KIVONAT

Eljárás királis karbonsavak előállítására nitrilekből, nitrilázt kódoló gént tartalmazó mikroorganizmusokból származó nitriláz segítségével

A találmány tárgyát nitriláz-aktivitással rendelkező polipeptideket kódoló nukleinsav-szekvenciák, a nukleinsav-szekvenciákat tartalmazó nukleinsav-konstrukciók, valamint a nukleinsav--szekvenciákat vagy a nukleinsav-konstrukciókat tartalmazó vektorok képezik. A találmány tárgyát képezik továbbá a nukleinsav--szekvenciák által kódolt aminosav-szekvenciák, valamint a nukleinsav-szekvenciákat, a nukleinsav-konstrukciókat vagy a nukleinsav-szekvenciákat vagy a nukleinsav-konstrukciókat tartalmazó vektorokat tartalmazó mikroorganizmusok. A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás királis karbonsavak előállítására racém nitrilekből.

2001.12.07.

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

Patent 2

Eljárás királis karbonsavak előállítására nitrilekből, nitrilázt kódoló gént tartalmazó mikroorganizmusokból származó nitriláz segítségével

A találmány tárgyát nitriláz-aktivitással rendelkező polipeptideket kódoló nukleinsav-szekvenciák, a nukleinsav-szekvenciákat tartalmazó nukleinsav-konstrukciók, valamint a nukleinsav--szekvenciákat vagy a nukleinsav-konstrukciókat tartalmazó vektorok képezik. A találmány tárgyát képezik továbbá a nukleinsav--szekvenciák által kódolt aminosav-szekvenciák, valamint a nukleinsav-szekvenciákat, a nukleinsav-konstrukciókat vagy a nukleinsav-szekvenciákat vagy a nukleinsav-konstrukciókat tartalmazó vektorokat hordozó mikroorganizmusok.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás királis karbonsavak előállítására racém nitrilekből.

A királis karbonsavak keresett vegyületek szerves kémiai szintézisekhez. Kiindulási anyagként szolgálnak számos gyógyhatású hatóanyag vagy növényvédelemben alkalmazott hatóanyag előállításánál. Királis karbonsavak alkalmazhatók diasztereomer sókon át végzett klasszikus racemát elválasztásokhoz. Így például R-(-)- vagy S-(-)-mandulasav (α-hidroxi-fenil-ecetsav) alkalmazható racém aminok racemát elválasztására. Ezenkívül az R-(-)-mandulasavat köztitermékként alkalmazzák antibiotikumok, és számos mezőgazdasági termék félszintézisénél.

A szakirodalomból egy sor, különböző szintézisút ismeretes királis karbonsavak előállítására. Például optikailag aktív aminosavakat iparilag fermentációs eljárásokkal állítanak elő. Ennek az a hátránya, hogy minden egyes aminosavra egy egyedi eljá-

rást kell kifejleszteni. Különféle vegyületek lehető legszélesebb palettájának előállíthatósága céljából ezért kémiai vagy enzimes eljárást alkalmaznak. A kémiai eljárásoknak az a hátrányuk, hogy a sztereocentrumot rendszerint többlépcsős, szűk körben alkalmazható szintézisben, körülményesen kell felépíteni.

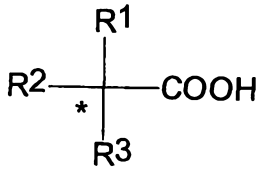
Királis karbonsavak enzimes szintézisét egy sor szabadalmi leírásban vagy szabadalmi bejelentésben tárgyalják. A WO92/05275 számú szabadalmi iratban leírják enantiomer α-hidroxi-α-alkil- vagy α-alkil-karbonsavak szintézisét biológiai anyagok jelenlétében. Az EP-B-0 348 901 számú szabadalmi iratban leírnak egy optikailag aktív, α-szubsztituált szerves savak előállítására szolgáló eljárást, amelyben Alcaligenes, Pseudomonas, Rhodopseudomonas, Corynebacterium (KO-2-4-törzs), Acinetobacter, Bacillus, Mycobacterium, Rhodococcus és Candida nemzetséghez tartozó mikroorganizmusokat alkalmaznak. Az EP-B-0 332 379 számú szabadalmi iratban igényeltek szerint, L-α-aminosavakat mikroorganizmusok segítségével állítanak elő.

-Hidroxi-karbonsavak előállítását, konkrétan optikailag aktív tejsav vagy mandulasav előállítását különböző mikroorganizmusok, például Alcaligenes, Aureobacterium, Caseobacter, Bacillus, Mycobacterium, Rhodococcus, Brevibacterium, Nocardia, Variovorax, Arthrobacter és Candida nemzetséghez tartozó mikroorganizmusok vagy enzimek alkalmazásával végzik az EP-A-0 348 901 vagy az ennek megfelelő USP 5,283,193, valamint az EP-A-0 449 648, EP-B-0 473 328, EP-B-0 527 553 vagy az ennek megfelelő USP 5,296,373, valamint az EP-A-0 610 048, EP-A-0 610 049, EP-A-0 666 320 vagy a WO 97/32030 számú szabadalmi iratokban leírtak szerint.

Ezen eljárások hátránya az, hogy gyakran csak csekély optikai tisztaságú termékhez vezetnek, és/vagy csak alacsony tér-idő--kitermeléssel folynak le. Ez gazdaságilag nem vonzó eljáráshoz vezet. A termelékenység fokozása céljából hozzáadott bizonyos anyagok, például szulfit, diszulfit, ditionit, hipofoszfit vagy foszfit (lásd EP-A-0 486 289 számú szabadalmi iratot), vagy α--hidroxi-nitrilekkel szemben fokozott rezisztenciával rendelkező mikroorganizmusok alkalmazása (lásd WO97/32030 számú szabadalmi iratot) nem növelte jelentősen a termelékenységet.

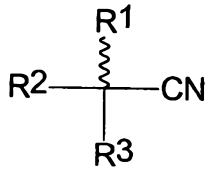
A találmány szerinti megoldás kidolgozása során célul tűztünk ki könnyű, költségkímélő, széles körben alkalmazható eljárás kidolgozását optikailag aktív királis karbonsavak előállítására, amely nem rendelkezik a fentebb megnevezett hátrányokkal.

Ezt a feladatot az



(I)

általános képletű királis karbonsavak előállítására szolgáló, találmány szerinti eljárás kidolgozásával oldottuk, amelyben egy



(II)

általános képletű racém nitrilt egy olyan aminosav-szekvencia jelenlétében alakítunk át királis karbonsavvá, melyet az alábbiak közül választott nukleinsav-szekvencia kódol:

a) az 1. számú szekvenciával (SEQ ID NO: 1) rendelkező nukleinsav-szekvencia,

b) olyan nukleinsav-szekvenciák, amelyek a genetikai kód degeneráltsága eredményeként az 1. számú nukleinsav-szekvenciából lettek levezetve,

c) az 1. számú nukleinsav-szekvencia olyan származékai, amelyek a 2. számú aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptidet kódolják, és aminosav-szinten legalább 80%-osan homológok azzal, anélkül, hogy a polipeptid enzimhatása lényegesen csökkenne,

vagy olyan növekvő (tenyésztett), nyugalomban lévő vagy feltárt mikroorganizmusok jelenlétében, amelyek a fentebb leírt csoportban felsorolt bármelyik nukleinsav-szekvenciát vagy olyan nukleinsav-konstrukciót tartalmaznak, amelyben a fentebb leírt csoportban felsorolt bármelyik nukleinsavhoz egy vagy több szabályzó szignál van kapcsolva, és amelyben óránként legalább 25 mmol nitril (mg fehérjére vagy gramm szárazanyag-tömegre vonatkoztatva) képes átalakulni.

Az (I) és (II) általános képletben a szubsztituensek és szimbólumok jelentése az alábbi:

* optikailag aktív centrum;

R^1, R^2, R^3 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, szubsztituált vagy szubsztituálatlan, elágazó vagy egyenes láncú, 1-10 szénatomos alkilcsoport, 2-10 szénatomos alkenilcsoport, szubsztituált vagy szubsztituálatlan arilcsoport, heteroaril-csoport, $-OR^4$ vagy $-NR^4R^5$ általános képletű csoport, és R^1, R^2 és R^3 jelentése mindig egymástól eltérő;

R^4 jelentése hidrogénatom, szubsztituált vagy szubsztituálatlan, elágazó vagy egyenes láncú, 1-10 szénatomos alkil-

csoport, 2-10 szénatomos alkenilcsoport, 1-10 szénatomos alkil-karbonil-csoport, 2-20 szénatomos alkenil-karbonil--csoport, arilcsoport, aril-karbonil-csoport, heteroaril--csoport vagy heteroaril-karbonil-csoport;

R^5 jelentése hidrogénatom, szubsztituált vagy szubsztituálatlan, elágazó vagy egyenes láncú, 1-10 szénatomos alkilcsoport, 2-10 szénatomos alkenilcsoport, arilcsoport vagy heteroaril-csoport.

R^1, R^2, R^3 jelentése az (I) és (II) általános képletben egymástól függetlenül hidrogénatom, szubsztituált vagy szubsztituálatlan, elágazó vagy egyenes láncú, 1-10 szénatomos alkilcsoport, 2-10 szénatomos alkenilcsoport, szubsztituált vagy szubsztituálatlan arilcsoport, heteroaril-csoport, $-OR^4$ vagy $-NR^4R^5$ általános képletű csoport, és R^1, R^2, R^3 jelentése mindig különböző.

Alkilcsoport lehet szubsztituált vagy szubsztituálatlan, elágazó vagy egyenes láncú, 1-10 szénatomos alkillánc, például metil-, etil-, propil-, izopropil-, butil, 1-metil-propil-, 2--metil-propil-, terc-butil-, pentil-1-metil-butil-, 2-metil-butil-, 3-metil-butil-, 2,2-dimetil-propil-, 1-etil-propil-, hexil-, 1,1-dimetil-propil-, 1,2-dimetil-propil-, 1-metil-pentil-, 2--metil-pentil-, 3-metil-pentil-, 4-metil-pentil-, 1,1-dimetil--butil-, 1,2-dimetil-butil-, 1,3-dimetil-butil-, 2,2-dimetil--butil-, 2,3-dimetil-butil-, 3,3-dimetil-butil-, 1-etil-butil-, 2-etil-butil-, 1,1,2-trimetil-propil-, 1,2,2-trimetil-propil-, 1--etil-1-metil-propil-, 1-etil-2-metil-propil-, heptil-, oktil-, nonil- vagy decil-csoport. Előnyösen alkalmazott csoport a metil-, etil-, propil-, butil-, izopropil- vagy izobutil-csoport.

Az alkenilcsoport lehet elágazó vagy egyenes láncú, 2-10 szénatomos alkenil-lánc, például vinil-, propenil-, 1-butenil-, 2-butenil-, 3-butenil-, 2-metil-propenil-, 1-pentenil-, 2-pentenil-, 3-pentenil-, 4-pentenil-, 1-metil-1-butenil-, 2-metil-1-butenil-, 3-metil-1-butenil-, 1-metil-2-butenil-, 2-metil-2-butenil-, 3--metil-2-butenil-, 1-metil-3-butenil-, 2-metil-3-butenil-, 3--metil-3-butenil-, 1,1-dimetil-2-propenil-, 1,2-dimetil-1-propenil-, 1,2-dimetil-2-propenil-, 1-etil-1-propenil-, 1-etil-2-propenil-, 1-hexenil-, 2-hexenil-, 3-hexenil-, 4-hexenil-, 5-hexenil-, 1--metil-1-pentenil-, 2-metil-1-pentenil-, 3-metil-1-pentenil-, 4--metil-1-pentenil-, 1-metil-2-pentenil-, 2-metil-2-pentenil-, 3--metil-2-pentenil-, 4-metil-2-pentenil-, 1-metil-3-pentenil-, 2--metil-3-pentenil-, 3-metil-3-pentenil-, 4-metil-3-pentenil-, 1--metil-4-pentenil-, 2-metil-4-pentenil-, 3-metil-4-pentenil-, 4--metil-4-pentenil-, 1,1-dimetil-2-butenil-, 1,1-dimetil-3-butenil-, 1,2-dimetil-1-butenil-, 1,2-dimetil-2-butenil-, 1,2-dimetil-3--butenil-, 1,3-dimetil-1-butenil-, 1,3-dimetil-2-butenil-, 1,3--dimetil-3-butenil-, 2,2-dimetil-3-butenil-, 2,3-dimetil-1--butenil-, 2,3-dimetil-2-butenil-, 2,3-dimetil-3-butenil-, 3,3--dimetil-1-butenil-, 3,3-dimetil-2-butenil-, 1-etil-1-butenil-, 1-etil-2-butenil-, 1-etil-3-butenil-, 2-etil-1-butenil-, 2-etil--2-butenil-, 2-etil-3-butenil-, 1,1,2-trimetil-2-propenil-, 1--etil-1-metil-2-propenil-, 1-etil-2-metil-1-propenil-, 1-etil-2--metil-2-propenil-, 1-heptenil-, 2-heptenil-, 3-heptenil-, 4--heptenil-, 5-heptenil-, 6-heptenil-, 1-oktenil-, 2-oktenil-, 3--oktenil-, 4-oktenil-, 5-oktenil-, 6-oktenil-, 7-oktenil-, nonenil- vagy decenil-csoport. Előnyösen alkalmazott csoport a

vinil-, propenil-, butenil- vagy pentenil-csoport.

Arilcsoportként olyan szubsztituált vagy szubsztituálatlan arilcsoportokat alkalmazunk, amelyek 6-20 szénatomot tartalmaznak gyűrűben vagy gyűrűrendszerben. Ezek lehetnek egymással kondenzált aromás gyűrűk vagy olyan aromás gyűrűk, amelyek alkil-, alkil-karbonil-, alkenil- vagy alkenil-karbonil-láncokon, karbonil-csoporton, oxigén- vagy nitrogén-atomon keresztül kapcsolódnak. Arilcsoportok adott esetben 1-10 szénatomos alkil-, 3-8 szénatomos alkenil-, 3-6 szénatomos alkinil- vagy 3-8 szénatomos cikloalkil-láncokon keresztül az alapváznál még össze lehetnek kapcsolva. Előnyösen alkalmazott csoport a fenil- vagy naftil-csoport.

Heteroaril-csoportként szubsztituált vagy szubsztituálatlan, egyszerű vagy kondenzált, aromás, 3-7 tagból álló gyűrűket alkalmazunk, amelyek egy vagy több heteroatomot, például nitrogénatomot, oxigénatomot vagy kénatomot tartalmazhatnak, és adott esetben 1-10 szénatomos alkil-, 3-8 szénatomos alkenil-, 3-6 szénatomos alkinil- vagy 3-8 szénatomos cikloalkil-láncokon keresztül az alapváznál össze lehetnek kapcsolva. Ilyen heteroaril-csoport lehet például pirazolil-, imidazolil-, oxazolil-, izooxazolil-, tiazolil-, triazolil-, piridil-, kinolil-, izokinolil-, akridil-, pirimidinil-, piridazinil-, pirazinil-, fenazinil-, purinil- vagy pteridil-csoport. A heteroaril-csoportok heteroatomon vagy különböző szénatomokon keresztül gyűrűbe vagy gyűrűrendszerbe kapcsolódhatnak, vagy szubsztituenseken keresztül az alapvázhoz kapcsolódhatnak. Előnyösen alkalmazott csoport a piridil-, imidazolil-, pirimidinil-, purinil-,

pirazinil- vagy kinolil-csoport.

Az említett R^1, R^2 vagy R^3-csoport szubsztituense lehet például egy vagy több szubsztituens az alábbiak közül: halogénatom, például fluoratom, klóratom vagy brómatom, tio-, nitro-, amino-, hidroxi-, alkil-, alkoxi-, alkenil-, alkenil-oxi-, alkinil-csoport vagy további aromás vagy további telített vagy telítetlen, nem aromás, kérdéses gyűrű vagy gyűrűrendszer. Előnyösen alkalmazhatók alkilcsoportok, például 1-6 szénatomos alkilcsoportok, például metil-, etil-, propil- vagy butil-csoport, arilcsoport, például fenilcsoport, halogénatom, például klóratom, fluoratom vagy brómatom, hidroxi- vagy amino-csoport.

R^4 jelentése az $-OR^4$ vagy $-NR^4R^5$ általános képletű csoportokban hidrogénatom, szubsztituált vagy szubsztituálatlan, elágazó vagy egyenes láncú, 1-10 szénatomos alkilcsoport, 2-10 szénatomos alkenilcsoport, 1-10 szénatomos alkil-karbonil-csoport, 2-10 szénatomos alkenil-karbonil-csoport, arilcsoport, aril-karbonil--csoport, heteroaril- vagy heteroaril-karbonil-csoport.

Alkilcsoport lehet szubsztituált vagy szubsztituálatlan, elágazó vagy egyenes láncú, 1-10 szénatomos alkilcsoport, például metil-, etil-, propil-, izopropil-, butil-, 1-metil-propil-, 2--metil-propil-, terc-butil-, pentil-, 1-metil-butil-, 2-metil--butil-, 3-metil-butil-, 2,2-dimetil-propil-, 1-etil-propil-, hexil-, 1,1-dimetil-propil-, 1,2-dimetil-propil-, 1-metil-pentil-, 2-metil-pentil-, 3-metil-pentil-, 4-metil-pentil-, 1,1-dimetil--butil-, 1,2-dimetil-butil-, 1,3-dimetil-butil-, 2,2-dimetil-butil-, 2,3-dimetil-butil-, 3,3-dimetil-butil-, 1-etil-butil-, 2-etil--butil-, 1,1,2-trimetil-propil-, 1,2,2-trimetil-propil-, 1-etil-

-1-metil-propil-, 1-etil-2-metil-propil-, heptil-, oktil-, nonil- vagy decil-csoport. Előnyösen alkalmazott csoport a metil-, etil-, propil-, butil-, izopropil- vagy izobutil-csoport.

Alkenilcsoport lehet elágazó vagy egyenes láncú, 2-10 szénatomos alkenilcsoport, például vinil-, propenil-, 1-butenil-, 2--butenil-, 3-butenil-, 2-metil-propenil-, 1-pentenil-, 2-pentenil-, 3-pentenil-, 4-pentenil-, 1-metil-1-butenil-, 2-metil-1-butenil-, 3-metil-1-butenil-, 1-metil-2-butenil-, 2-metil-2-butenil-, 3--metil-2-butenil-, 1-metil-3-butenil-, 2-metil-3-butenil-, 3-metil--3-butenil-, 1,1-dimetil-2-propenil-, 1,2-dimetil-1-propenil-, 1,2-dimetil-2-propenil-, 1-etil-1-propenil-, 1-etil-2-propenil-, 1-hexenil-, 2-hexenil-, 3-hexenil-, 4-hexenil-, 5-hexenil-, 1--metil-1-pentenil-, 2-metil-1-pentenil-, 3-metil-1-pentenil-, 4--metil-1-pentenil-, 1-metil-2-pentenil-, 2-metil-2-pentenil-, 3--metil-2-pentenil-, 4-metil-2-pentenil-, 1-metil-3-pentenil-, 2--metil-3-pentenil-, 3-metil-3-pentenil-, 4-metil-3-pentenil-, 1--metil-4-pentenil-, 2-metil-4-pentenil-, 3-metil-4-pentenil-, 4--metil-4-pentenil-, 1,1-dimetil-2-butenil-, 1,1-dimetil-3-butenil-, 1,2-dimetil-1-butenil-, 1,2-dimetil-2-butenil-, 1,2-dimetil-3--butenil-, 1,3-dimetil-1-butenil-, 1,3-dimetil-2-butenil-, 1,3--dimetil-3-butenil-, 2,2-dimetil-3-butenil-, 2,3-dimetil-1-butenil-, 2,3-dimetil-2-butenil-, 2,3-dimetil-3-butenil-, 3,3-dimetil-1--butenil-, 3,3-dimetil-2-butenil-, 1-etil-1-butenil-, 1-etil-2--butenil-, 1-etil-3-butenil-, 2-etil-1-butenil-, 2-etil-2-butenil-, 2-etil-3-butenil-, 1,1,2-trimetil-2-propenil-, 1-etil-1-metil-2--propenil-, 1-etil-2-metil-1-propenil-, 1-etil-2-metil-2-propenil-, 1-heptenil-, 2-heptenil-, 3-heptenil-, 4-heptenil-, 5-heptenil-,

6-heptenil-, 1-oktenil-, 2-oktenil-, 3-oktenil-, 4-oktenil-, 5--oktenil-, 6-oktenil-, 7-oktenil-, nonenil- vagy decenil-csoport. Előnyösen alkalmazott csoport a vinil-, propenil-, butenil- vagy pentenil-csoport.

Az alkil-karbonil-csoport lehet szubsztituált vagy szubsztituálatlan, elágazó vagy egyenes láncú, 1-10 szénatomos alkil-karbonil-csoport, például metil-karbonil-, etil-karbonil-, propil-karbonil-, izopropil-karbonil-, butil-karbonil-, 1-metil--propil-karbonil-, 2-metil-propil-karbonil-, terc-butil-karbonil-, pentil-karbonil-, 1-metil-butil-karbonil-, 2-metil-butil-karbonil-, 3-metil-butil-karbonil-, 2,2-dimetil-propil-karbonil-, 1-etil--propil-karbonil-, hexil-karbonil-, 1,1-dimetil-propil-karbonil-, 1,2-dimetil-propil-karbonil-, 1-metil-pentil-karbonil-, 2-metil--pentil-karbonil-, 3-metil-pentil-karbonil-, 4-metil-pentil-karbonil-, 1,1-dimetil-butil-karbonil-, 1,2-dimetil-butil-karbonil-, 1,3-dimetil-butil-karbonil-, 2,2-dimetil-butil-karbonil-, 2,3--dimetil-butil-karbonil-, 3,3-dimetil-butil-karbonil-, 1-etil--butil-karbonil-, 2-etil-butil-karbonil-, 1,1,2-trimetil-propil--karbonil-, 1,2,2-trimetil-propil-karbonil-, 1-etil-1-metil-propil--karbonil-, 1-etil-2-metil-propil-karbonil-, heptil-karbonil-, oktil-karbonil-, nonil-karbonil- vagy decil-karbonil-csoport. Előnyösen alkalmazott csoport a metil-karbonil- (acetil-), etil--karbonil- (propionil-), propil-karbonil-, butil-karbonil-, izopropil-karbonil- vagy izobutil-karbonil-csoport.

Alkenil-karbonil-csoport lehet elágazó vagy egyenes láncú, 2-10 szénatomos alkenil-karbonil-csoport, például vinil-karbonil-, propenil-karbonil-, 1-butenil-karbonil-, 2-butenil-karbonil-, 3-

-butenil-karbonil-, 2-metil-propenil-karbonil-, 1-pentenil-karbonil-, 2-pentenil-karbonil-, 3-pentenil-karbonil-, 4-pentenil-karbonil-, 1-metil-1-butenil-karbonil-, 2-metil-1-butenil-karbonil-, 3-metil--1-butenil-karbonil-, 1-metil-2-butenil-karbonil-, 2-metil-2--butenil-karbonil-, 3-metil-2-butenil-karbonil-, 1-metil-3-butenil--karbonil-, 2-metil-3-butenil-karbonil-, 3-metil-3-butenil-karbonil-, 1,1-dimetil-2-propenil-karbonil-, 1,2-dimetil-1-propenil-karbonil-, 1,2-dimetil-2-propenil-karbonil-, 1-etil-1-propenil-karbonil-, 1-etil-2-propenil-karbonil-, 1-hexenil-karbonil-, 2-hexenil-karbonil-, 3-hexenil-karbonil-, 4-hexenil-karbonil-, 5-hexenil-karbonil-, 1-metil-1-pentenil-karbonil-, 2-metil-1-pentenil-karbonil-, 3-metil-1-pentenil-karbonil-, 4-metil-1-pentenil-karbonil-, 1-metil-2-pentenil-karbonil-, 2-metil-2-pentenil-karbonil-, 3-metil--2-pentenil-karbonil-, 4-metil-2-pentenil-karbonil-, 1-metil-3--pentenil-karbonil-, 2-metil-3-pentenil-karbonil-, 3-metil-3--pentenil-karbonil-, 4-metil-3-pentenil-karbonil-, 1-metil-4-pentenil-karbonil-, 2-metil-4-pentenil-karbonil-, 3-metil-4-pentenil-karbonil-, 4-metil-4-pentenil-karbonil-, 1,1-dimetil-2-butenil-karbonil-, 1,1-dimetil-3-butenil-karbonil-, 1,2-dimetil-1--butenil-karbonil-, 1,2-dimetil-2-butenil-karbonil-, 1,2-dimetil--3-butenil-karbonil-, 1,3-dimetil-1-butenil-karbonil-, 1,3-dimetil--2-butenil-karbonil-, 1,3-dimetil-3-butenil-karbonil-, 2,2-dimetil--3-butenil-karbonil-, 2,3-dimetil-1-butenil-karbonil-, 2,3-dimetil--2-butenil-karbonil-, 2,3-dimetil-3-butenil-karbonil-, 3,3-dimetil--1-butenil-karbonil-, 3,3-dimetil-2-butenil-karbonil-, 1-etil-1--butenil-karbonil-, 1-etil-2-butenil-karbonil-, 1-etil-3-butenil--karbonil-, 2-etil-1-butenil-karbonil-, 2-etil-2-butenil-karbonil-,

2-etil-3-butenil-karbonil-, 1,1,2-trimetil-2-propenil-karbonil-, 1-etil-1-metil-2-propenil-karbonil-, 1-etil-2-metil-1-propenil--karbonil-, 1-etil-2-metil-2-propenil-karbonil-, 1-heptenil--karbonil-, 2-heptenil-karbonil-, 3-heptenil-karbonil-, 4-heptenil--karbonil-, 5-heptenil-karbonil-, 6-heptenil-karbonil-, 1-oktenil--karbonil-, 2-oktenil-karbonil-, 3-oktenil-karbonil-, 4-oktenil--karbonil-, 5-oktenil-karbonil-, 6-oktenil-karbonil-, 7-oktenil--karbonil-, nonenil-karbonil vagy decenil-karbonil-csoport. Előnyösen alkalmazott csoport a vinil-karbonil-, propenil-karbonil-, butenil-karbonil- vagy pentenil-karbonil-csoport.

Arilcsoportként olyan szubsztituált vagy szubsztituálatlan arilcsoportokat alkalmazunk, amelyek 6-20 szénatomot tartalmaznak gyűrűben vagy gyűrűrendszerben. Egymással kondenzált aromás gyűrűk vagy olyan aromás gyűrűk lehetnek, amelyek alkil-, alkil--karbonil-, alkenil- vagy alkenil-karbonil-láncokon, karbonilcsoporton, oxigén- vagy nitrogénatomon keresztül kapcsolódnak. Arilcsoportok adott esetben 1-10 szénatomos alkil-, 3-8 szénatomos alkenil-, 3-6 szénatomos alkinil- vagy 3-8 szénatomos cikloalkil-láncon keresztül az alapváznál még össze lehetnek kapcsolva. Előnyösen alkalmazott csoport a fenil- vagy naftil-csoport.

Aril-karbonil-csoportként olyan szubsztituált vagy szubsztituálatlan aril-karbonil-csoportokat alkalmazunk, amelyek 6-20 szénatomot tartalmaznak gyűrűben vagy gyűrűrendszerben. Egymással kondenzált aromás gyűrűk vagy olyan aromás gyűrűk lehetnek, amelyek alkil-, alkil-karbonil-, alkenil- vagy alkenil-karbonil--láncokon, karbonilcsoporton, oxigén- vagy nitrogénatomon keresztül kapcsolódnak. Előnyösen alkalmazott csoport fenil-kar-

bonil- (benzoil-) vagy naftil-karbonil-csoport.

Heteroaril-csoportként szubsztituált vagy szubsztituálatlan, egyszerű vagy kondenzált, aromás, 3-7 tagból álló gyűrűket alkalmazunk, amelyek egy vagy több heteroatomot, például nitrogén-, oxigén- vagy kénatomot tartalmazhatnak, és adott esetben 1-10 szénatomos alkil-, 3-8 szénatomos alkenil- vagy 3-8 szénatomos cikloalkil-láncokon keresztül az alapváznál összekapcsolva lehetnek. Ilyen heteroaril-csoport lehet például pirazolil-, imidazolil-, oxazolil-, izooxazolil-, tiazolil-, triazolil-, piridil-, kinolil-, izokinolil-, akridil-, pirimidinil-, piridazinil-, pirazinil-, fenazinil-, purinil- vagy pteridil-csoport. A heteroaril-csoportok heteroatomon vagy különböző szénatomokon keresztül gyűrűbe vagy gyűrűrendszerbe kapcsolódhatnak, vagy szubsztituenseken keresztül az alapvázhoz kapcsolódhatnak. Heteroaril-karbonil-csoportokon olyan heteroaromás csoportokat értünk, amelyek karbonilcsoporton keresztül az alapvázhoz kapcsolódnak. Előnyösen alkalmazott csoport a piridil-, imidazolil-, pirimidinil-, purinil-, pirazinil- vagy kinolil-csoport.

Az említett R^4 csoport szubsztituense lehet például egy vagy több szubsztituens az alábbiak közül: halogénatom, például fluor-, klór- vagy brómatom, tiocsoport, nitro-, amino-, hidroxi-, alkil-, alkoxi-, alkenil-, alkenil-oxi-, alkinil-csoport vagy további aromás vagy további telített vagy telítetlen, nem aromás gyűrű vagy gyűrűrendszer. Előnyösen alkalmazhatók alkilcsoportok, például 1-6 szénatomos alkilcsoportok, például metil-, etil-, propil- vagy butilcsoport, halogénatom, például klór-, fluor- vagy brómatom, hidroxi- vagy aminocsoport.

R^4 jelentése előnyösen hidrogénatom.

R^5 jelentése az $-NR^4R^5$ általános képletű csoportban hidrogénatom, szubsztituált vagy szubsztituálatlan, elágazó vagy egyenes láncú, 1-10 szénatomos alkil-, 2-10 szénatomos alkenil-, aril- vagy heteroaril-csoport, ahol az alkil-, alkenil-, aril- és heteroaril-csoport jelentését lásd fentebb. Előnyösen hidrogénatom vagy 1-10 szénatomos alkil-, például metil-, etil- vagy propil-csoport.

Az említett R^5 csoport szubsztituense lehet például egy vagy több szubsztituens az alábbiak közül: halogénatom, például fluor-, klór- vagy brómatom, tiocsoport, nitro-, amino-, hidroxi-, alkil-, alkoxi-, alkenil-, alkenil-oxi-, alkinil-csoport vagy további aromás vagy további telített vagy telítetlen, nem aromás gyűrű vagy gyűrűrendszer. Előnyösen alkalmazhatók alkilcsoportok, például 1-6 szénatomos alkil-, így metil-, etil-, propil- vagy butil-csoport, arilcsoport, például fenilcsoport, halogénatom, például klór-, fluor- vagy brómatom, hidroxi- vagy aminocsoport.

Továbbá két szomszédos R^4 vagy R^5 együtt kialakíthat egy további szubsztituált vagy szubsztituálatlan, aromás, telített vagy részben telített, 5-6 atomos gyűrűt, amely egy vagy több heteroatomot, például oxigén-, nitrogén- vagy kénatomot tartalmazhat.

R^1, R^2, R^3 szubsztituensek egyikének jelentése az (I) és (II) általános képletben előnyösen aril-, például fenilcsoport. Továbbá R^1, R^2, R^3 szubsztituensek egyikének jelentése az (I) és (II) általános képletben előnyösen hidroxilcsoport és hidrogénatom vagy metilcsoport.

A találmány szerinti eljárást előnyösen 4 és 11 közötti, előnyösebben 4 és 9 közötti pH-nál végezzük.

Az eljárásban továbbá előnyösen 0,01 és 10 tömeg% közötti nitrilt vagy 0,01 és 10 tömeg% közötti, megfelelő aldehidet vagy ketont és 0,01 és 10 tömeg% közötti hidrogén-cianidot alkalmazunk. Az eljárást előnyösen hidrogén-cianid-felesleggel hajtjuk végre. Ez bizonyos körülmények között a beadottnál magasabb hidrogén-cianid-arányhoz vezet. Ami a nitrilt illeti, különböző mennyiségű nitrilt alkalmazhatunk a reakcióban. A legkisebb mennyiségben (= 0,01 és 5 tömeg% közötti mennyiség) alkalmazott nitril (ciánhidrin) előnyösen annyi, amennyi a megfelelő aldehiddel és hidrogén-cianiddal egyensúlyban van. Az aldehid a mikroorganizmusokra vagy enzimre rendszerint toxikus. A nitrileket, amelyek könnyen párologNak, előnyösen szintén 0,01 és 5 tömeg% közötti mennyiségben alkalmazzuk. Magasabb ciánhidrin- illetve nitrilmennyiség késlelteti a reakciót. Az olyan nitrileket, amelyek csak csekély vagy szinte semmilyen oldószer-tulajdonsággal sem rendelkeznek, vagy az olyan nitrileket, amelyek vizes közegben nagyon rosszul oldódnak, előnyösen a fentebb megadott mennyiségnél nagyobb mennyiségben alkalmazzuk. Az átalakult mennyiség és a kitermelés növelése céljából a reakciót úgy végezzük, hogy folyamatosan adagolunk racém nitrileket. A terméket a reakció befejezése után izoláljuk, vagy egy leágaztatott vezetéken folyamatosan eltávolítjuk.

A fentebb említett, megfelelő aldehideken vagy ketonokon olyan vegyületeket értünk, amelyek alkalmazásával az aldehid vagy keton és a hidrogén-cianid közötti reakcióban, adott eset-

ben savkatalízissel, nitril keletkezik. Aldehid és hidrogén--cianid közötti reakció ciánhidrinekhez vezet, amelyeknek az az előnyük, hogy az aldehiddel és a hidrogén-cianiddal egyensúlyban vannak. A ciánhidrinek egyensúlyának beállásával enzimet alkalmazva lehetőség van arra, hogy csak az egyik nitril-enantiomer alakuljon át, ennek ellenére elméletileg 100%-os kitermelést elérve, minthogy a racém nitrilt állandóan pótoljuk. Az összes többi, enzimesen át nem alakítható nitrilt (= "fals" illetve másik enantiomer) előnyösen kémiai reakcióval racemizáljuk, és az eljárás számára újra rendelkezésre áll a 100%-os elméleti kitermelés elérhetőségét biztosítva, az egyensúly tehát beáll, és a sztereocentrum megtartásával lezajlik a kémiai elszappanosítás.

A találmány szerinti eljárást előnyösen 0°C és 80°C közötti, előnyösebben 10 C és 60 C közötti, különösen előnyösen 15 C és 50 C közötti hőmérsékleten végezzük.

A találmány szerinti eljárásban racém nitrileken olyan nitrileket értünk, amelyek mindkét enantiomer 50:50-arányú keverékéből állnak, vagy tetszés szerinti másik keverékből, amelyben a kettő közül bármelyik enantiomerre nézve dúsított a keverék.

A találmány szerint előállított királis karbonsavakon az egyik enantiomerre nézve dúsított karbonsavakat értünk. Az eljárás alkalmazásával előnyösen legalább 90%-os, előnyösebben minimálisan 95%-os, különösen előnyösen minimálisan 98%-os, nagyon különösen előnyösen minimálisan 99%-os enantiomer-tisztaságot érünk el.

A találmány szerinti eljárás lehetővé teszi nagyszámú racém nitril átalakítását királis karbonsavakká. Az eljárásban órán-

ként legalább 25 mmol nitril (mg fehérjére vonatkoztatva), vagy óránként legalább 25 mmol nitril (g mikroorganizmusból származó szárazanyag-tartalomra vonatkoztatva), előnyösen legalább 30 mmol nitril (mg fehérjére vonatkoztatva), vagy óránként legalább 30 mmol nitril (g mikroorganizmusból származó szárazanyag-tartalomra vonatkoztatva), különösen előnyösen 40 mmol nitril (mg fehérjére vonatkoztatva), vagy óránként legalább 40 mmol nitril (g mikroorganizmusból származó szárazanyag-tartalomra vonatkoztatva), nagyon különösen előnyösen 50 mmol nitril (mg fehérjére vonatkoztatva), vagy óránként legalább 50 mmol nitril (g mikroorganizmusból származó szárazanyag-tartalomra vonatkoztatva) képes átalakulni.

A találmány szerinti eljárásban olyan növekvő fázisban levő sejteket lehet alkalmazni, amelyek tartalmazzák a találmány szerinti nukleinsavakat, nukleinsav-konstrukciókat vagy vektorokat. Nyugvó vagy feltárt sejteket is lehet alkalmazni. Feltárt sejteken például olyan sejteket értünk, amelyeket valamilyen kezeléssel, például oldószerekkel való kezeléssel átjárhatóvá tettünk, vagy olyan sejteket, amelyeket enzimes kezeléssel, mechanikai kezeléssel (például French-press vagy ultrahangos kezeléssel) vagy egyéb módszerrel szétroncsoltunk. Az így kapott nyers extraktum előnyösen megfelelő a találmány szerinti eljárásokban. Tisztított enzim is alkalmazható az eljárásban. Szintén megfelelnek immobilizált mikroorganizmusok vagy enzimek, amelyek előnyösen alkalmazhatók a reakcióban.

A találmány szerinti eljárásban előállított királis karbonsavakat előnyösen extrakcióval, vagy kristályosítással, vagy extrak-

cióval és kristályosítással nyerjük ki a reakcióoldatból. Ebből a célból a vizes reakció-oldatot savval, például ásványi savval (például sósavval vagy kénsavval) vagy szerves savval megsavanyítjuk, előnyösen 2 alatti pH-értékre, és azután egy szerves oldószerrel extraháljuk. Az extrakciót a kitermelés növelése céljából többször megismételhetjük. Szerves oldószerként elvileg bármilyen oldószert alkalmazhatunk, amely víztől, adott esetben só hozzáadására elváló fázist képez. Előnyösen alkalmazható oldószer például toluol, benzol, hexán, metil-terc-butil-éter vagy etil-acetát.

A szerves fázis betöményítése után a terméket rendszerint jó kémiai tisztasággal, azaz 90%-nál nagyobb kémiai tisztasággal tudjuk kinyerni. Extrakció után a terméket tartalmazó szerves fázist azonban csak részben tudjuk betöményíteni és a terméket kikristályosítani. Ebből a célból az oldatot előnyösen lehűtjük 0°C és 10°C hőmérséklet közé. A kristályosodás bekövetkezhet közvetlenül a szerves oldatból is. Átkristályosítás céljából a kikristályosított terméket feloldhatjuk mégegyszer ugyanabban vagy egy másik oldószerben, és mégegyszer kristályosíthatjuk. A további, legalább még egyszer végzett kristályosítás az eutektikum állapotától függően tovább növelheti a termék tisztaságát az enantiomerre nézve.

A királis karbonsavak közvetlenül savval való, előnyösen 2 alatti pH-ra savanyítás után kikristályosíthatók a vizes reakcióoldatból. Ebből a célból a vizes oldatot előnyösen melegítés közben betöményítjük, térfogatát a kiindulási 10-90%-ára, előnyösen 20-80%-ára, különösen előnyösen 30-70%-ára csökkentjük. A

kristályosítást előnyösen hűtés közben végezzük. A kristályosításra előnyösen 0 C és 10 C közötti hőmérsékletet alkalmazunk. A költségek szempontjából előnyös a vizes oldatból való közvetlen kikristályosítás. Ugyanakkor előnyös a királis karbonsavak feldolgozása extrakcióval, és adott esetben további kristályosítással.

Ezeket az előnyös feldolgozási módszereket alkalmazva a találmány szerinti eljárással előállított terméket a reakcióba bevitt nitrilre vonatkoztatva 60-100%, előnyösen 80-100%, különösen előnyösen 90-100% kitermeléssel izoláljuk. Az izolált termék nagymértékű, 90%-nál nagyobb, előnyösen 95%-nál nagyobb, különösen előnyösen 98%-nál nagyobb kémiai tisztaságot mutat. Továbbá a termék nagymértékű enantiomer-tisztaságot mutat, ami kristályosítással tovább növelhető.

Az így kapott termékeket szerves szintézisekben kiindulási anyagként lehet alkalmazni gyógyszer vagy agrokémiai vegyszer előállításához vagy racemizáláshoz.

A találmány egy további tárgya egy izolált nukleinsav-szekvencia, amely nitriláz-aktivitással rendelkező polipeptidet kódol, és az valamelyike:

a) az 1. számú szekvenciával (SEQ ID NO: 1) rendelkező nukleinsav-szekvencia,

b) olyan nukleinsav-szekvencia, amelyet a genetikai kód degeneráltsága eredményeként az 1. számú nukleinsav-szekvenciából lehet levezetni,

c) az 1. számú nukleinsav-szekvencia olyan származéka, amely a 2. számú aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptidet kódol, és aminosav-szinten legalább 80%-osan homológ azzal,

anélkül, hogy a polipeptid enzimhatása lényegesen csökkenne.

A találmány szerinti, 1. számú szekvenciával rendelkező nukleinsav-szekvencia homológján például olyan allélvariánsokat értünk, amelyek levezetett aminosav-szinten legalább 95% homológiát, előnyösen legalább 97% homológiát, különösen előnyösen legalább 98%-os homológiát mutatnak a teljes hosszúságú szekvenciát véve. A szekvencia részleteit véve a homológia előnyösen nagyobb is lehet. Az 1. számú szekvenciából levezetett aminosav-szekvencián a 2. számú szekvenciát értjük. Allélvariánsokon különösen olyan funkcionális variánsokat értünk, amelyekhez az 1. számú szekvenciában lévő nukleotidok deléciójával, inszerciójával vagy szubsztitúciójával jutunk, amelyből levezetett, szintetizált fehérje enzimaktivitásának lényegesen nem szabad csökkennie, egy vagy több gén mikroorganizmusba való bevitele esetén. A találmány tárgyát képezik ezáltal olyan aminosav-szekvenciák is, amelyeket a fentebb leírt csoportban lévő nukleinsav-szekvenciák kódolnak. A találmány tárgyát előnyösen olyan aminosav-szekvenciák képezik, amelyeket az 1. számú szekvencia kódol.

Az 1. számú szekvencia homológjain értünk továbbá például gombaeredetű vagy bakteriális homológokat, rövidített szekvenciákat, egyszálú DNS-t, vagy kódoló vagy nem-kódoló DNS-szekvenciának megfelelő RNS-t. Az 1. számú szekvencia homológjai esetén DNS-szinten legalább 60%-os, előnyösen legalább 70%-os, különösen előnyösen legalább 80%-os, nagyon előnyösen legalább 90%-os homológiát értünk az 1. számú szekvenciában megadott teljes DNS-szekvencián.

Ezenkívül az 1. számú szekvencia homológjain értünk származékokat, például promótervariánsokat. Az adott nukleotid-szekvenciától szintézisiránnyal szemben működőképesen kapcsolt promóterek módosítva lehetnek egy vagy több nukleotidcserével, inszercióval (inszerciókkal) és/vagy delécióval (delécciókkal) anélkül, hogy ez a promóterek funkcióját illetve hatékonyságát hátrányosan befolyásolná. A promóterek hatékonyságát növelni is lehet szekvenciájuk módosításával, vagy teljesen helyettesíteni lehet azokat egy hatékonyabb promóterekkel, heterológ szervezetből származó promóterekkel is.

Származékokon olyan variánsokat is értünk, amelyek nukleotid--szekvenciája a start-kódon előtt -1-től -200-ig terjedő szakaszon vagy a stop-kódon utáni 0-tól 1000. bázispárig terjedő szakasza úgy van megváltoztatva, hogy a génexpresszió és/vagy fehérjeexpresszió mértéke megváltozott, előnyösen fokozódott.

Az 1. számú szekvenciát vagy homológjait baktériumokból, előnyösen gram-negatív baktériumokból, különösen előnyösen az Alcaligenes nemzetséghez tartozó baktériumokból, nagyon különösen előnyösen Alcaligenes nemzetségből és Alcaligenes faecalis fajból lehet izolálni a szakember által ismert módszerek alkalmazásával.

Az 1. számú szekvenciát vagy homológjait, vagy ezen szekvenciák részleteit például szokásos hibridizációs eljárás vagy PCR--technika alkalmazásával, más gombákból vagy baktériumokból lehet izolálni. Ezek a DNS-szekvenciák standard hibridizációs körülmények között képesek hibridizálódni a találmány szerinti szekvenciákkal. Hibridizálásra előnyösen rövid, olyan konzerva-

tív részletből, például az aktív centrumból származó oligonukleotidot alkalmazunk, amely más nitrilázokkal vagy nitril-hidratázokkal való összehasonlítás útján, szakember által ismert módon lehet meghatározni. A találmány szerinti nukleinsavak hosszabb fragmentumait vagy teljes szekvenciákat is lehet hibridizálásra alkalmazni. Aszerint, hogy milyen nukleinsav-oligonukleotidot alkalmazunk, hosszabb fragmentumokat vagy teljes szekvenciát, vagy milyen nukleinsav-típust, DNS-t vagy RNS-t alkalmazunk hibridizálásra, lehet variálni ezeket a standard körülményeket. Például az olvadáspont DNS-DSN-hibridre körülbelül 10°C-al alacsonyabb, mint ugyanilyen hosszúságú DNS-RNS-hibridre.

Standard körülményeken értünk például nukleinsavtól függően 42°C és 58°C közötti hőmérsékletet vizes puffer-oldatban, 0,1-5 x SSC (1 X SSC: 0,15 M NaCl, 15 mM nátrium-citrát, pH 7,2) koncentrációban, vagy még 50% formamid jelenlétében, 42°C-ot 5 x SSC-ben, 50% formamidban. A hibridizációs körülmények DNS-DNS--hibridre előnyösen 0,1 x SSC és körülbelül 20°C és 45°C közötti, előnyösen körülbelül 30°C és 45°C közötti hőmérséklet. A hibridizációs körülmények DNS-RNS-hibridre előnyösen 0,1 x SSC és körülbelül 30°C és 55°C közötti, előnyösen körülbelül 45°C és 55°C közötti hőmérséklet. A hibridizációra fentebb megadott hőmérsékletek egy konkrét példában számított olvadáspontok, amelyek körülbelül 100 nukleotid hosszúságú és 50%-os G+C-tartalommal rendelkező nukleinsavra vonatkoznak. DNS-hibridizálásban alkalmazható kísérleti körülményeket leírnak ide vonatkozó genetikai tankönyvekben, például Sambrook és munkatársai "Molecular Cloning" című könyvében (Cold Spring Harbor Laboratory Press,

1989), amelyben szakember által ismert képletek alkalmazásával kiszámítható például a nukleinsav hosszúságától, a hibrid fajtájától vagy a G+C-tartalomtól való függés. Szakember további, hibridizációval kapcsolatos információt találhat az alábbi tankönyvekben: Ausubel és munkatársai (szerk.), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, New York (1994); Hames and Higgins (szerk.), „Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press (1985), Oxford; Brown (szerk.), „Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press (1991), Oxford.

A találmány szerinti nukleinsav-konstrukciókon 1. számú szekvenciával rendelkező nitriláz-gént és homológjait értjük, amelyek előnyösen egy vagy több szabályzó szignállal vannak összekapcsolva az génexpresszió fokozása céljából. Ilyen szabályzó szekvenciákon értünk például olyan szekvenciákat, amelyek induktorhoz vagy represszorhoz képesek kötődni, így szabályozni képesek a nukleinsav expresszióját. Az új szabályzó szekvenciákon kívül még természetes szabályzó szekvenciák is jelen lehetnek az aktuális strukturális gének előtt úgy, hogy a természetes szabályzást, adott esetben genetikai módosítással le lehet kapcsolni, és a gének expressziójának mértéke növekszik. Azonban a génkonstrukciók rendelkezhetnek egyszerűbb struktúrával, azaz hozzáadott szabályzó szignálok nincsenek inszertálva az 1. számú szekvencia vagy homológjai elé, és a természetes promóter, szabályzó funkciójával nincs eltávolítva. Helyette, a természetes szabályzó szekvencia úgy van mutálva, hogy a szabályzás tovább

már nem működik, és a génexpresszió fokozódik. A génkonstrukciók előnyösen továbbá tartalmazhatnak egy vagy több, úgynevezett „enhanszerszekvenciát" funkcionálisan a promóterhez kapcsolva, amely lehetővé teszi a nukleinsav-szekvencia fokozott mértékű expresszióját. További előnyös szekvenciák, például más szabályzó elemek vagy terminátorok inszertálására is van lehetőség a DNS-szekvenciák 3'-végéhez. A találmány szerinti nukleinsavak egy vagy több kópiában lehetnek jelen a konstrukcióban. A konstrukcióban további markerek lehetnek, például antibiotikum-rezisztenciát meghatározó vagy auxotrófiát komplementáló gén, adott esetben a konstrukció szelektálása céljából.

A találmány szerinti eljárásban előnyösen alkalmazható szabályzó szekvenciák vannak például az alábbi promóterekben: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ-PR-promóterekben vagy λ-PL-promóterben, amelyek előnyösen alkalmazhatók gram-negatív baktériumokban. További előnyös szabályzó szekvenciák vannak például gram-pozitív, amy- és SP02-promóterekben, élesztő eredetű ADC1-, MFα-, AC-, P-60-, CYC1-, GAPDH-, TEF-, rp28-, ADH-promóterekben. Ebben az összefüggésben előnyös még piruvát karboxiláz és például Hansenula-ból származó metanol oxidáz promótere. Mesterséges promótereket is lehet szabályzásra alkalmazni.

A nukleinsav-konstrukciót gazdaszervezetben való expresszió céljából vektorba, előnyösen plazmidba, fágba vagy egyéb DNS-be inszertáljuk, amely lehetővé teszi a gén optimális expresszióját gazdaszervezetben. Ezek a vektorok a találmány egy további előnyös megvalósítási módját jelentik. Alkalmas plazmid például E.

coli-ban pEGFP, pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III^{113}-B1, λgt11 vagy pBdCI, Streptomycesben pIJ101, pIJ364, pIJ702 vagy pIJ361, Bacillusban pUB110, pC194 vagy pBD214, Corynebacteriumban pSA77 vagy pAJ667, gombákban pALS1, pIL2 vagy pBB116, 2 μ m élesztőkben pAG-1, Yep6, Yep13 vagy pEMBLYe23, vagy növényekben pLGV23, pGHlac^{+}, pBIN19, pAC2004 vagy pDH51. Az említett plazmidok csak egy kis választékát jelentik a lehetséges plazmidoknak. További plazmidok jól ismertek szakember számára, és leírásuk megtalálható például a fentebb említett, „Cloning Vectors" című könyvben (szerk. Pouwels P. H. et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018).

A nukleinsav-konstrukció további, beépített gének expresszálása céljából előnyösen járulékos 3' - és/vagy 5' -terminális szabályzó szekvenciákat tartalmaz az expresszió fokozása céljából, amelyeket optimális expresszióhoz a kiválasztott gazdaszervezettől és géntől vagy génektől függően szelektálunk.

Ezeket a szabályzó szekvenciákat azért alkalmazzuk, hogy lehetővé tegyük a gén célzott expresszióját és a fehérje-expressziót. Ez jelentheti például a gazdaszervezettől függően, hogy a gén csak indukció után expresszálódik vagy fokozott mértékben expresszálódik (a termék túltermelődik), vagy azt, hogy azonnal expresszálódik és/vagy fokozott mértékben expresszálódik.

A szabályzó szekvenciák illetve faktorok ezenkívül, előnyösen jótékony hatást képesek kifejteni a bevitt gén expressziójára, és így képesek annak mértékét növelni vagy csökkenteni. Tehát a szabályzó elemek fokozó hatása előnyösen transzkripció szintjén

történhet meg, erős transzkripciós szignálok, például promóterek és/vagy „enhanszerek" alkalmazásával. Azonban lehetőség van a transzláció fokozására is, például a mRNS stabilitásának javításával.

A találmány másik előnyös megvalósítási módja szerint, a vektorok vonatkozásában, a találmány szerinti nukleinsav-konstrukciót vagy a találmány szerinti nukleinsavat tartalmazó vektort előnyösen bevihetjük lineáris DNS formájában a mikroorganizmusokba, és heterológ vagy homológ rekombinációval integrálhatjuk a gazdaszervezet genomjába. Ez a lineáris DNS állhat linearizált vektorból, például plazmidból, vagy csak a nukleinsav-konstrukcióból vagy nukleinsavból.

Heterológ génnek egy organizmusban való, optimális expresszálása céljából előnyös megváltoztatni a nukleinsav-szekvenciákat olyanra, amely megfelel az organizmus által alkalmazott, specifikus „kódonhasználatnak". A „kódonhasználat" könnyen meghatározható az illető organizmus más, ismert génjének számítógépes kiértékelésének segítségével.

A találmány szerinti nukleinsavnak vagy nukleinsav-konstrukciónak megfelelő gazdaszervezet lehet elvileg minden prokarióta és eukarióta organizmus. Gazdaszervezetként előnyösen alkalmazott mikroorganizmusok például baktériumok, gombák vagy élesztők. Előnyösen gram-pozitív vagy gram-negatív baktériumokat, elsősorban Enterobacteriaceae vagy Nocardiaceae családhoz tartozó, különösen Escherichia, Pseudomonas vagy Rhodococcus nemzetséghez tartozó baktériumokat alkalmazunk. Különösen előnyösen alkalmazott nemzetség és faj az Escherichia coli.

A találmány szerinti gazdaszervezet előnyösen legalább egy, fehérjeszerű ágenst tartalmaz a szintetizált polipeptid, és különösen a találmány szerinti nukleinsav-szekvenciák által kódolt, nitriláz-akitivitással rendelkező polipeptid konformációjának kialakítása céljából, és/vagy ezt az ágenst kódoló géneket tartalmaz, ahol az ágens akkora mennyiségben áll rendelkezésre, amely több, mint az illető mikroorganizmusban lévő alapmennyiség. Az ágenst kódoló gének kromoszómában vagy extrakromoszómális elemekben, például plazmidokban találhatók.

1. példa

Nitriláz tisztítása Alcaligenes faecalis 1650-ből

1. Sejtek előállítása

Alcaligenes faecalis 1650-törzset 30 C-on 8 óra hosszáig A-tápközegben tenyésztettünk.

A-tápközeg:

Élesztőkivonat	5	g/l
Pepton	3,5	g/l
$CH_3CO_2NH_4$	5	g/l
KH_2PO_4	5	g/l
$MgSO_4$	0,2	g/l
$FeSO_4$	0,03	g/l
NaCl	1	g/l
Butironitril	1	g/l

Ezzel az előrázott tenyészettel beoltottunk 8 liter friss A-tápközeget, egy 10 literes fermentorba. A pH-t 7,2-n, a hőmérsékletet 30°C-on, a levegőztetés sebességét 300 l/órán és a fordulatszámot 300 rpm-en tartjuk. 22 óra múlva 81 g nedves sejt-

masszát nyertünk ki. A megfelelő száraz sejttömeg 3,8 g/l volt, és az optikai sűrűség 600 nm-en 8 volt.

2. Enzimaktivitás meghatározása α-hidroxi-fenil-acetonitrillel (mandulasavnitril)szemben

A sejteket az 1. pontban leírtak szerint állítottuk elő, és 10 mM Na/K-foszfát-pufferben (pH 7,2), kétszer mostuk azokat. 40 mg száraz sejtet felszuszpendáltunk 20 ml, 10 mM Na/K-foszfát--pufferben (pH 6,8), és a reakciót 8,3 mM α-hidroxi-fenil--acetonitril hozzáadásával elindítottuk. A reakciót 40°C-on, rázatás közben végeztük. A racemizáció kinetikáját mintavétel, azután sejtek elkülönítése után nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (ODS Hypersil) segítségével követtük. Meghatároztuk a α-hidroxi-fenil-acetonitril, benzaldehid, mandulasavamid és mandulasav mennyiségét. Az eredményeket bemutatjuk az 1. ábrán (α--hidroxi-fenil-acetonitril átalakulása mandulasavvá, "batch"). A mandulasav keletkezési sebessége 41,3 U/g száraz sejttömegre vonatkoztatva, 30%-os átalakulásnál, ahol az 1 egységet úgy definiáljuk, mint amely 1 μmol mandulasavat képes előállítani 1 perc alatt, 40°C-on.

3. Enzim-szelektivitás meghatározása α-hidroxi-fenil-acetonitrillel szemben

A sejteket az 1. pontban leírtak szerint állítottuk elő, és 10 mM Na/K-foszfát-pufferben (pH 7,2), kétszer mostuk azokat. 40 mg száraz sejtet felszuszpendáltunk 20 ml, 10 mM Na/K-foszfát--pufferben (pH 6,8), és a reakciót 8,3 mM α-hidroxi-fenil-acetonitril hozzáadásával elindítottuk. A reakciót 30°C-on, rázatás közben végeztük. A racemizáció kinetikáját mintavétel, azután sejt elkülönítése után nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

(Nucleodex β-PM) segítségével követtük. Ebben meghatároztuk az S-(+)- és R-(-)-mandulasavat. A keletkezett R-(-)-mandulasav (ee_{R-MS}) optikai tisztasága 98%-os volt, 50%-os átalakulásnál. Az enzim szelektivitása (=E) 50%-os átalakulásnál 499 volt.

4. Tisztítás

A tisztításban alkalmazott valamennyi puffer, hacsak másképpen nem említjük, 10 mM DTT-t tartalmazott.

1. lépés: Sejtfeltárás

Az 1. példában leírt, 10 literes fermentációból kinyert sejteket lecentrifugáltuk, és kétszer mostuk 1 liter 0,1 M Tris/HCl-pufferrel (pH 7,2). A kitermelés körülbelül 162 g nedves sejtmassza volt. 81 g nedves sejtmasszát felszuszpendáltunk 160 ml 0,1 M Tris/HCl-pufferben (pH 7,2), és négyszer feltártuk Menton-Gaulin-féle homogenizátorban, 750 bar nyomás alkalmazásával. A homogenizátumot azután 30 percig, 30.000 g-n centrifugáltuk, és az üledéket eldobtuk. A megmaradt rész (140 ml) a kiindulási rész aktivitásának 73%-át tartalmazta, az 1. táblázatban bemutatottak szerint.

2. lépés: Ioncserélő kromatográfia

A megmaradt részt A-pufferrel (20 mM Tris/HCl, pH 8,5) 400 ml-re hígítottuk, és még egyszer lecentrifugáltuk 23.000 g-n, 20 percig. Azután 350 ml-t felvittünk Q-Sepharose-oszlopra (átmérő 5 cm, magasság 22 cm, térfogat 432 ml, Q-Sepharose Fast Flow a Pharmacia cégtől) A-pufferben. Azután 20 ml/perc áramlási sebességgel, 10% B-pufferrel (ugyanaz, mint az A-puffer, de 1 M NaCl-t tartalmaz) mostuk (a felvitt és mosótérfogat összesen 1,5 l). Az elúciós folyadékban 90 perc alatt lineárisan megnövekedett 100%-ra a B-puffer mennyisége. Azután a 91-120. percben

100% B-pufferrel mostuk. 100 db, 40 ml-es frakciót szedtünk. A nitriláz az 50 és a 60. frakció között eluálódott. A frakciókat egyesítettük, és 10 kDa molekulatömegnél kizáró membrán (Amicon) alkalmazásával, ultraszűréssel 10 ml térfogatra töményítettük.

3. lépés: Molekulaszűrésen alapuló kromatográfia

Az ioncserélő kromatográfiából származó koncentrátumot (2. lépés) két lépésben, egyenként 5-5 ml-t, felvittük molekulaszűrésen alapuló kromatográfiás oszlopra (Superdex 200 perp. grade, Pharmacia, elválasztási tartomány 10 és 600 kDa között, 2,6 cm átmérő, 60 cm magasság, 325 ml térfogat) további tisztítás céljából. A detektálást 280 nm-en végeztük. Az oszlopot 20 mM foszfát-puffert (pH 7,4), 5 mM DTT-t és 150 mM NaCl-t tartalmazó oldattal ekvilibráltuk, és 1,5 ml/perc áramlási sebességet alkalmaztunk. 40 frakciót szedtünk. Nitrilt elszappanosító aktivitást a 3-5. frakciókban találtunk.

4. lépés: Ioncserélő kromatográfia

A molekulaszűrésen alapuló kromatográfiából származó, egyesített frakciókat (3. lépés) Mono Q oszlopot (oszloptérfogat 1 ml, Mono Q HR 5/5, Pharmacia) alkalmazó, ioncserélő kromatográfiára, további tisztítás céljából. A-pufferként szolgált: 20 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM DTT, B-pufferként szolgált ugyanez a puffer, azaz A-puffer + 1 M NaCl. Az áramlási sebesség 1 ml/perc volt. A molekulaszűrésen alapuló kromatográfiából származó, körülbelül 6 mS/cm vezetőképességre hígított, aktivitást tartalmazó frakciókat (körülbelül 100 ml) közvetlenül felvittük a Mono Q oszlopra, és így a fehérjék adszorbeálódtak. A felvitel után az oszlopot 5% B-puffert tartalmazó oldattal mostuk. Az oszlopot 30 perc alatt eluáltuk, 5%-tól 40% B-t tartalmazó gradienssel, majd

100% b-vel mostuk 10 percig. A nitriláz a gradiens 17. és 18. frakciójában eluálódott.

A tisztítás 1-4. lépéseit az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat: A tisztítási eljárás vázlata

Próba	Térf. (ml)	Aktivitás (U/l)	Összes aktivitás (mU)	Kiterm. (%)	Fehérje (mg/ml)	Össz. fehérje(mg)	Spec. akt. (U/g)
Feltárás előtt	160	480	76800	100	-	-	-
Feltárás után	140	400	56000	72,9	-	-	-
Q-Sepharose							
Felvitt	140	192	26880	35	12,4	1736	15
WF	400	77	30800	40,1	0,26	104	296
Superdex 200							
Felvitt	9,5	>378	>3591	4,7	2,41	22,90	>157
WF	43	59	2537	3,3	0,21	9,03	281
Mono Q							
Felvitt	100	4,8	480	0,6	0,06	6,33	76
WF	4	>77	308	0,4	0,19	0,76	>405

A molekulaszűrésen alapuló kromatográfiából (3. lépés) és a MonoQ ioncserélő kromatográfiából (4. lépés) származó, aktivitást tartalmazó frakciókat (az I. táblázatban WF-ként jelöltük) SDS-PAGE alkalmazásával vizsgáltuk, melyeket a 2. ábrán bemutatunk.

5. lépés: Fordított fázisú (RP), nagynyomású folyadékkromatográfia

A MonoQ ioncserélő kromatográfiából (4. lépés) származó, ak-

tivitást tartalmazó frakciókat (17. és 18. frakció) fordított fázisú kromatográfiával homogenitásra vizsgáltunk, és tovább tisztítottuk tripszines hasításra való előkészítés céljából. Az elválasztáshoz Abimed-oszlopot (3 cm) felszereltünk egy Hewlett-Packard készülékre (HP 1090). Mozgó fázisként szolgáltak az alábbi pufferek: A-puffer: víz 0,1% TFA-val, és B-puffer: aceto-nitril 0,1% TFA-val. Injektált térfogat 0,1 ml, az áramlási sebesség 0,5 ml/perc volt. Az elúciós gradiens lefutása az alábbi volt:

Perc	% A-puffer	% B-puffer
0	80	20
2	80	20
22	30	70
22,1	0	100
24	0	100
25	100	0
30	100	0

A nitriláz a 12. és 13. perc között eluálódott. Ez SDS-PAGE-ban megfelelt egy 37 kDa méretű csíknak. Ezt a csíkot szekvenáltuk. Applied Biosystems cégtől beszerzett, „494 Procise Protein Sequenzer" szekvenálót alkalmaztunk. Az így kapott, 39 aminosavból álló N-terminális szekvenciát a továbbiakban 3. számú szekvenciaként jelöljük (SEQ ID NO: 3). A szekvenciát a mellékelt szekvencialistában közöljük, amely az alábbi: Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys thr Ile Glu Leu Ala Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly.

Triptikus peptidek előállítása

Mono Q kromatográfiából (4. lépés) származó mintát az alábbiak szerint kezeltünk: a fehérjét (körülbelül 0,6 mg) 12,5%-os TCA-val kicsaptuk, és az üledéket háromszor mostuk 1 ml dietil-éter/etanol 1:1 arányú elegyével. Az üledéket feloldottuk 0,2 ml, 6 M guanidin-HCl-t és 25 mM Tris/HCl-t tartalmazó pufferben (pH 8,5). Ehhez az oldathoz hozzáadtunk 2,6 µl, 1 M DTT-oldatot a diszulfid-hidak redukálása céljából. A mintát 1 óra hosszáig, sötétben rázattuk. Azután a fehérjét 1,5 µl 4-vinil-piridin-oldattal (35%-os), 2 óra hosszáig, sötétben reagáltattuk. A reakciót úgy állítottuk le, hogy 1 óra hosszáig inkubáltuk 2,6 µl, 1 M DTT-oldattal. A vinil-piridinnel kezelt enzimet fordított fázisú HPLC-n tisztítottuk a fentebb leírtak szerint. A retenciós idő ebben az esetben 10 és 11 perc között volt. Az aktivitást tartalmazó frakciót molekulatömege alapján azonosítottuk, szedtük és 0,02 ml-re betöményítettük. Ehhez hozzáadtunk 0,01 ml acetonitrilt és 0,1 M Tris/HCl-ot (pH 8,5) tartalmazó puffert, 0,2 ml-re kiegészítve. A pH-értékek korrigálása céljából még hozzáadtunk körülbelül 0,05 ml, 0,1 M NaOH-oldatot. A mintát (0,3 mg becsült fehérjemennyiség) összekevertük 0,032 ml, 1 mg/ml-es tripszin-oldattal, 0,1 M Tris/HCl-t (pH 8,5) és 5% acetonitrilt tartalmazó pufferben, és egy éjszakán át inkubáltuk 37°C-on. Az emésztést 0,01 ml ecetsavval állítottuk le, és azután lecentrifugáltuk. A felülúszót fordított fázisú HPLC-n, C18-oszlopon elválasztottuk. (Mozgófázis: A-puffer: víz 0,1% TFA-val, és B-puffer: acetonitril 0,1% TFA-val.) A peptideket (detektálás 205 nm-en és 280 nm-en) gyűjtöttük és szekvenáltuk. Applied

Biosystems cégtől beszerzett, „494 Procise Protein Sequenzer" szekvenálót alkalmaztunk. Az így kapott, 21 aminosavból álló, belső szekvenciát a továbbiakban 4. számú szekvenciaként jelöljük (SEQ ID NO: 4), és egy 11 aminosavból álló, belső szekvenciát a továbbiakban 5. számú szekvenciaként jelöljük (SEQ ID NO: 5). A szekvenciákat a mellékelt szekvencialistában közöljük, amelyek az alábbiak:

4. számú szekvencia:

Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile Ala Ser Val Ala Ile Ser His Pro Gln

5. számú szekvencia:

Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys

6. Tisztított nitriláz aktivitása α-hidroxi-fenil-aceto-nitrillel szemben

A tisztított nitriláz aktivitását α-hidroxi-fenil-acetonitrillel szemben a 2. példában leírtak szerint határoztuk meg. A tisztított fehérjék specifikus aktivitása α-hidroxi-fenil-acetonitrillel szemben körülbelül 12380 U/mg fehérje volt.

2. példa

Alcaligenes faecalis 1650-ből származó nitriláz klónozása

Az 1. példában bemutatott, 3. számú és 4. számú peptidszekvenciából levezettünk nukleotidszondákat és megszintetizáltuk azokat. A 3. számú, N-terminális peptidszekvenciából levezetett nukleotidszonda 23 tagú volt, 64-szeresen degenerált (a nukleotidszondában „A, C, G vagy T" N-re; „A vagy G" R-re; „C vagy G" S-re lett cserélve). Mivel az irodalomban, Alcaligenes tör-

zsekre leírt [Wada et al., Nucl. Acids Res. 20, 2111-2118 (1992)] szekvenciákban GC aránya magas, glutaminok és izoleucinok esetén a kódonok harmadik helyére a választás adott volt. A nukleotidszonda, melyet a továbbiakban 6. számú szekvenciaként (SEQ ID NO: 6) jelölünk, meghatározta az alábbi 5′-végi primert, ahol S = C vagy G, és N = A, C, G vagy T.

6. számú szekvencia:

5′-ATGCAGACNAGNAARATCGTSCG-3′

A 4. számú, belső peptidszekvenciából levezetett nukleotidszonda 20 tagú volt, 256-szeresen degenerált (a nukleotidszondában „A, C, G vagy T" N-re; „A vagy G" R-re; „C vagy G" S-re lett cserélve). Alcaligenes törzsekre leírt szekvenciákban GC aránya magas, lizinek esetén a kódonok harmadik helyére a választás adott volt. Ez a nukleotidszonda, melyet a továbbiakban 7. számú szekvenciaként (SEQ ID NO: 7) jelölünk, meghatározta az alábbi 3′-végi primert. A szekvenciát a mellékelt szekvencialistában közöljük, amely az alábbi:

7. számú szekvencia:

5′-TNGCSACNGANGCRATCTTG-3′

A 6. és 7. számú szekvenciával rendelkező, primer-párok segítségével PCR-t végeztünk Acaligenes faecalis 1650-ből származó kromoszómális DNS-en. Kromoszómális DNS-t lizozim- és proteináz-K-kezeléssel elért sejtlízis után izolálnuk, Fachmann klasszikus módszerét követve [Ausubel, F. M. et al., "Current Protocols in molecular biology", John Wiley and Sons (1994)].

Pwo-polimeráz alkalmazásával végzett PCR az alábbi lépésekből állt: denaturálás 3 percig, 95°C-on; 35 ciklus denaturálás 1 per-

cig, 95°C-on, primer-hibridizálás 1 perc 30 másodpercig 58°C-on és polimerizálás 1 perc 30 másodpercig 72°C-on; és záró polimerizálás 5 percig, 72°C-on.

Ilyen körülmények között Acaligenes faecalis 1650-ből származó kromoszómális DNS-ből körülbelül 1 kb méretű fragmentum amplifikálódott. A PCR-termék klónozása céljából a már említett primereket megtoldottuk egy XbaI-hasítóhellyel és két további nukleotiddal (5'-AATCTAGA illetve 5'-ATTCTAGA), és a PCR-reakciót a fenti körülmények alkalmazásával megismételtük. Újra egy körülbelül 1 kb méretű fragmentum amplifikálódott, amit tisztítás és XbaI-enzimes emésztés után ugyanígy emésztett pUC18-ba ligáltunk. E. coli JM109 transzformálása és az eredményül kapott plazmid izolálása után a DNS összetételét szekvenálással és azt követően genomi Southern-blot alkalmazásával igazoltuk. A teljes nitriláz-gén (nit) izolálására szolgáló molekuláris biológiai és mikrobiológiai módszereket Fachmann ismert, klasszikus módszerei szerint végeztük. A teljes nitriláz-szekvenciát bemutatjuk 1. számú szekvenciaként.

3. példa

Homológia más fehérjékkel, homológ szekvenciák azonosítása

SWISSPROT fehérje-adatbázisból származó szekvenciákkal való összehasonlításban kimutattuk, hogy a találmány szerinti nitriláz-gén aminosav-szinten 11-96%-os homológiát mutat ismert nitrilázokkal. A legnagyobb mértékű szekvencia-homológiát Alcaligenes faecalis JM3 törzsből származó, aril-acetonitril-specifikus nitriláz [Nagasawa et al., Eur. J. Biochem. 194,

765-772 (1990)] esetén találtuk. A két nitriláz-gén 93,2%-os azonosságot mutatott nukleotid-szinten, 1071 bp hosszúságú szakaszon. A levezetett aminosav-szekvencia 96,1%-os azonosságot mutatott 356 aminosav hosszúságú szakaszon. A legkisebb mértékű, 11,4%-os homológiát Rhodococcus erythropolis SK92 (EP-A-0 719 862 számú szabadalmi irat) törzsből származó nitrilázra találtuk, 534 amninosav hosszúságú szakaszon.

4. példa

Nitriláz heterológ expressziója E. coliban

A pJOE2702-jelű expressziós vektorba való klónozás céljából amplifikáltuk a nit-gént. Ehhez 5′-primerként PCR céljára kiválasztottuk a 3. számú szekvenciát, amelyben az 5′-nit-véghez a transzlációs starthellyel átfedő NdeI-hasítóhelyet kapcsoltunk. Ezt a primert a továbbiakban 8. számú szekvenciának (SEQ ID NO: 8) jelöltük, és a mellékelt szekvencialistában közöljük. 3′-primerként egy 24-tagú szakaszt választottunk a nit-gén 3′-végéről, amelyhez BanHI-hasítóhelyekkel szegélyezett stop-kódont kapcsoltunk. Ezt a továbbiakban 9. számú szekvenciának jelöljük (SEQ ID NO: 9), és a mellékelt szekvencialistában közöljük.

5′-TTAATCATATGCAGACAAGAAAAATCGTCCG-3′ (8. számú szekvencia)

5′-AAGGATCCTCAAGACGGCTCTTGCACTAGCAG-3′ (9. számú szekvencia)

Pwo-polimeráz alkalmazásával végzett PCR az alábbi lépésekből állt: denaturálás 3 percig, 94°C-on; 25 ciklus denaturálás 1 percig, 93°C-on, primer-hibridizálás 1 perc 30 másodpercig 55°C-on és polimerizálás 1 perc 30 másodpercig 72°C-on; és záró polimerizálás 5 percig, 72°C-on. A PCR-fragmentumot tisztítottuk,

NdeI/BamHI-enzimekkel emésztettük, és ugyanígy emésztett pJOE2702-vektorba integráltuk [Volff et al., Mol. Microbiol. 21, 1037-1047 (1996)]. Az eredményül kapott plazmid jelölése pDHE19.2, és bemutatjuk a 3. ábrán. NdeI/BamHI-hasítóhelyek felhasználásával a pDHE19.2-plazmidba integrált nit-gén a pJOE2702 által tartalmazott rha_p-promóter transzkripciós szabályzása alatt áll, amely az E. coliban lévő, pozitívan szabályzott rhaBAD L-ramnóz-operonból származik [Egan és Schleif, J. Mol. Biol. 243, 821-829 (1994)]. A nit-gén traszkripciójának terminálása és a transzláció iniciálása szintén vektorszekvenciákon keresztül zajlik le. Emellett a plazmidba még egy gén, Ap^R-jelű ampicillin-rezisztenciagén van beépítve.

Nitriláz heterológ expresszióját a pDHE19.2-plazmidot tartalmazó, E. coli JM109-ben mutattuk ki. Ebből a célból a JM109 (pDHE19.2) törzset 100 µg/ml ampicillint tartalmazó TB-tápközegben [Tartof, Hobbs (1987)], 37°C-on, rázatva növesztettük. Amikor az OD_{600} elérte az 1,7 értéket, a tenyészetet 1:200 arányban átoltottuk friss TB-tápközegbe, amely a nitriláz indukciója céljából 0,2 tömeg% L-ramnózt tartalmazott, és rázatás közben, 30°C-on növesztettük. Nyolc óra hossza múlva a sejteket elkülönítettük, 10 mM Na/K-foszfát-pufferrel (pH 7,2) mostuk, ugyanebben a pufferben felszuszpendáltuk OD_{600}=10-re, és ultrahangos kezeléssel feltártuk.

5. példa

Rekombináns E. coli JM109-törzs (pDHE19.2) nitriláz-aktivitásának meghatározása

1. Sejtek előállítása

E. coli JM109 (pDHE19.2) törzset 37°C-on, rázatva tenyésztettünk, 6 óra hosszáig, 100 μg/ml ampicillint tartalmazó, TB-tápközegben. Amikor az OD_{600} elérte a 4-et, ebből az előrázott tenyészetből 100 ml-t beoltottunk 8 liter friss, 100 μg/ml ampicillint és 2 g/l L-ramnózt tartalmazó TB-tápközegbe, egy 10 literes fermentorba. A pH-t 7,2-n, a hőmérsékletet 30°C-on, a levegőztetés sebességét 300 l/órán és a fordulatszámot 400-650 forulat/perc-en (rpm) tartjuk. 16 óra múlva a sejteket kinyertük. Ekkor az optikai sűrűség 600 nm-en 18 volt, a megfelelő száraz sejttömeg 7,8 g/l volt.

2. Specifikus aktivitás meghatározása α-hidroxi-fenil-acetonitrillel szemben

A sejteket az 1. pontban leírtak szerint állítottuk elő, és 10 mM Na/K-foszfát-pufferben (pH 7,2) mostuk azokat. 2 mg száraz sejtet felszuszpendáltunk 1 ml, 10 mM Na/K-foszfát-pufferben (pH 7,2), és a reakciót 8,3 mM α-hidroxi-fenil-acetonitril hozzáadásával elindítottuk. A reakciót 40°C-on, rázatás közben végeztük. A kinetikát mintavétel, azután sejtek elkülönítése után nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (ODS Hypersil) segítségével követtük. Meghatároztuk a -hidroxi-fenil-acetonitril, benzaldehid, mandulasavamid és mandulasav mennyiségét. A mandulasav keletkezési sebessége 403 U/g száraz sejttömegre vonatkoztatva, 30%-os átalakulásnál, ahol az 1 egységet úgy definiáljuk, mint amely 1 mol mandulasavat képes előállítani 1 perc alatt, 40 C-on.

6. példa

R-mandulasav szintézise α-hidroxi-fenil-acetonitril elszappanosításával, E. coli JM109 (pDHE19.2) segítségével, szuszpenzióban

1 l térfogatban, 2 g/l koncentrációban, 10 mM Na/K-foszfát-pufferben (pH 7,2) lévő, E. coli JM109 (pDHE19.2) törzshöz rázatás közben, 40°C-on, 10 óra hossza alatt hozzáadtunk 1,3 g/l α-hidroxi-fenil-acetonitrilt. Az adagolást a nitril-fogyasztás szabályozta. R-mandulasav keletkezésének sebességét az 5. példában leírtak szerint határoztuk meg. Az eredményeket bemutatjuk a 4. ábrán.

7. példa

R-mandulasav kinyerése extrakcióval a α-hidroxi-fenil-acetonitril elszappanosítására alkalmazott, E. coli JM109-et (pDHE19.2-t) szuszpenzióban tartalmazó reakciókeverékből

A 6. példában leírt, mandulasav előállítására alkalmazott, vizes reakcióelegyből centrifugálással eltávolítottuk a sejteket, sav alkalmazásával a pH-t beállítottuk 2-re, és háromszor extraháltuk metil-terc-butil-éterrel. A madulasav-extraktumban lévő szerves oldószer ledesztillálása után fehér mandulasav-kristályokat kapunk, melyet visszaoldottunk, és nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával vizsgáltuk kémiai és optikai tisztaságra. Az R-mandulasav kémiai tisztasága 99% volt, optikai tisztasága 97,4% volt.

8. példa

R-mandulasav kinyerése hidegen végzett kristályosítással a α-hidroxi-fenil-acetonitril elszappanosítására alkalmazott, E. coli JM109-et (pDHE19.2-t) szuszpenzióban tartalmazó reakcióke-verékből

A 6. példában leírt, mandulasav előállítására alkalmazott, vizes reakcióelegyből centrifugálással eltávolítottuk a sejteket, melegítés és rázatás közben a kiindulási térfogat 40%-ára töményítettük, és sav alkalmazásával a pH-t beállítottuk 2-re. A mandulasavat vízfürdőben való hűtéssel kikristályosítottuk, és az így kapott, fehér mandulasav-kristályokat nuccson leszívtuk, és megszárítottuk. A kristályokat visszaoldottuk, és nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával vizsgáltuk kémiai és optikai tisztaságra. Az R-mandulasav kémiai tisztasága 99,1% volt, optikai tisztasága 99,8% volt.

9. példa

Különböző nitrilek átalakítása

Az E. coli törzzsel (lásd 6. példát) vagy a kiindulási Alcaligenes törzzsel átalakítottunk különböző nitrileket. Alcaligenes sejteket felvettünk 400 ml Alcaligenes-tápközegben (lásd fentebb A-tápközegként), 30°C-on és 16 óra hosszáig rázattuk 160 rpm-en. A sejteket elkülönítettük centrifugálással (30 perc, 4°C és 5000 rpm). A sejtszuszpenzióból 150-150 µl-t pipettáztunk mikrotiter-tálca tenyésztőhelyeire. Ezután a tálcát lecentrifugáltuk. A felülúszót leszívtuk, és a sejtüledéket kétszer mostuk Na_2HPO_4-al (1,42 g/l Finnaqua-ban, pH 7,2). Azután

hozzápipettáztunk 150 l szubsztrát-oldatot, és a sejteket újra felszuszpendáltuk. A mikrotiter-tálca minden egyes 12-es sorába egy-egy fajta szubsztrátot helyeztünk. Kontrollként egy sor szubsztrát-oldatot sejtek nélkül készítettünk el (= „üres" érték).

A mikrotiter-tálcákat inkubátor-rázógépben, 30°C-on, 200 rpm-nél, 2 óra hosszáig rázattuk. Azután a sejteket lecentrifugáltuk, és a felülúszóban meghatároztuk a keletkezett ammónium-ion mennyiségét, Biomek-berendezés segítségével. A mérést 620 nm-en végeztük kalibrációs görbe felhasználásával, melyet különböző ammónium-hidroxid-oldatokkal állítottunk elő (lásd 5. ábrát). Szubsztrátként alkalmaztuk az alábbi anyagokat: α-hidroxi-fenil--acetonitril (=1), 2-fenil-propionitril (=2), 2-fenil-butironitril (=3), benzil-cianid (=4), 4-klór-benzil-cianid (=5), 4-bróm--benzil-cianid (=6), propionitril (=7), 2-metil-butironitril (=8, 2-ciano-bután), geranonitril (=9), valeronitril (=10), 3--ciano-piridin (=11), 3-bifenil-2-hidroxi-butironitril (=12), 4--fluor-benzil-cianid (=13, 4-fluor-fenil-acetonitril) és α-(3--heptil)-nitrilo-triacetonitril (=14). A szubsztrátokból 0,2 M metanolos oldatot készítettünk, és ebből a törzsoldatból kiindulva Na_2HPO_4-al (1,42 g/l Finnaqua-ban, pH 7,2) 10 mM-ra hígítottuk azokat. A sejtszuszpenziókat 2 g/l biológiai száraz anyagra standardizáltuk. A 2. táblázatban megadjuk egy-egy mikrotiter-tálcasorban a konverzió átlagait.

2. táblázat: Különböző nitrilek átalakítása nitriláz-1650 alkalmazásával

Szubsztrát száma	µmol/l	Aktivitás	Átalakulás (%)
1	2141,2	8,9	86,3
2	1001,1	4,1	70,2
3	24,4	0,1	44,3
4	2210,5	9,2	100
5	2136,3	8,9	100
6	1500,8	6,2	100
7	4,9	0,02	NA
8	-	-	NA
9	-	-	NA
10	113,4	0,47	NA
11	-	-	NA
12	-	-	NA
13	2222,9	9,2	100
14	84,8	0,35	44,1

A 6. ábrán az átalakulások eredményeit újra megadjuk aktivitásértékekben.

(SZEKVENCIÁK JEGYZÉKE)

SEQUENZPROTOKOLL

<210> 1
<211> 1071
<212> DNA
<213> Alcaligenes faecalis

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1071)

<400> 1

```
atg cag aca aga aaa atc gtc cgg gca gcc gcc gta cag gcc gcc tct   48
Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser
  1               5                  10                  15

ccc aac tac gat ctg gca acg ggt gtt gat aaa acc att gag ctg gct   96
Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala
             20                  25                  30

cgt cag gcc cgc gat gag ggc tgt gac ctg atc gtg ttt ggt gaa acc   144
Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly Cys Asp Leu Ile Val Phe Gly Glu Thr
         35                  40                  45

tgg ctg ccc gga tat ccc ttc cac gtc tgg ctg ggc gca ccg gcc tgg   192
Trp Leu Pro Gly Tyr Pro Phe His Val Trp Leu Gly Ala Pro Ala Trp
     50                  55                  60

tcg ctg aaa tac agt gcc cgc tac tat gcc aac tcg ctc tcg ctg gac   240
Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Arg Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Ser Leu Asp
 65                  70                  75                  80

agt gca gag ttt caa cgc att gcc cag gcc gca cgg acc ttg ggt att   288
Ser Ala Glu Phe Gln Arg Ile Ala Gln Ala Ala Arg Thr Leu Gly Ile
                 85                  90                  95

ttc atc gca ctg ggt tat agc gag cgc agc ggc ggc agc ctt tac ctg   336
Phe Ile Ala Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Ser Gly Gly Ser Leu Tyr Leu
            100                 105                 110

ggc caa tgc ctg atc gac gac aag ggc gag atg ctg tgg tcg cgt cgc   384
Gly Gln Cys Leu Ile Asp Asp Lys Gly Glu Met Leu Trp Ser Arg Arg
        115                 120                 125

aaa ctc aaa ccc acg cat gta gag cgc acc gta ttt ggt gaa ggt tat   432
Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Gly Tyr
    130                 135                 140

gcc cgt gat ctg att gtg tcc gac aca gaa ctg gga cgc gtc ggt gct   480
Ala Arg Asp Leu Ile Val Ser Asp Thr Glu Leu Gly Arg Val Gly Ala
145                 150                 155                 160

cta tgc tgc tgg gag cat ttg tcg ccc ttg agc aag tac gcg ctg tac   528
Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Ser Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Leu Tyr
                165                 170                 175
```

```
tcc cag cat gaa gcc att cac att gct gcc tgg ccg tcg ttt tcg cta   576
Ser Gln His Glu Ala Ile His Ile Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser Leu
            180                 185                 190

tac agc gaa cag gcc cac gcc ctc agt gcc aag gtg aac atg gct gcc   624
Tyr Ser Glu Gln Ala His Ala Leu Ser Ala Lys Val Asn Met Ala Ala
        195                 200                 205

tcg caa atc tat tcg gtt gaa ggc cag tgc ttt acc atc gcc gcc agc   672
Ser Gln Ile Tyr Ser Val Glu Gly Gln Cys Phe Thr Ile Ala Ala Ser
    210                 215                 220

agt gtg gtc acc caa gag acg cta gac atg ctg gaa gtg ggt gaa cac   720
Ser Val Val Thr Gln Glu Thr Leu Asp Met Leu Glu Val Gly Glu His
225                 230                 235                 240

aac gcc ccc ttg ctg aaa gtg ggc ggc ggc agt tcc atg att ttt gcg   768
Asn Ala Pro Leu Leu Lys Val Gly Gly Gly Ser Ser Met Ile Phe Ala
                245                 250                 255

ccg gac gga cgc aca ctg gct ccc tac ctg cct cac gat gcc gag ggc   816
Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Pro Tyr Leu Pro His Asp Ala Glu Gly
            260                 265                 270

ttg atc att gcc gat ctg aat atg gag gag att gcc ttc gcc aaa gcg   864
Leu Ile Ile Ala Asp Leu Asn Met Glu Glu Ile Ala Phe Ala Lys Ala
        275                 280                 285

atc aat gac ccc gta ggc cac tat tcc aaa ccc gag gcc acc cgt ctg   912
Ile Asn Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Lys Pro Glu Ala Thr Arg Leu
    290                 295                 300

gtg ctg gac ttg ggg cac cga gac ccc atg act cgg gtg cac tcc aaa   960
Val Leu Asp Leu Gly His Arg Asp Pro Met Thr Arg Val His Ser Lys
305                 310                 315                 320

agc gtg acc agg gaa gag gct ccc gag caa ggt gtg caa agc aag att  1008
Ser Val Thr Arg Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile
                325                 330                 335

gcc tca gtc gct atc agc cat cca cag gac tcg gac aca ctg cta gtg  1056
Ala Ser Val Ala Ile Ser His Pro Gln Asp Ser Asp Thr Leu Leu Val
            340                 345                 350

caa gag ccg tct tga                                             1071
Gln Glu Pro Ser
        355
```

<210> 2
<211> 356
<212> PRT
<213> Alcaligenes faecalis

<400> 2

```
Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser
  1               5                  10                  15
```

```
Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala
            20                  25                  30

Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly Cys Asp Leu Ile Val Phe Gly Glu Thr
        35                  40                  45

Trp Leu Pro Gly Tyr Pro Phe His Val Trp Leu Gly Ala Pro Ala Trp
    50                  55                  60

Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Arg Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Ser Leu Asp
65                  70                  75                  80

Ser Ala Glu Phe Gln Arg Ile Ala Gln Ala Ala Arg Thr Leu Gly Ile
                85                  90                  95

Phe Ile Ala Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Ser Gly Gly Ser Leu Tyr Leu
            100                 105                 110

Gly Gln Cys Leu Ile Asp Asp Lys Gly Glu Met Leu Trp Ser Arg Arg
        115                 120                 125

Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Gly Tyr
    130                 135                 140

Ala Arg Asp Leu Ile Val Ser Asp Thr Glu Leu Gly Arg Val Gly Ala
145                 150                 155                 160

Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Ser Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Leu Tyr
                165                 170                 175

Ser Gln His Glu Ala Ile His Ile Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser Leu
            180                 185                 190

Tyr Ser Glu Gln Ala His Ala Leu Ser Ala Lys Val Asn Met Ala Ala
        195                 200                 205

Ser Gln Ile Tyr Ser Val Glu Gly Gln Cys Phe Thr Ile Ala Ala Ser
    210                 215                 220

Ser Val Val Thr Gln Glu Thr Leu Asp Met Leu Glu Val Gly Glu His
225                 230                 235                 240

Asn Ala Pro Leu Leu Lys Val Gly Gly Gly Ser Ser Met Ile Phe Ala
                245                 250                 255

Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Pro Tyr Leu Pro His Asp Ala Glu Gly
            260                 265                 270

Leu Ile Ile Ala Asp Leu Asn Met Glu Glu Ile Ala Phe Ala Lys Ala
        275                 280                 285

Ile Asn Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Lys Pro Glu Ala Thr Arg Leu
    290                 295                 300

Val Leu Asp Leu Gly His Arg Asp Pro Met Thr Arg Val His Ser Lys
305                 310                 315                 320
```

Ser Val Thr Arg Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile
325 330 335

Ala Ser Val Ala Ile Ser His Pro Gln Asp Ser Asp Thr Leu Leu Val
340 345 350

Gln Glu Pro Ser
355

<210> 3
<211> 39
<212> PRT
<213> Alcaligenes faecalis

<400> 3
Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser
1 5 10 15

Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala
20 25 30

Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly
35

<210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> Alcaligenes faecalis

<400> 4
Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile Ala Ser Val Ala
1 5 10 15

Ile Ser His Pro Gln
20

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> Alcaligenes faecalis

<400> 5
Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys
1 5 10

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Alcaligenes faecalis

<400> 6
atgcagacna gnaaratcgt scg

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Alcaligenes faecalis

<400> 7
tngcsacnga ngcratcttg 20

<210> 8
<211> 31
<212> DNA
<213> Alcaligenes faecalis

<400> 8
ttaatcatat gcagacaaga aaaatcgtcc g 31

<210> 9
<211> 32
<212> DNA
<213> Alcaligenes faecalis

<400> 9
aaggatcctc aagacggctc ttgcactagc ag 32

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Izolált nukleinsav-szekvencia, amely nitriláz-aktivitással rendelkező polipeptidet kódol, és az alábbiak bármelyike:

a) 1. számú szekvenciával (SEQ ID NO: 1) rendelkező nukleinsav-szekvencia,

b) olyan nukleinsav-szekvenciák, amelyek a genetikai kód degeneráltsága eredményeként az 1. számú nukleinsav-szekvenciából lettek levezetve,

c) az 1. számú nukleinsav-szekvencia származékai, amelyek a 2. számú aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptidet kódolják, és aminosav-szinten legalább 80%-osan homológok azzal, anélkül, hogy a polipeptid enzimhatása lényegesen csökkenne.

2. Aminosav-szekvencia, amelyet az 1. igénypont szerinti nukleinsav-szekvencia kódol.

3. A 2. igénypont szerinti aminosav-szekvencia, amelyet az 1. számú szekvencia kódol.

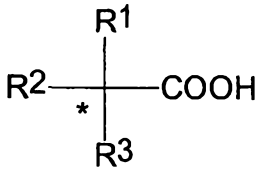
4. Nukleinsav-konstrukció, amely 1. igénypont szerinti nukleinsav-szekvenciát tartalmaz, ahol a nukleinsav-szekvencia egy vagy több szabályzó szignállal van összekapcsolva.

5. Vektor, amely 1. igénypont szerinti nukleinsav-szekvenciát vagy 4. igénypont szerinti nukleinsav-konstrukciót tartalmaz.

6. Mikroorganizmus, amely legalább egy 1. igénypont szerinti nukleinsav-szekvenciát vagy legalább egy 4. igénypont szerinti nukleinsav-konstrukciót tartalmaz.

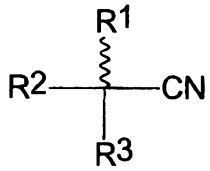
7. A 6. igénypont szerinti mikroorganizmus, amely Escherichia, Pseudomonas vagy Alcaligenes nemzetséghez tartozó baktérium.

8. Eljárás az



(I)

általános képletű királis karbonsavak előállítására, azzal jellemezve, hogy egy



(II)

általános képletű racém nitrilt átalakítunk királis karbonsavvá egy 2. vagy 3. igénypont szerinti aminosav-szekvencia vagy egy 6. vagy 7. igénypont szerinti, növekvő (tenyésztett), nyugalomban lévő vagy feltárt mikroorganizmus jelenlétében, amelyben óránként legalább 25 mmol nitril (mg fehérjére vagy gramm szárazanyag-tömegre vonatkoztatva) képes átalakulni,

ahol az (I) és (II) általános képletben a szubsztituensek és változók jelentése az alábbi:

* optikailag aktív centrum

R^1, R^2, R^3 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, szubsztituált vagy szubsztituálatlan, elágazó vagy egyenes láncú, 1-10 szénatomos alkilcsoport, 2-10 szénatomos alkenilcsoport, szubsztituált vagy szubsztituálatlan arilcsoport, heteroaril-csoport, $-OR^4$ vagy $-NR^4R^5$ általános képletű csoport, és R^1, R^2 és R^3 jelentése mindig eltérő,

R^4 jelentése hidrogénatom, szubsztituált vagy szubsztituálatlan, elágazó vagy egyenes láncú, 1-10 szénatomos alkilcsoport, 2-10 szénatomos alkenilcsoport, 1-10 szénatomos alkil-karbonil-csoport, 2-20 szénatomos alkenil-karbonil-csoport, arilcsoport, arilkarbonil-csoport, heteroaril-csoport vagy heteroaril-karbonil-csoport,

R^5 jelentése hidrogénatom, szubsztituált vagy szubsztituálatlan, elágazó vagy egyenes láncú, 1-10 szénatomos alkilcsoport, 2-10 szénatomos alkenilcsoport, arilcsoport vagy heteroaril-csoport.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az R^1, R^2 vagy R^3 szubsztituensek egyikének jelentése $-OR^4$.

10. A 8. vagy 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az R^1, R^2 vagy R^3 szubsztituensek egyikének jelentése arilcsoport.

11. A 8-10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az eljárást vizes reakcióoldatban, 4 és 11 közötti pH-n végezzük.

12. A 8-11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 0,01 és 10 tömeg% közötti nitrilt vagy 0,01 és 10 tömeg% közötti, megfelelő aldehidet vagy ketont, és 0,01 és 10 tömeg% közötti hidrogén-cianidot alakítunk át.

13. A 8-12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az eljárást 0°C és 80°C közötti hőmérsékleten végezzük.

14. A 8-13. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a királis karbonsavat extrakcióval, vagy kristályosítással, vagy extrakcióval és kristályosítással, 60% és 100% közötti kitermeléssel nyerjük ki a reakcióoldatból.

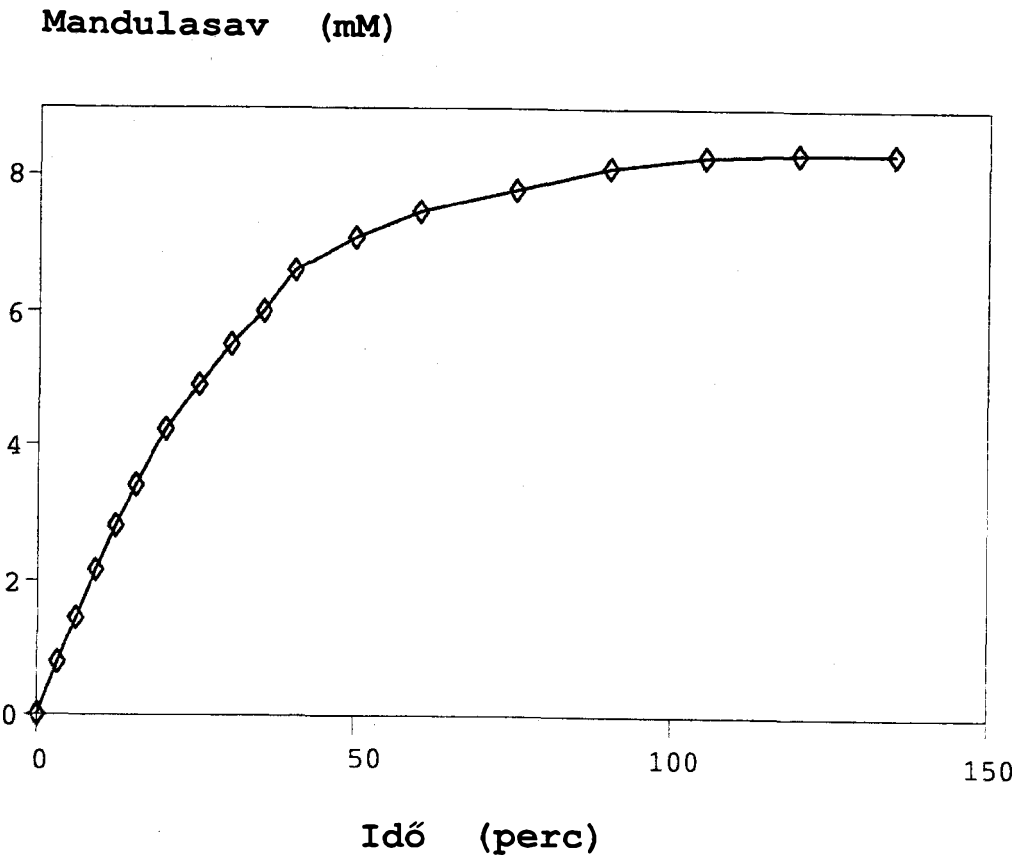
15. A 8-14. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a királis karbonsav legalább 90%-os optikai tisztasággal rendelkezik.

A meghatalmazott:

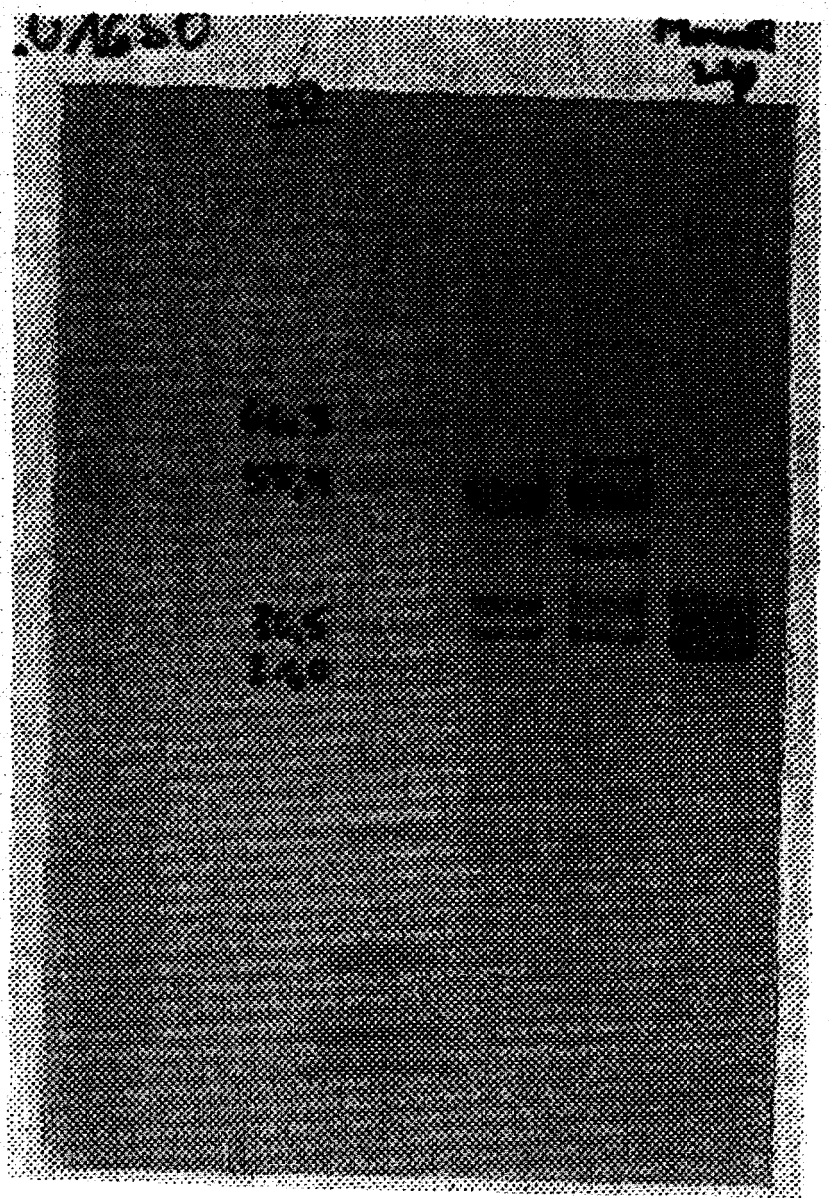
T1+6 = T+eldel

2001 '2 07.

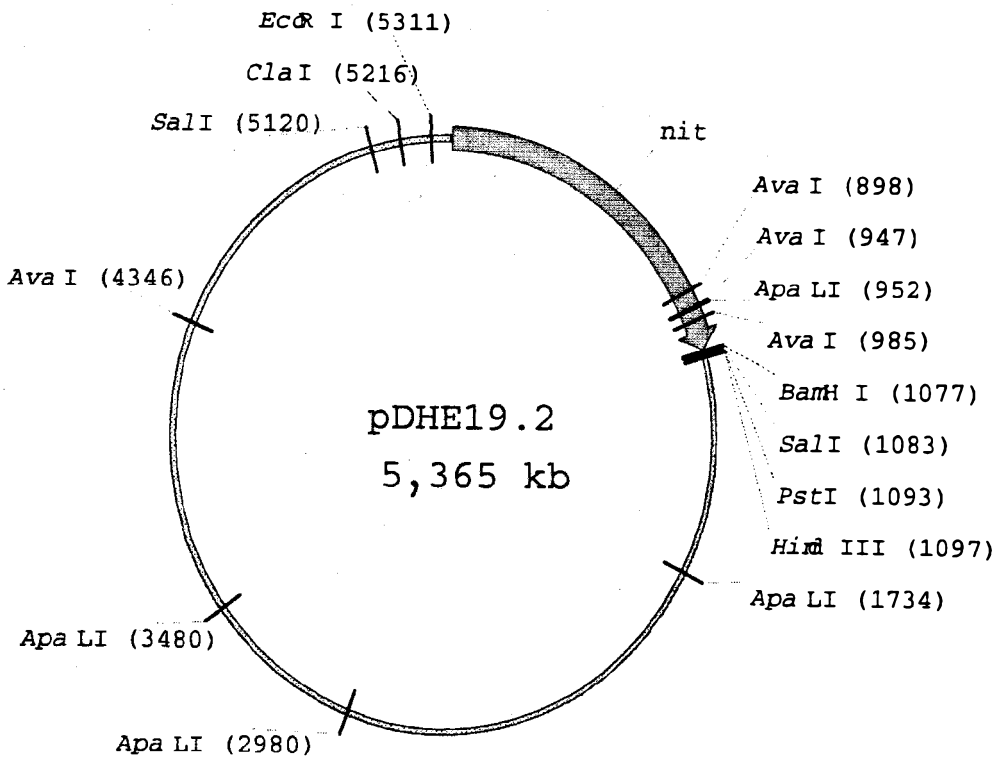
P0104802



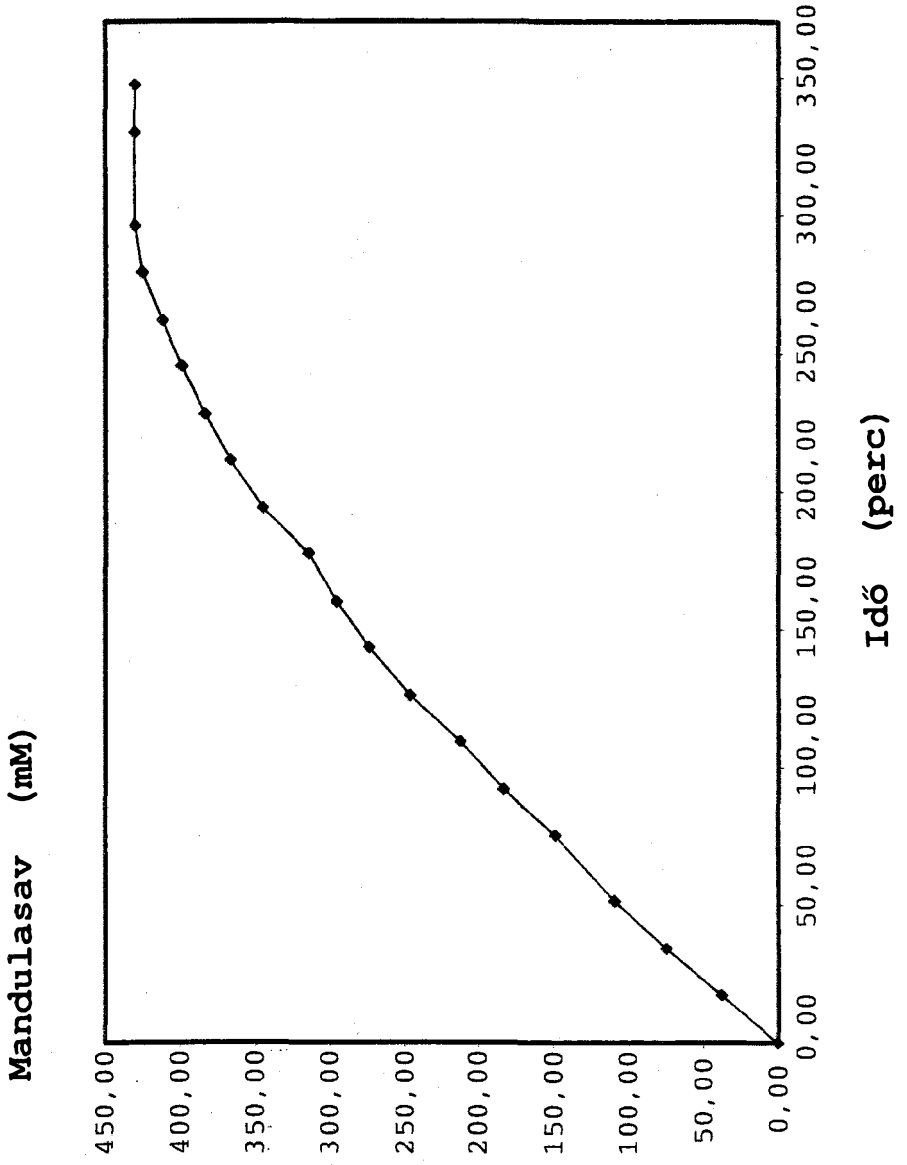
1. ábra



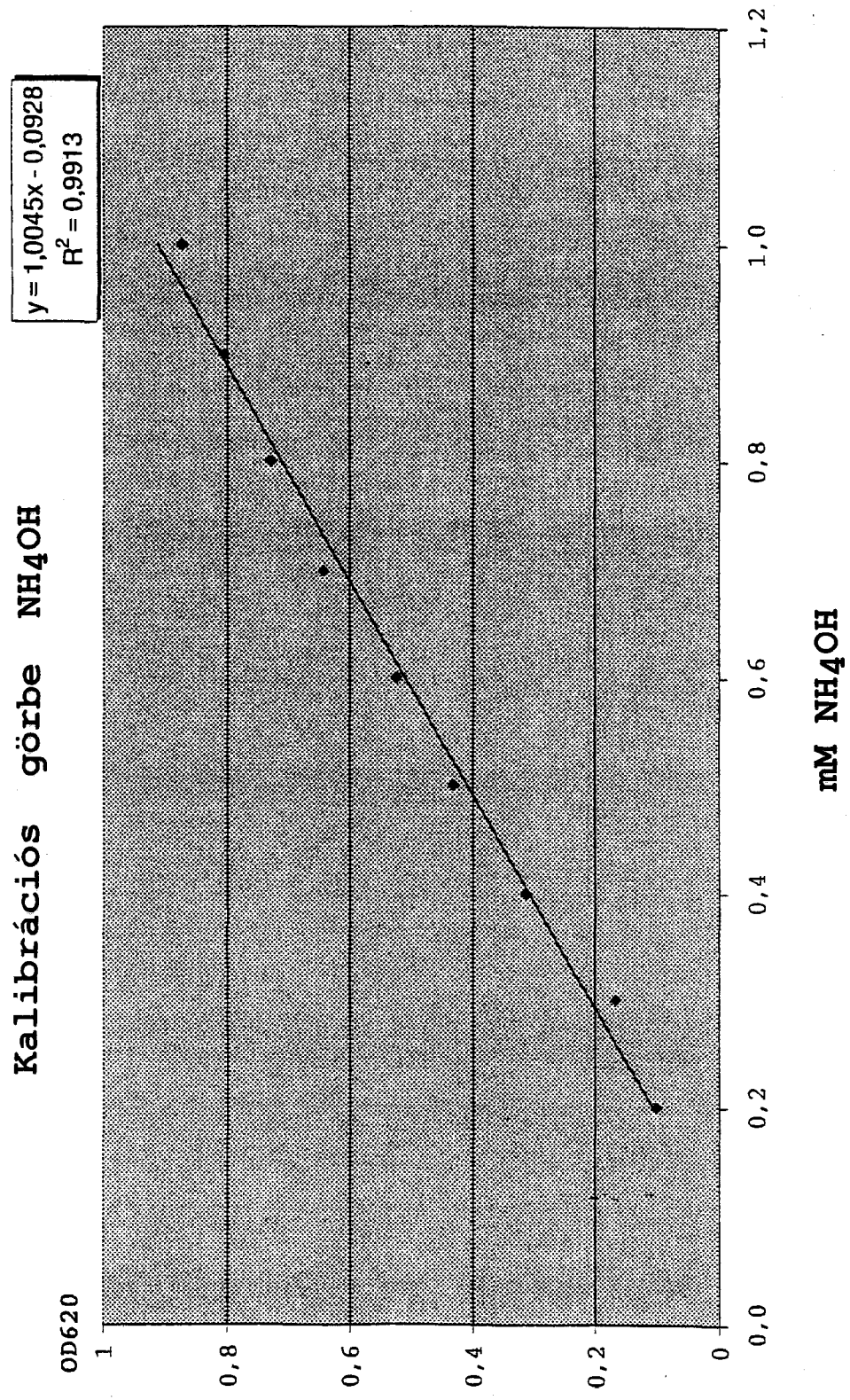
2. ábra


EcoR I (5311)
ClaI (5216)
SalI (5120)
nit
Ava I (898)
Ava I (947)
Apa LI (952)
Ava I (985)
BamH I (1077)
SalI (1083)
PstI (1093)
HindIII (1097)
Apa LI (1734)
Ava I (4346)
Apa LI (3480)
Apa LI (2980)
pDHE19.2
5,365 kb

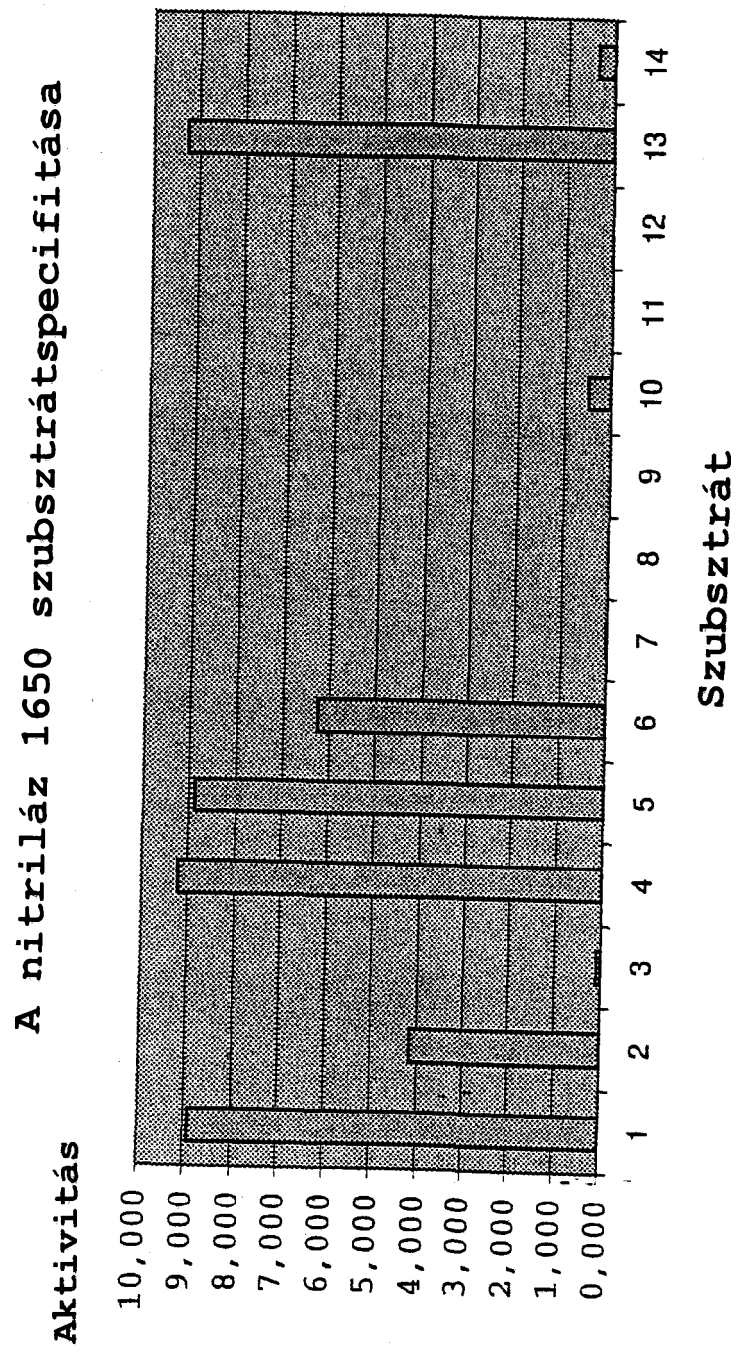
3. ábra


Mandulasav (mM)
450,00
400,00
350,00
300,00
250,00
200,00
150,00
100,00
50,00
0,00
0,00
50,00
100,00
150,00
200,00
250,00
300,00
350,00
Idő (perc)

4. ábra


Kalibrációs görbe NH4OH
y = 1,0045x - 0,0928
R2 = 0,9913
OD620
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1,2
mM NH4OH

5. ábra


A nitrilláz 1650 szubsztrátspecifitása
Aktivitás
10,000
9,000
8,000
7,000
6,000
5,000
4,000
3,000
2,000
1,000
0,000
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
Szubsztrát

6. ábra