 000 g. Sakkaa peittävä neste heitettiin jälleen pois. Sakka lietettiin 32 ml:aan 20 mM kaliumfosfaattipuskuria pH 7,0, joka sisälsi 0,2 g [®] Triton X-100. 45 minuuttia kestäneen hämmentämisen jälkeen sentrifugoitiin 60 minuuttia kiihtyvyydsarvolla 100 000 g 0 °C:ssa. Reduktaasi oli sakkaa peittävässä nesteessä. Saanto oli 80 %.

Esimerkki 2

10 ml esimerkin 1 mukaan saatua raakautetta, joka sisälsi yhteensä 300 U (ominaisaktiviteetti 1,3 U/mg proteiinia), kaadettiin [®]Sephacryl S-1000-pylvään (täytöksen tilavuus 425 ml) päälle ja evaluoitiin 20 mM kaliumfosfaattipuskurilla pH 7,0 tilavuusvirtausnopeuden ollessa 30 ml/tunti 4 °C:ssa. Entsyymiä ilmaantui kalvo-osasten yhteyteen noin 6 tunnin jälkeen. Aktiviteettia sisältävät fraktiot (55 ml) yhdistettiin ja väkevöitiin ultrasuodatuksen avulla 7 ml:ksi.

Nämä 7 ml sisälsivät 90 % raakautoksen entsyymistä ominaisaktiviteetin ollessa 24 U/mg.

Esimerkki 3

50 g kosteata bakteerimassaa liuennettiin analogisesti esimerkin 1 kanssa. Viimeisen sentrifugoinnin jälkeen sakan päällä oleva nestetilavuus väkevöitiin ultrasuodatuksen avulla 11 ml:ksi (500 U/ml reduktaasia ja 37 mg proteiinia/ml), tämä kaadettiin [®]Sepharose 6B-pylvään (tilavuus 440 ml) päälle ja eluoitiin liuoksella, joka sisälsi 20 mM kaliumfosfaattipuskuria pH 7,0, 0,05 % [®]Triton X 100 ja 1 mM ditioerytriittiä. Yhdistetyt entsyymiä sisältävät fraktiot väkevöitiin ultrasuodatuksen avulla 35 ml:ksi. Laimennuksen jälkeen suoritetun toistetun ultrasuodatuksen avulla saatiin 35 ml liuosta, joka oli 10 millimolaarinen kaliumfosfaattipuskurin osalta. Sen jälkeen kun liuos oli kaadettu hydroksiapatiittipylvään (Bio Gel HTP) päälle, jonka täytöksen tilavuus oli 100 ml ja joka oli tasapainotettu liuoksella, joka oli 10 mM fosfaattipuskurin osalta ja sisälsi 0,05 % [®]Triton X 100 ja oli 1 mM ditioerytriitin osalta, eluoitiin pylväs lineaarisen gradientin mukaisesti 10 - 100 mM fosfaattipuskurilla ja edellä mainituilla lisäaineilla. Yhdistetyt entsyymiä sisältävät fraktiot väkevöitiin ultrasuodatuksen avulla 50 ml:ksi. Nämä sisälsivät 0,37 mg proteiinin/ml ja 26 U/ml reduktaasia. 9 tuntia kestäneen dialyysin jälkeen, joka

suoritettiin liuosta vastaan, joka oli 10 mM tris. HCl pH 7,5:n osalta ja sisälsi 0,05 % Triton X 100, kaadettiin entsyymiliuos [®]DEAE-Sephadex A25-pylvään päälle, jonka täytöksen tilavuus oli 35 ml, ja entsyymi eluoiitiin lineaarisen gradientin mukaisesti, jolloin edellä mainittu puskuriliuos oli 0 - 700 mM KCl:n osalta. Sen jälkeen kun entsyymiä sisältävät yhdistetyt fraktiot oli ultrasuodatettu 8,2 ml:ksi, saatiin ominaisaktiviteetiksi 300 U/mg proteiinia (90 U/ml; 0,3 mg proteiinia/ml).

Esimerkki 4

40 g kosteata *Proteus vulgaris*-bakteerimassaa lietetettiin liuoksella, joka sisälsi 60 ml 0,01 M tris-HCl puskuria pH 7,5 ja 1 mM ditioerytriittiä, jonka jälkeen bakteerimassa liuennettiin ultraäänikäsittelyn avulla (30 minuuttia, 40 wattia, ei yli 6 °C). Lysaattia sentrifugoitiin 10 minuuttia kiihtyvyydsarvolla 15 000 g ja sakan päällä olevaa nestettä sentrifugoitiin kiihtyvyydsarvolla 100 000 g 120 minuuttia. Sedimentti lietetettiin uudelleen 75 ml:lla 0,01 M tris-HCl pH 7,5 puskuria ja lietteeseen lisättiin 1 % (til./til.) detergenttiä (Polyoksoetyleenin-9-lauryylietteriä (Sigma)). Sen jälkeen kun tätä suspensiota oli hämmennetty 45 minuuttia jäähauteessa, suoritettiin uudelleen sentrifugointi kiihtyvyydsarvolla 100 000 g 90 minuutin ajan. Sakan päällä oleva neste sisälsi 2-oksokarboksyylihappon-reduktaasia.

Liuos kaadettiin DEAE-selluloosa-pylvään ($\emptyset = 2,5$ cm, tilavuus 90 ml) päälle, joka oli tasapainoitettu liuoksella, joka oli 0,1 M tris-HCl pH 7,5:n osalta, 1 mM ditioerytriitin osalta, sisälsi 0,8 % detergenttiä (til./til.) ja oli 4 mM ditioniitin osalta. Sen jälkeen kun pylväs oli jälkieluoitu noin kahdella pylvään tilavuudella edellä mainittua puskuriliuosta, käytettiin edellä mainitussa puskuriliuoksessa lineaarisen gradientin mukaan 0,1-0,7molaarista KCl (2 x 225 ml). Entsyymi eluoiitui suunnilleen 250 mM:lla KCl:llä ja sitä oli kaikkiaan noin 60 ml.

Entsyymiä sisältävät fraktiot yhdistettiin ja kaadettiin hydroksyyliapatiitti-pylvään (HA Bio-Gel, $\phi = 1,5$ cm, tilavuus 40 ml) päälle, joka oli tasapainotettu liuoksella, joka oli 0,01 M tris-HCl pH 7,5:n osalta, 1 mM ditioerytriitin osalta, sisälsi 0,4 % (til./til.) detergenttiä ja oli 4 M ditioniitin osalta. Edellä mainitulla tasapainotuspuskuriliuoksella (noin 1 pylvään tilavuus) suoritettujen eluoinnin jälkeen eluointiin lineaarisen gradientin mukaan liuoksilla, jotka olivat 0 - 150 mM kaliumfosfaatin (pH 7,5) osalta ja sisälsivät mainittuja lisäaineita, jolloin entsyymi eluoi noin 60 mM kaliumfosfaattipuskurilla. Yhdistetyt fraktiot (noin 30 ml) kaadettiin toisen DEAE-selluloosa-pylvään ($\phi = 1$ cm, tilavuus 20 ml) päälle, joka oli tasapainotettu edellä mainitulla puskuriliuoksella. Lyhyen jälkieluoinnin jälkeen eluointiin 2-oksokarboksylihappon-reduktaasi lineaarisen gradientin 0 - 0,4 M KCl mukaan jälleen edellä mainitulla puskuriliuoksella. Entsyymiä sisältävät fraktiot, joissa oli pääasiallisin aktiiviteetti, yhdistettiin ja väkevöitiin ultrasuodatuksen avulla YM 30-kalvon (Amicon) läpi noin 6 ml:ksi. Tämä liuos kromatografoitiin käyttämällä Sepharose[®] Cl 6B-pylvästä ($\phi = 2,5$ cm, tilavuus 365 ml) joka oli tasapainotettu käyttämällä 0,01 M tris-HCl puskuri pH 7,5, 0,05 M KCl ja edellä mainittuja lisäaineita.

Entsyymien ominaisaktiiviteetti on 350 U/mg proteiinia. Oheinen kaavio esittää puhdistuksen kulkua.

2-oksokarboksyylaattireduktaasin rikastaminen

Rikastusvaihe	Tilavuus V (ml)	Kokonais- proteiini- määrä M _{Pr} (mg)	Proteiini- konsent- raatio C _{Pr} (mg/ml)	Tilavuus- aktivi- teetti VA (U/ml)	Kokonais- aktiiviteetti (U) GA	Ominais- aktivi- teetti (U/mg) SA	n-kertainen rikastus & saanto
Raakaautos	90	1750	19,4	55	5000	2,8	- 100
Liuotettu entsyymi	80	560	7	50	4000	7,2	2,6 80 suurin piirtein H ₂ -aasi-vapaa
DEAE-selluloosa I:n jälkeen	55	248	4,5	54,5	3000	12	4,3 60 H ₂ -aasi-vapaa
Hydroksyyli- apatiitin jälkeen	40	68	1,7	48	1950	28,5	10,2 39
DEAE-selluloosa II:n ja ultra- suodatuksen jälkeen	6,6	10,4	1,58	166	1100	105	37,5 22
Sepharose Cl 6B:n ja ultra- suodatuksen jälkeen	3	1,86	0,62	220	660	350	125 13,2

Esimerkki 5

Sähkökemiallisessa kennossa pelkistettiin 25 ml liuosta, joka oli 100 mM kaliumfosfaattipuskurin pH 7,0 osalta, 4 mM metyyliiviologeenin osalta ja 40 mM fenyyli-
 5 pyruvaatin osalta, 0,5 mg:lla esimerkin 3 mukaista 2-okso-
 happoreduktaasia, jännityksen ollessa -700 mV standardika-
 lomelielektrodin suhteen. Virran voimakkuus 5,8 mA putosi
 jyrkästi 9 tunnin kuluttua. Reaktioliuos sisälsi HPLC-ana-
 10 lyysin mukaan 88 % odotetusta fenyylimaitohaposta. Lai-
 mealla rikkihapolla pH-arvoon 1,8 hapotuksen jälkeen uu-
 tettiin eetterillä. Kiteinen jäännös, 78 % teoreettisesta
 arvosta, osoittaa natriumsuolaksi muuttamisen jälkeen
 kiertokulmaa $[\alpha]^{RT}_{589} = 21,1^\circ$; 0,09 millimoolia/ml H₂O.
 (2S)-natriumfenyyliilaktaatin puhdas kaupallinen valmiste
 15 osoitti samoissa olosuhteissa mitattuna arvoa $-21,4^\circ$.
 Analogisesti samalla tavalla valmistettiin (R)-mantelihap-
 poa ja (R)-2-hydroksi-4-metyylipentanaattia.

Seuraava taulukko 2 esittää suhteellisia nopeuksia
 joilla 2-okso-karboksyylihapot pelkistyvät, kun fenyyli-
 20 pyruvaatin arvoksi merkitään 1. 3-oksokarboksyylihapot ja
 hydroksiasetoni eivät pelkisty.

Taulukko 2

Substraatti	Suhteelliset nopeudet	
	<i>P.mirabilis</i>	<i>P.vulgaris</i>
25 Fenyylipyruvaatti	= 1,00	= 1,00
Pyruvaatti	0,92	0,85
Oksaaliasetaatti	0,73	0,50
2-oksoglutaraatti	0,78	0,62
30 2-oksoadipaatti	0,70	
Indolypyruvaatti	0,35	0,67
5-bentsyylioksi-indolyyli- pyruvaatti	0,30	
2-oksopatoaatti	0,07	0,04
3-fluoripyruvaatti	0,22	0,20
35 2-okso-4-metyylipentanoaatti	0,81	

87231

10

	(+) 2-okso-3-metyylipentanoaatti	0,28	0,25
	(<u>+</u>) 2-okso-3-metyylipentanoaatti	0,46	
	Fenyyliglyoksylaatti	0,16	0,05
	3-oksoglutaraatti	0	
5	Hydroksiasetoni	0	

Patenttivaatimukset

1. 2-oksokarboksyylihapporeduktaasi, t u n n e t-
t u siitä, että se on pyridiin nukleotidistä riippumaton
5 eikä sisällä lainkaan flaviiniryhmiä ja sen molekyylipaino
on noin 500 000, käyttökelpoinen pH-alue on välillä 6 - 8,
maksimin ollessa arvossa 6,8 ja isoelektrinen piste arvos-
sa 4,9 ja että se on valmistettavissa menetelmällä, jossa
10 *Proteus mirabilis* DSM 30115 tai *Proteus vulgaris* DSM 30118
liuennetaan, raakauutos sentrifugoidaan, sakan päällä ole-
va neste ultrasentrifugoidaan, sakka lietetään deter-
genttiliuokseen ja kiinteät epäpuhtaudet poistetaan uuden
ultrasentrifugoinnin avulla.

2. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen 2-okso-
15 karboksyylihapporeduktaasin valmistamiseksi, t u n n e t-
t u siitä, että *Proteus mirabilis* DSM 30115 tai *Proteus*
vulgaris DSM 30118 liuennetaan, raakauutos sentrifugoi-
daan, sakan päällä oleva neste ultrasentrifugoidaan, sakka
lietetään detergenttiliuokseen ja kiinteät epäpuhtaudet
20 poistetaan uuden ultrasentrifugoinnin avulla.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen 2-oksokarboksyyl-
lihapporeduktaasin käyttö 2-oksokarboksyylihappojen ja
niiden esterien pelkistykseen.

Patentkrav

1. 2-oxokarboxylsyrareduktas, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att det är oavhängigt pyridinnukleotid och
5 saknar flavingrunder, är användbart inom pH-området 6 - 8,
varvid det maximala pH-värdet är 6,8 och har en molekyl-
vikt på ca 500 000 och vars isoelektriska punkt är 4,9 och
att det kan framställas enligt ett förfarande där man upp-
löser *Proteus mirabilis* DSM 30115 eller *Proteus vulgaris*
10 DSM 30118, centrifugerar råextraktet, ultracentrifugerar
den ovanför fällningen belägna vätskan, suspenderar fäll-
ningen i en detergentlösning och avlägsnar fasta förore-
ningar genom förnyad ultracentrifugering.

2. Förfarande för framställning av 2-oxokarboxyl-
15 syrareduktas enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att man upplöser *Proteus mirabilis* DSM 30115
eller *Proteus vulgaris* DSM 30018, centrifugerar råextrak-
tet, ultracentrifugerar den ovanför fällningen belägna
vätskan, suspenderar fällningen i en detergentlösning och
20 avlägsnar fasta föroreningar genom förnyad ultracentrifu-
gering.

3. Användning av 2-oxokarboxylsyrareduktaset enligt
patentkravet 1 för reduktion av 2-oxokarboxylsyror och de-
ras estrar.