



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 15.08.78 (P. 209061)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 24.03.80

Opis patentowy opublikowano: 23.02.1983

Int. Cl.³ C07B 19/00
C07C 99/12
C07C 101/16

CZŁŁNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Estera Szwajcer, Apolinary Szewczuk, Marian Mordarski

Uprawniony z patentu: Polska Akademia Nauk, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej, Wrocław (Polska)

Sposób wydzielania D-fenyloglicyny z mieszaniny racemicznej N-acylo-DL-fenyloglicyny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wydzielania D-fenyloglicyny z mieszaniny racemicznej N-acylo-DL-fenyloglicyny, metodą enzymatyczną.

D-fenyloglicyna jest ważnym półproduktem w syntezie niektórych półsyntetycznych penicylin i cefalosporyn. Aminokwas ten otrzymuje się przez wydzielanie go z racematu DL-fenyloglicyny. Racemat uzyskuje się syntetycznie przez działanie amoniaku na kwas fenyloglioksalowy (J. Am. Soc. 42.2264) lub bromofenylooctowy (J. Biol. Chem. 18, 47) bądź też z aldehydu benzoowego metodą Streckera (Antibiotyki, 9.875).

Dotychczas opisane metody wydzielania D-fenyloglicyny można podzielić na dwie grupy: chemiczne i enzymatyczne.

Metody chemiczne polegają na frakcjonowanej krystalizacji soli D-fenyloglicyny z odpowiednim kwasem.

Najczęściej są to połączenia z kwasem D-kamfosulfonowym lub abietylowym (J. Am. Chem. Soc. 42, 2266, opisy patentowe Japonii Nr 73.78.137, 76.79.036, 74.76.703, opisy patentowe RFN Nr 2 710 504, 2 655 624, opisy patentowe Wielkiej Brytanii Nr 1 314 739 i 1 455 710).

Według innych metod rozdziału racematu dokonuje się za pomocą odpowiednich kwasów arylosulfonowych (opisy patentowe Japonii Nr 76.95.038, 77.100.441, 77.100.440, 77.87.140, 77.87.187, opis patentowy Francji Nr 2 226 376, opis paten-

2

towy St. Zjedn. Am. Nr 3 933 902), kwasu winowego (opisy patentowe RFN Nr 2 163 033 i 2 227 011, opisy patentowe Japonii Nr 73.29.715) lub niektórych kwasów nieorganicznych (opisy patentowe Japonii Nr 72.25.147, 73.14.645).

W metodach enzymatycznych wykorzystuje się stereospecyficzność niektórych enzymów wobec pochodnych L-izomerów. W oparciu o opis patentowy RFN Nr 2 621 076, D-fenyloglicynę otrzymano z DL-hydantoiny za pomocą hydrolazy hydropirymidynowej. Jednak najczęściej są stosowane enzymy, które specyficznie hydrolizują pochodne L-fenyloglicyny. Tak np. wykorzystując leucyloamino-peptydazę z *Pseudomonas* i nerki wieprzowej rozdzielono amid DL-fenyloglicyny na oba enancjomery (opisy patentowe RFN Nr 2 526 594, 2 700 456).

Do rozkładu enzymatycznego wykorzystuje się także drobnoustroje swoście hydrolizujące N-acylowe pochodne L-fenyloglicyny. Stosując np. komórki *Azotobacter* i *Pseudomonas*, z N-chloroacetylo-DL-fenyloglicyny i N-benzoilo-DLL-fenyloglicyny wydzielono odpowiednie antypody (opisy patentowe Japonii Nr 70.08.634, 70.08.635, 74.50.191, 74.80.290). Według opisu patentowego RFN Nr 2 344 060 do rozdziału enancjomerów, między innymi N-acetylo-DL-fenyloglicynianu amonu, stosuje się acylazę z dowolnego mikroorganizmu (nie wyszczególniono konkretnego szczepu).

Według opisu patentowego Wielkiej Brytanii Nr

1 369 462 rozdziału racematu dokonuje się za pomocą amidazy penicylinowej zawartej w komórkach *E. coli* szczepu Nr 893.418, swoście hydrolicyzującej niektóre N-acylowe pochodne L-fenyloglicyny takie jak: N-fenylaoacetylo-, 2-furyloacetylo-, n-propoksyacetylo-2, 2-tionylo-, n-heksanoilo- lub n-heksenoliglicynę. Rozkład enzymatyczny prowadzi się albo za pomocą komórek bakteryjnych albo też enzymem immobilizowanym. Wiadomo przy tym, że zastosowanie całych komórek bakteryjnych pozwala tylko na jednorazowe użycie biomasy, znacznie podnosi koszty metody, a otrzymane produkty często są zanieczyszczone wysokocząsteczkowymi substancjami, dającymi odczyny alergiczne. Z powyższych względów znacznie korzystniejsze jest stosowanie enzymu immobilizowanego.

Według wyżej cytowanego opisu patentowego Wielkiej Brytanii immobilizowany enzym otrzymuje się z homogenatu bakteryjnego, który poddaje się odwirowaniu, a z supernatantu wytrąca enzym za pomocą siarczanu amonowego. Osad rozpuszcza się następnie w wodzie, dializuje i liofilizuje. Tak oczyszczony enzym osadza się za pośrednictwem glutaraldehydu na nośniku z odpowiednio spreparowanej celulozy.

Celem wynalazku było opracowanie sposobu wydzielania D-fenyloglicyny z mieszaniny racemicznej, przy użyciu preparatu enzymatycznego nadającego się do wielokrotnego stosowania i posiadającego zwiększoną odporność na ogrzewanie i przechowywanie, a także nie zanieczyszczającego produktów reakcji.

Sposób według wynalazku polega na tym, że N-acylową pochodną DL-fenyloglicyny poddaje się działaniu enzymu specyficznego hydrolicyzującego N-acylo-L-fenyloglicynę, wyodrębnia się ze środowiska pohydrolicyzy L-fenyloglicynę i następnie deacyluje się pozostałą w tym środowisku N-acylo-D-fenyloglicynę do D-fenyloglicyny.

Według wynalazku stosuje się enzym wyodrębniony w określonych warunkach z homogenatu bakteryjnego i immobilizowany na anionicie o rozwiniętej powierzchni sorpcyjnej, korzystnie na DEAE-celulozie.

Jako źródło enzymu asymetrycznie rozkładającego N-acylowe pochodne DL-fenyloglicyny stosuje się masę bakteryjną, otrzymaną z następujących rodzajów bakterii: *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Mycococcus*, *Brevibacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Pectobacterium*, *Providencia*, *Micrococcus*.

Szczególne korzystne efekty uzyskuje się przy zastosowaniu enzymu wytwarzanego przez szczep *Micrococcus agilis* CCM 2131.

Jako N-acylowe pochodne DL-fenyloglicyny można stosować także pochodne jak N-acetylową, N-butylową, N-chloroacetylową, N-fluoroacetylową, przy czym najkorzystniej stosuje się pochodną N-acetylową, ze względu na prostotę jej otrzymywania, możliwość prowadzenia enzymatycznej hydrolicyzacji roztworów wodnych na kolumnie z immobilizowanym enzymem i łatwość rozdziału produktów enzymatycznego rozkładu. Dla zwiększe-

nia rozpuszczalności w wodzie związki te stosuje się w postaci soli sodowych.

Sposobem według wynalazku enzym specyficznego hydrolicyzującego N-acylo-L-fenyloglicynę otrzymuje się przez zawieszenie homogenatu bakteryjnego w słabo zakalizowanym buforze fosforanowym, korzystnie o pH = 8, odwirowanie i wytrącenie z supernatantu enzymu. Enzym wytrąca się w temperaturze obniżonej do około 1—4°C za pomocą acetonu użytego w stosunku objętościowym około 1:1. Następnie osad odwirowuje się i suszy strumieniem zimnego powietrza.

Uzyskany proszek acetonowy, w celu immobilizacji enzymu rozpuszcza się w słabo alkalicznym buforze fosforanowym o pH = 7—8,8 i w temperaturze pokojowej miesza się otrzymany roztwór z sorbentem w postaci anionitu o silnie rozwiniętej powierzchni sorpcyjnej, korzystnie z DEAE-celulozą uprzednio zrównoważoną buforem fosforanowym również do pH = 7—8,8. Następuje trwałe związanie enzymu z nośnikiem, przy czym jego pierwotna aktywność nie ulega spadkowi.

Tak otrzymany immobilizowany stały preparat enzymatyczny po odsączeniu i przemyciu do zmiękania białka w przesączu, stosuje się do specyficznego hydrolicyzacji enzymatycznej wodnego roztworu soli N-acylo-DL-fenyloglicyny i dokonuje się rozdziału enancjomerów w znany sposób.

Hydrolicyzację można prowadzić w układzie stacjonarnym, lecz szczególnie dogodnym jest stosowanie kolumny upakowanej immobilizowanym enzymem, którą można używać do ciągłego rozkładu wodnych roztworów N-acylowych pochodnych fenyloglicyny. Stopień hydrolicyzacji substratu reguluje się szybkością przepływu użytego roztworu oraz temperaturą, którą utrzymuje się na poziomie 20—67°C. W eluacie produkty rozkładu oznacza się dwoma metodami: kolorymetryczną z zastosowaniem ninhydryny (Arch. Biochem. Biophys. 67, 10—15) i polarymetryczną przez oznaczenie skręcalności optycznej N-acetylo-D-fenyloglicyny.

Produkt hydrolicyzacji enzymatycznej w postaci eluatu zawiera niezmienną N-acetylo-D-fenyloglicynę oraz L-fenyloglicynę. W celu wyodrębnienia L-fenyloglicyny eluat zagęszcza się i doprowadza do punktu izoelektrycznego (pH = 5,6). Wytrącony osad L-fenyloglicyny odsącza się, a przesącz zawierający N-acetylo-D-fenyloglicynę zakwasza do pH poniżej 3. Wytrąconą w tych warunkach pochodną acyloową D-fenyloglicyny deacyluje się w znany sposób za pomocą kwasu solnego do D-fenyloglicyny. Ponieważ w wyniku wyżej opisanego postępowania nie cała ilość acylowanej pochodnej D-fenyloglicyny ulega wytrąceniu, pozostałą jej ilość, obecną jeszcze w przesączu ekstrahuje się z roztworu octanem etylu. Ekstrakt po odparzeniu rozpuszczalnika łączy się z wytrąconą N-acylo-D-fenyloglicyną i poddaje hydrolicyzacji.

Uzyskaną w trakcie procesu L-fenyloglicynę racemizuje się w znany sposób do DL-fenyloglicyny i przeprowadza w pochodną acyloową, po czym zwraca do obiegu.

Sposób według wynalazku wykazuje szereg za-

let w porównaniu z metodami dotychczasowymi. Enzym wyodrębniony z homogenatu bakteryjnego przez wytrącenie acetonem stanowi proszek, który można przechowywać w suchym miejscu przez okres co najmniej kilku miesięcy bez utraty aktywności enzymatycznej. Proszek ten rozpuszcza się w rozcieńczonym buforze, korzystnie w 0,01 M buforze fosforanu potasu o wartości pH = 8,0 a następnie wiąże na odpowiednim anionicie, korzystnie na DEAE-celulozie. Związanie enzymu z nośnikiem następuje bezpośrednio, bez konieczności stosowania substancji „pomocniczej” jak np. glutaraldehydu (jak to podano w w/w patencie Wielkiej Brytanii). Jako nośnik można stosować bezpośrednio DEAE-celulozę, bez konieczności specjalnego preparowania jej.

Sposób według wynalazku jest objaśniony następującym przykładem.

Przykład. Przygotowanie biomasy.

Szczep *Micrococcus agilis* CCM 21311 hoduje się na podłożu kompleksowym o składzie: Bacto pepton — 1%, hydrolizat kazeiny 0,2, wyciąg z drożdży — 0,2%, chlorek sodowy — 0,6% w wodzie destylowanej. Roztwór doprowadza się do pH 7,2—7,4 za pomocą 6N NaOH. Materiał posiewowy można otrzymać przez wysianie zliofilizowanych komórek na skosy agarowe, które inkubuje się w temperaturze 28°C przez 24 godziny. Dla uzyskania biomasy szczepi się 150 ml wymienionego podłoża 15 ml inokulum i wytrząsa na wytrząsarce poziomej przez 36 godzin w temperaturze 28°C. Otrzymaną biomasę odwirowuje się i przemywa dwukrotnie 0,9% roztworem chlorku sodowego.

Przygotowanie immobilizowanego enzymu.

Jedną część biomasy uzyskanej jak wyżej zawieszają się w trzech częściach 0,01M buforu fosforanowego o pH = 8,0 i homogenizuje się w deintegratorze Brauna. Homogenat odwirowuje się przy względnej sile odśrodkowej większej 10 900 razy od przyspieszenia ziemskiego przez 15 minut. Do supernatantu w temperaturze 3°C wkrapla się równą objętość acetonu, ochłodzonego do -10°C. Powstały osad usuwa się przez wirowanie, a z uzyskanego supernatantu wydziela się preparat enzymatyczny przez wkroplenie jednej objętości zimnego acetonu. Odwirowany osad suszy się strumieniem zimnego powietrza uzyskując proszek acetonowy posiadający 93% aktywności wyjściowego supernatantu i 2,5 razy wyższą aktywność swoistą (2,5 mg proszku zawiera 1 mg białka i w pH 8,0 rozkłada w ciągu 1 minuty 0,5 mikromoli N-acetylo-L-fenyloglicyny). Następnie proszek acetonowy rozpuszcza się w 0,01 M buforze fosforanowym o pH = 8,0 w ilości 125 mg na 10 ml. Uzyskany roztwór miesza się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny z 2,5 ml DE-52 celulozą (firmy Whatman) zrównoważonej uprzednio buforem fosforanowym o pH = 8,0.

Nierozpuszczalny preparat odsącza się na lejku Büchnera i przemywa 0,01 M buforem fosforanowym o pH = 8,0, aż do zaniku białka w przesączu. Uzyskany w ten sposób immobilizowany enzym przy pH = 8,0 rozkłada 7 mikromoli N-ace-

tylo-L-fenyloglicyny w przeliczeniu na minutę i na 1 ml preparatu.

Hydroliza N-acetylo-DL-fenyloglicyny.

Przez kolumnę (0,4X1,9 cm) upakowaną immobilizowanym enzymem przepuszcza się w temperaturze 37°C z szybkością 12 ml na godzinę 0,05 M wodny roztwór soli sodowej N-acetylo-DL-fenyloglicyny, uzyskanej jak podano wyżej o pH = 8,0 z dodatkiem 1 milimola $\text{CoCl}_2/1000$ ml. Zbiera się dobowe porcje eluatu, w których oznacza się metodą ninhydrynową powstającą L-fenyloglicynę i polarymetrycznie, pozostałą N-acetylo-D-fenyloglicynę. Wpływ czasu pracy kolumny z immobilizowanym enzymem na hydrolizę roztworu 0,05 M N-acetylo-DL-fenyloglicyny ilustruje wykres przedstawiony na załączonym rysunku.

Do oznaczenia polarymetrycznego pobiera się 3 ml eluatu, który zakwasza się 5 N HCl do pH = 1,0 i trzykrotnie ekstrahuje po 5 ml octanem etylu. Połączone ekstrakty suszy się Na_2SO_4 (bezwodnym). Na 13 ml ekstraktu należy użyć 320 mg bezwodnego Na_2SO_4 . W przesączu stężenie zawartej N-acetylo-D-fenyloglicyny mierzy się przez pomiar skręcalności przy 576 nm. Dla czystej N-acetylo-D-fenyloglicyny rozpuszczonej w octanie etylu wyznacza się $[\alpha]_{576}^{25} = -428$. Uzyskuje się zależność liniową pomiędzy stężeniem N-acetylo-D-fenyloglicyny w octanie etylu, a skręcalnością.

Rozdział produktów hydrolizy enzymatycznej.

Porcję eluatu (700 ml) powstałego przez hydrolizę N-acetylo-DL-fenyloglicyny, zagęszcza się w temperaturze 40°C w wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem do 1/5 objętości wyjściowej. Następnie pH roztworu doprowadza się do 5,6 za pomocą 5 N HCl, a powstałą zawiesinę pozostawia się w temperaturze 4°C na noc. Krystaliczny osad odsącza się i przemywa niewielką ilością wody. Po wysuszeniu w eksykatorze nad bezwodnym CaCl_2 odzyskuje się 1,5 g preparatu o skręcalności $[\alpha]_{576}^{25} = 286/c=1$, 2,5 N HCl. Preparat ten jest chromatograficznie identyczny z L-fenyloglicyną. Powstały przesącz zakwasza się do pH = 1,0 i pozostawia na noc w temperaturze 4°C. Osad odsącza się na lejku Büchnera i suszy w eksykatorze próżniowym. Uzyskuje się 1,96 g preparatu, który posiada $[\alpha]_{576}^{25} = -431/c=1$, etanol/. Preparat ten zidentyfikowano jako N-acetylo-D-fenyloglicynę. Dodatkową porcję (500 mg) tego acetylowanego aminokwasu uzyskuje się z przesączu przez ekstrakcję octanem etylu.

Otrzymywanie D-fenyloglicyny.

840 mg (4,39 mMola) acetylo-D-fenyloglicyny zawieszają się w 10,6 ml 2,5 N HCl (26,4 mMola) i gotuje pod chłodnicą zwrotną przez 14 godzin. Następnie roztwór zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem, a uzyskany suchy osad zawieszają się w H_2O i doprowadza do pH = 5,6. Zawiesinę pozostawia się na noc w temperaturze 4°C i wytrącony krystaliczny osad odsącza na lejku Büchnera, przemywa niewielką ilością zimnej wody i suszy w eksykatorze nad bezwodnym CaCl_2 i NaOH. Otrzymuje się preparat o skręcalności $[\alpha]_{576}^{25} = -287/c=1$, 2,5 N HCl/ zidentyfikowa-

ny chromatograficznie jako D-fenyloglicyna. Racemizacja L-fenyloglicyny.

500 mg L-fenyloglicyny zawieszają się w 6 ml 80% kwasu octowego i gotuje pod chłodnicą zwrotną przez 12 godzin. Po ochłodzeniu lodem osad odsącza się i po przemyciu niewielką ilością wody suszy się w suszarce w 40°C. Wydajność preparacji 450 mg. Uzyskaną DL-fenyloglicynę identyfikuje się następującymi sposobami: polarymetrycznie, $[\alpha]_{576}^{25} = 0/c = 1$, 2,5 N HCl, spektrofotometrycznie w zakresie od 200—400 nm i chromatograficznie. 3 milimole uzyskanej mieszaniny racemicznej fenyloglicyny rozpuszcza się w 2 ml 2 N wodorotlenku sodowego, ochłodzonego lodem i do tak uzyskanego roztworu stale mieszanego, wkrapla się 4,5 milimola bezwodnika octowego, utrzymując pH około 9,0 przez równoczesne wkraplanie 2 N wodorotlenku sodowego.

Następnie roztwór miesza się przez godzinę i doprowadza do pH = 1,0 za pomocą 2 N kwasu solnego. Po całkowitym staniu w lodówce, osad odsącza się i przemywa niewielką ilością zakwaszonej wody, a następnie suszy w eksykatorze próżniowym. Uzyskuje się 2,7 milimola N-acetylo-DL-fenyloglicyny. Z próbki soli sodowej tej substancji immobilizowany enzym uwalnia najwyżej 50% fenyloglicyny.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wydzielania D-fenyloglicyny z mieszaniny racemicznej N-acylo-DL-fenyloglicyny metodą enzymatyczną, przez działanie na wodny roz-

twór racematu immobilizowanym enzymem specyficznie hydrolizującym N-acylo-L-fenyloglicynę, kolejne wyodrębnianie ze środowiska pohydrolytycznego L-fenyloglicyny i następne deacylowanie pozostałej w tym środowisku N-acylo-D-fenyloglicyny do D-fenyloglicyny, **znamienny tym**, że do specyficznej hydrolizy racematu stosuje się immobilizowany enzym otrzymany z homogenatu bakteryjnego w buforze fosforanowym, odwirowanie i wytrącenie z supernatantu za pomocą acetonu, osadu zawierającego enzym, immobilizowanie enzymu przez rozpuszczenie osadu w słabo alkalicznym buforze fosforanowym o pH = 7—8,8 i zmieszanie otrzymanego roztworu z sorbentem w postaci anionitu o silnie rozwiniętej powierzchni sorpcyjnej, korzystnie z DEAE-celulozą.

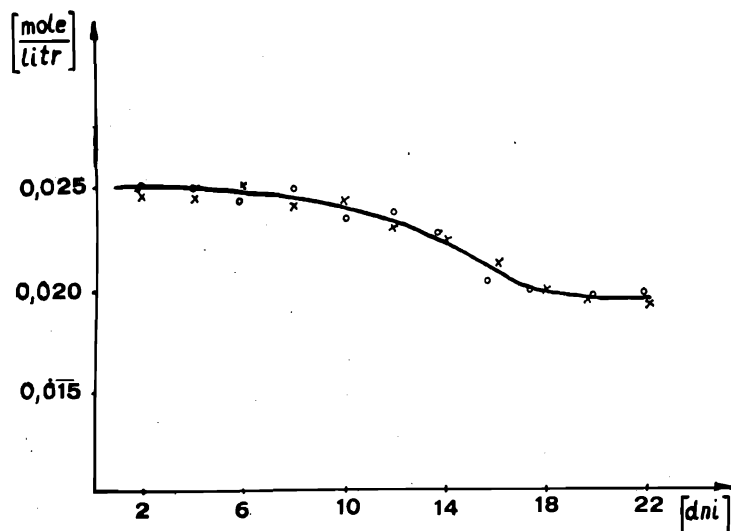
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako N-acylową pochodną DL-fenyloglicyny stosuje się N-acetylo-DL-fenyloglicynę.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że N-acylową pochodną DL-fenyloglicyny stosuje się w postaci wodnego roztworu jej soli sodowej.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że specyficzną hydrolizę racematu prowadzi się na kolumnie upakowanej immobilizowanym enzymem.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że L-fenyloglicynę otrzymaną jako produkt hydrolizy poddaje się racemizacji, przeprowadza w pochodną acylową i zawraca do obiegu.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się enzym wytwarzany przez szczep *Micrococcus agilis* CCM 2131.



○—○ stężenie fenyloglicyny

×—× stężenie N-acetylo-D-fenyloglicyny