



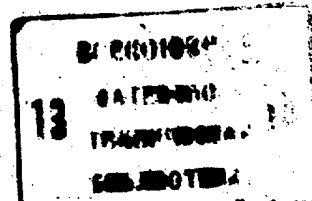
СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1069622** **A**

3(5D) С 07 С 101/04//С 07 В 29/00:
С 12 Р 13/04

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ



- (21) 2954169/23-04
(22) 24.07.80
(31) Р 2930070.7
(32) 25.07.79
(33) ФРГ
(46) 23.01.84. Бюл. № 3
(72) Кристиан Вандрей, Рольф Вихманн, Вольфганг Лойхтенбергер, Мария-Регина Кула и Андреас Бюкманн (ФРГ)
(71) Дегусса АГ (ФРГ) и Гезельшафт Фюр биотехнологише форшунг мБХ (ГВФ) (ФРГ)
(53) 547.466.07(088.8)
(56) 1. Патент Франции № 2217296, кл. С 07 В 29/00, опублик. 1974 (прототип).
(54) (57) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НИЗШИХ α -L-АМИНОКИСЛОТ ИЗ СООТВЕТСТВУЮЩИХ НИЗШИХ α -КЕТОКИСЛОТ В ПРИСУТСТВИИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К СУБСТРАТУ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ, СОЛИ АММОНИЯ И НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДА ($\text{НАД}^+/\text{НАДН}$) ПРИ ОДНОВРЕМЕННОЙ РЕГЕ-

нерации НАДН из НАД^+ о т л и ч а ю щ и й с я тем, что, с целью упрощения процесса, в реактор с мембраной для ультраfiltrации, средний размер пор которой равен 1-3 мкм, помещают раствор форматдегидрогеназы и специфической по отношению к исходной низшей α -кетокислоте дегидрогеназы, содержащий $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ в концентрации 3,55-3,92 ммоль/л, который связан с полиэтиленгликолем со средним молекулярным весом 10 000, непрерывно подают водный раствор, содержащий 100-500 ммоль/л исходной α -кетокислоты в виде водорастворимой соли и водный раствор формиата аммония в качестве соли аммония концентрацией 400-800 ммоль/л, причем разность давления по обе стороны мембраны поддерживают 0,2-0,5 бар, и непрерывно отводят из реактора через мембрану поток фильтрата, содержащий целевой продукт.

(19) **SU** (11) **1069622** **A**

Изобретение относится к усовершенствованию, получения низших α -L-аминокислот, использующихся в фармакологии, пищевой промышленности, а также в качестве исходных соединений в пептидном синтезе.

Наиболее близким к предлагаемому является способ получения низших α -L-аминокислот, заключающийся в том, что исходную соответствующую α -кетокислоту вводят во взаимодействие со специфической к субстрату дегидрогеназой в присутствии 0,1 М водного раствора соли аммония (например, двухзамещенного фосфата аммония), никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺/НАДН) при одновременной регенерации НАДН из НАД⁺ с помощью метанола, этанола или этоксиэтанола в присутствии алкогольдегидрогеназы. При этом концентрация никотинамидадениндинуклеотида составляет приблизительно 1 ммоль/л, концентрация исходной α -кетокислоты 10 ммоль/л, выходы целевых продуктов 4,4-93,1% (без учета стадии их отделения от никотинамидадениндинуклеотида, ферментов и фосфата аммония) [1].

Недостатком известного способа является сложность проведения процесса, связанная с необходимостью отделения целевых продуктов от никотинамидадениндинуклеотида, дегидрогеназы кетокислоты и алкогольдегидрогеназы. В результате этого указанные ферменты инактивируются, а никотинамидадениндинуклеотид может частично разрушаться, что делает практически невозможным повторное использование указанных компонентов.

Целью изобретения является упрощение процесса энзиматического получения низших α -L-аминокислот из соответствующих низших α -кетокислот.

Указанная цель достигается способом получения низших α -L-аминокислот из соответствующих низших α -кетокислот, заключающимся в том, что в реактор с мембраной для ультраfiltrации, средний размер пор которой равен 1-3 мкм помещают раствор формиатдегидрогеназы и специфической по отношению к исходной низшей α -кетокислоте дегидрогеназы, содержащий НАД⁺/НАДН в концентрации 3,55-3,92 ммоль/л, который связан с полиэтиленгликолем со средним молекулярным весом 10 000, непрерывно подают водный раствор, содержащий 100-500 ммоль/л исходной α -кетокислоты в виде водорастворимой соли, и водный раствор формиата аммония в качестве соли аммония концентрацией 400-800 ммоль/л, причем разность давления по обе стороны мембраны поддерживают в пределах 0,2-0,5 бар, и непрерывно отводят из реактора через мембрану поток

фильтрата, содержащий целевой продукт.

Как правило, соотношение между активностями формиатдегидрогеназы и специфической по отношению к субстрату дегидрогеназы находится в интервале 1:(1-5).

Как правило, иммобилизацию никотинамидадениндинуклеотида на полиэтиленгликоле проводят обработкой кофермента этиленимином с последующей концентрацией полученного N-аминоэтильного производного с карбоксилированным полиэтиленгликолем с помощью водорастворимого карбодимида, после чего иммобилизованный продукт восстанавливают до соответствующего производного НАДН, превращают, перегруппировкой по Димроту в N-производное и, в случае необходимости, окисляют до соответствующего производного НАД⁺. При этом концентрация коэнзима обычно составляет 0,1 - 10 ммоль/л, предпочтительно 1 - 7 ммоль/л.

Концентрация формиата аммония предпочтительно должна быть равной концентрации исходной α -кетокислоты или, по крайней мере, не ниже последней.

Величину pH реакционной смеси при проведении процесса обычно поддерживают в интервале 5-9.

Как правило, целевые продукты выделяют известными способами, например, с помощью анионообменных смол.

Осуществление предлагаемого способа дает упрощение процесса получения низших α -L-аминокислот из соответствующих низших α -кетокислот и заключается в более простом отделении целевых продуктов от исходных, например с помощью анионообменных смол; в возможности неоднократного повторного использования дорогостоящих компонентов - формиатдегидрогеназы, специфической по отношению к исходной α -кетокислоте дегидрогеназы, никотинамидадениндинуклеотида; в непрерывности проведения процесса; в меньшем объеме реакционной смеси (за счет увеличения концентрации).

Пример 1. Термостатируемый при 40°C реактор объемом 10 мл с плоской мембраной, снабженный магнитной мешалкой и мембраной для ультраfiltrации диаметром 62 мм с номинальным пределом исключения 3000 (фирма-поставщик "Амикон", Виттен, тип ДМ 5) промывают для стерилизации водным раствором формальдегида при скорости подачи 20 мл/ч с применением дозирующего насоса, в течение примерно 5 ч. Затем в течение еще примерно 5 ч раствор формальдегида вытесняют дистиллированной водой. После этого также при скорости подачи 20 мл/ч в течение примерно 2,5 ч

пропускают профильтрованный через стерильный фильтр (0,2 мкм) раствор субстрата, содержащий 500 ммоль/л натриевой соли пировиноградной кислоты, 400 ммоль/л и 50 ммоль/л однозамещенного фосфата натрия и доведенный до pH 8 при помощи гидрата окиси натрия. После этого вместо раствора субстрата подают 10 мл раствора никотинамидадениндинуклеотида, содержащего 3,66 ммоль/л НАД⁺, связанного с полиэтиленгликолем со средним мол. весом 10 000 и 50 ммоль/л фосфатного буферного раствора для установления pH на уровне 8. После этого снова подают раствор субстрата этого же состава со скоростью 20 мл/ч.

Затем в реакционное пространство перед мембраной через боковое отверстие вводят 100 мг форматдегидрогеназы (активность 6,74 мкмоль/мг в минуту при формате в качестве субстрата, 40°C и pH 8) в форме водного глицеринового раствора [(50% по весу глицерина), 10 мг форматдегидрогеназы/мл] и 1,62 мг L-аланиндегидрогеназы (активность 415 мкмоль/мг в минуту при пирувате в качестве субстрата, 40°C и pH 8) в форме водного раствора в сульфате аммония (2,4 моль/л сульфата аммония, 5 мг L-аланиндегидрогеназы/мл) при помощи шприца. При таком составе соотношение между активностями форматдегидрогеназы и L-аланиндегидрогеназы составляет 1:1. За процессом превращения непрерывно следят при помощи вмонтированной в поток фильтрата проточной кюветы поляриметра. Дифференциальное давление у мембраны достигает вначале 0,2 бар, затем постепенно повышается до 0,5 бар и остается после этого постоянным. В течение рабочего периода, составляющего примерно 50 ч, получают 175 ммоль L-аланина. Максимальная скорость превращения достигает 6,45 ммоль L-аланина/ч.

Получают 108 ммоль L-аланина из расчета на 1 мг L-аланиндегидрогеназы или 1,75 ммоль L-аланина из расчета на 1 мг форматдегидрогеназы. Выход целевого продукта 35%, оптическая чистота 100%.

Пример 2. Стерилизацию мембранного реактора объемом 10 мл с плоской мембраной (мембрана с номинальным пределом исключения 5000, фирма-поставщик "Амикон", Виттен, тип УМ 5), поддерживаемого при 25°C, проводят таким же способом, как и в примере 1.

При скорости подачи 20 мл/ч, в течение примерно 2,5 ч подают стерильно профильтрованный раствор, содержащий 400 ммоль/л натриевой соли пировиноградной кислоты, 400 ммоль/л формата аммония и 50 ммоль/л однозамещенного фосфата натрия и установленный на уровне pH 8 при помощи гидрата окиси натрия. После этого вместо раствора субстрата при скорости подачи 4 мл/ч вводят смесь из 10 мл раствора коэнзима (в соответствии с примером 1) и 85 мг форматдегидрогеназы (активность 0,85 мкмоль/мг в минуту при формате в качестве субстрата, 25°C и pH 8) в форме водного глицеринового раствора [(50% по весу глицерина), 10 мг форматдегидрогеназы/мл]. После этого в реакционное пространство через боковое отверстие вводят при помощи шприца 0,94 мг L-аланиндегидрогеназы (активность 233 мкмоль/мг в минуту при пирувате в качестве субстрата, 25°C и pH 8) в форме водного раствора сульфата аммония (2,4 моль/л сульфата аммония, 5 мг L-аланиндегидрогеназы/мл). Соотношение между активностями достигает 1:2,2. В течение

миата аммония и 50 ммоль/л однозамещенного фосфата натрия и установленный на уровне pH 8 при помощи гидрата окиси натрия. После этого вместо раствора субстрата при скорости подачи 4 мл/ч подают смесь из 7 мл раствора коэнзима (в соответствии с примером 1) и 138 мг форматдегидрогеназы (активность 0,85 мкмоль/мг в минуту при формате в качестве субстрата, 25°C и pH 8) в форме водного глицеринового раствора [(50% по весу глицерина), 10 мг форматдегидрогеназы/мл]. После этого в реакционное пространство через боковое отверстие вводят 2,78 мг L-аланиндегидрогеназы (активность 233 мкмоль/мг в минуту при пирувате в качестве субстрата, 25°C и pH 8) в форме водного раствора в сульфате аммония (2,4 моль/л сульфата аммония, 5 мг L-аланиндегидрогеназы/мл) при помощи шприца. Соотношение между активностями форматдегидрогеназы и L-аланиндегидрогеназы достигает 1:4. В течение 59 ч получают 48 ммоль L-аланина, что соответствует 17,3 ммоль L-аланина из расчета на 1 мг L-аланиндегидрогеназы или 0,35 ммоль L-аланина из расчета на 1 мг форматдегидрогеназы. Выход целевого продукта 10,2%, оптическая чистота 100%.

Пример 3. Стерилизацию реактора объемом 10 мл с плоской мембраной (мембрана с номинальным пределом исключения 5000, фирма-поставщик "Амикон", Виттен, тип УМ 5), термостатируемого при 25°C, проводят, как описано в примере 1.

При скорости подачи 20 мл/ч, в течение примерно 2,5 ч подают стерильно профильтрованный раствор, содержащий 400 ммоль/л натриевой соли пировиноградной кислоты, 800 ммоль/л формата аммония и 50 ммоль/л однозамещенного фосфата натрия и установленный на уровне pH 8 при помощи гидрата окиси натрия. После этого вместо раствора субстрата при скорости подачи 4 мл/ч вводят смесь из 10 мл раствора коэнзима (в соответствии с примером 1) и 85 мг форматдегидрогеназы (активность 0,85 мкмоль/мг в минуту при формате в качестве субстрата, 25°C и pH 8) в форме водного глицеринового раствора [(50% по весу глицерина), 10 мг форматдегидрогеназы/мл]. После этого в реакционное пространство через боковое отверстие вводят при помощи шприца 0,94 мг L-аланиндегидрогеназы (активность 233 мкмоль/мг в минуту при пирувате в качестве субстрата, 25°C и pH 8) в форме водного раствора сульфата аммония (2,4 моль/л сульфата аммония, 5 мг L-аланиндегидрогеназы/мл). Соотношение между активностями достигает 1:2,2. В течение

140 ч получают 92 ммоль L-аланина, что соответствует 98 ммоль L-аланина из расчета на 1 мг L-аланиндегидрогеназы или 1,08 ммоль L-аланина из расчета на 1 мг формиатдегидрогеназы. Выход целевого продукта составляет 8,2%, оптическая чистота 100%.

Пример 4. Термостатируемый при 25°C реактор объемом 11,3 мл с плоской мембраной, который снабжен магнитной мешалкой и ультрафильтрационной мембраной диаметром 62 мм с номинальной границей исключения 5000 (фирма-поставщик "Амикон", Виттен, тип УМ 5), промывают для стерилизации с помощью установленного на скорость подачи 20 мл/ч дозирующего насоса примерно в течение 5 ч водным 70%-ным раствором этилового спирта вытесняют дистиллированной водой. После этого также со скоростью подачи 20 мл/ч примерно в течение 5 ч подают профильтрованный через стерильный фильтр (0,2 мкм) раствор субстрата, который содержит 100 ммоль/л натриевой соли 2-оксо-4-метилпентановой кислоты и 400 ммоль/л формиата аммония, и с помощью раствора едкого натра устанавливают pH 8. Затем в ток субстрата между дозирующим субстрат насосом и стерильным фильтром подают дозированно 11,77 мл, соответственно 35,2 мг формиатдегидрогеназы (активность 4,06 мк моль/мг в минуту в случае формиата в качестве субстрата, при 25°C и pH 8) в форме водного полиэтиленгликолевого раствора (40 вес.% этиленгликоля со средней мол. массой 400; 3 мг формиатдегидрогеназы/мл).

Дополнительно аналогичным образом дозируют 1,6 мл, соответственно, 6,72 мг лейциндегидрогеназы (активность 10,46 мк моль/мг в минуту в случае натриевой соли 2-оксо-4-метилпентановой кислоты в качестве субстрата, 400 ммоль/л формиата аммония, 25°C и pH 8) в форме водного раствора фосфата калия (10 ммоль/л, pH 7). Затем следующие 5 ч дозируют раствор субстрата. После этого устанавливают скорость подачи субстрата при значении 11,3 мл/ч и добавляют 2,88 мл раствора кофермента к ферменту, который содержит 3,92 ммоль/л НАДН, связанного с полиэтиленгликолем со средней мол. массой 10 000 в форме водного раствора, в котором с помощью раствора едкого натра установлено pH 8. При этом соотношение активностей формиатдегидрогеназы к лейциндегидрогеназе составляет 1:2. Процесс контролируют с помощью встроенной в поток фильтрата проточной кюветы поляриметра. Дифференциальное давление

над мембраной постепенно повышается до 0,35 бар и затем остается постоянным. В течение 205 ч (8,5 дней) получают 202 ммоль L-лейцина. Максимальная скорость процесса составляет 1,12 ммоль L-лейцина в час. Выход целевого продукта 87,2%, оптическая чистота 100%.

Пример 5. Термостатируемый при 25°C реактор объемом 10 мл с плоской мембраной, который снабжен магнитной мешалкой и ультрафильтрационной мембраной диаметром 62 мм с номинальной границей исключения 5000 (фирма-поставщик "Амикон", Виттен, тип УМ 5), с помощью установленного на скорость подачи 20 мл/ч дозирующего насоса примерно в течение 5 ч для стерилизации промывают 70%-ным водным раствором этанола. Затем в течение следующих 5 ч раствор этанола вытесняют дистиллированной водой. После этого со скоростью подачи 20 мл/ч примерно в течение 2,5 ч подают профильтрованный через стерильный фильтр (0,2 мкм) раствор субстрата, который содержит 100 ммоль/л натриевой соли 2-оксо-4-метилпентановой кислоты, 400 ммоль/л формиата аммония и 50 ммоль/л однозамещенного фосфата натрия, и с помощью раствора едкого натра устанавливают pH 8. Затем вместо раствора субстрата дозируют 7,9 мл раствора кофермента, который содержит 3,80 ммоль/л НАДН, связанного с полиэтиленгликолем средней мол. массы 10 000, и 50 ммоль/л фосфатного буфера с pH 8. После этого дозируют 61,5 формиатдегидрогеназы (активность 2,60 мкмоль/мг в минуту при формиате в качестве субстрата, 25°C и pH 8) в форме водного раствора глицерина (50 вес.% глицерина; 10 мл формиатдегидрогеназы/мл). Вслед за этим далее дозируют описанным образом раствор субстрата. Спустя примерно 5 ч поток субстрата уменьшают до 2 мл/ч,

Затем в реакционный объем перед мембраной через боковое отверстие с помощью шприца добавляют 31,6 мг лейциндегидрогеназы (активность 11,48 мкмоль/мг в минуту в случае натриевой соли 2-оксо-4-метилпентановой кислоты в виде субстрата, при концентрации 400 ммоль/л формиата аммония, 25°C и pH 8) в форме водного раствора фосфата калия (10 ммоль/л 4,2 мг лейциндегидрогеназы/мл). Соотношение активностей формиатдегидрогеназы и лейциндегидрогеназы составляет 1:2,3. Процесс контролируют с помощью встроенной в поток фильтрата проточной кюветы поляриметра. Дифференциальное давление над мембраной устанавливается при значении

0,35 бар и затем остается постоянным. В течение 1152 ч (48 дней) получают 150 ммоль L-лейцина. Максимальная ско-

рость процесса составляет 0,20 ммоль L-лейцина/ч. Выход целевого продукта 65,1%, оптическая чистота 100%.

Редактор Н.Егорова Составитель Ю.Хропов Техред В.Далекорей Корректор И.Эрдей

Заказ 11508/59 Тираж 410 Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г.Ужгород, ул.Проектная, 4