



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

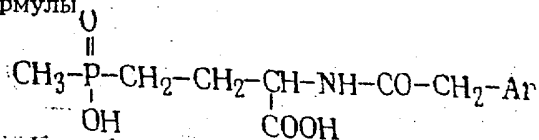
ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

- (21) 3375844/28-13
(22) 21.12.81
(31) P 30 48 612.5
(32) 23.12.80
(33) DE
(46) 23.07.86. Бюл. № 27
(71) Хехст АГ (DE)
(72) Сузанне Граблей и Клаус Заубер
(DE)
(53) 668.394(088.8)
(56) Заявка ФРГ № 2732301,
кл. С 07 F 9/13, опублик. 1979.
Заявка ФРГ № 2939269,
кл. С 07 F 9/30, опублик. 1980.

(54) (57) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-2-АМИНО-4-МЕТИЛФОСФИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ пу-

тем ферментативного гидролиза ацилазой в водной среде производного N-ацил-D, L-2-амино-4-метил-фосфиномасляной кислоты с последующим выделением целевого продукта, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода изомера L-фосфинотрицина, в качестве производного используют N-арилацетильное производное общей формулы



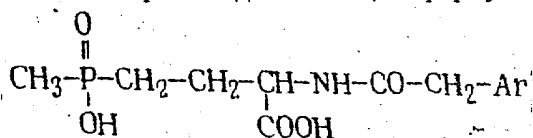
где Ar - фенил,
а из ацилаз используют пенициллин-G-ацилазу, выделенную из *Escherichia coli* AMCC 11105.

Изобретение относится к производству аминокислот, а именно к способу получения L-2-амино-4-метилфосфиномасляной кислоты ферментативным путем.

Целью изобретения является повышение выхода изомера L-фосфинотрицина.

Способ осуществляется следующим образом.

Готовят водный раствор N-арилацетильного производного общей формулы



где Ar - фенил,

и осуществляют ферментативный гидролиз ацилазой, в качестве которой используют пенициллин-G-ацилазу, выделенную из *Escherichia coli* AMCC 11105. Затем после окончания процесса из образовавшейся смеси, состоящей из L-2-амино-4-метилфосфиномасляной кислоты (L-ФТЦ), N-фенилацетил-D-2-амино-4-метилфосфиномасляной кислоты (N-фенилацетил-D-ФТЦ) и фенилуксусной кислоты, можно выделить L-ФТЦ, отличающуюся высокой степенью чистоты.

Пример 1. Берут 10 г (33,4 ммоль) N-фенилацетил-D,L-ФТЦ и суспендируют в небольшом количестве дважды дистиллированной воды. Затем доводят pH суспензии путем добавления н. раствора гидроокиси натрия до 7,8, после чего добавляют дистиллированную воду до получения 500 мл раствора.

В него вносят 15 мг пенициллин-G-ацилазы в виде лиофилизата, выделенной из *Escherichia coli* AMCC 11105, и полученную реакционную смесь выдерживают 15 ч при комнатной температуре, после чего отбирают пробу и устанавливают путем окрашивания ее нингидрином содержание свободной аминокислоты. В данном случае степень превращения составляет около 50%. Затем с помощью концентрированной соляной кислоты доводят pH смеси до 2,0-3,0, фильтруют и полученный прозрачный раствор субстрата пропускают через колонку, заполненную 150 г Daeuca (R) 50 W x 2 (H⁺-форма).

После этого колонку промывают водой до выхода из нее нейтрального и не содержащего ионов хлора элюата, а затем 0,8 н. раствором хлористого водорода в смеси с этиловым спиртом

и водой из колонки вымывают свободную аминокислоту в виде гидрохлорида.

Из упаренного элюата получают чистый гидрохлорид ФТЦ с т.пл. 199-200°C. Выход составляет 3,3 г (15,2 ммоль) = 45,4%.

Из гидрохлорида путем обработки окисью пропилена получают свободную кристаллическую L-аминокислоту с т.пл. 217-219°C и удельным углом вращения $[\alpha]_D^{22} = +28^\circ$.

Пример 2. Берут 60 г (200,5 ммоль) N-фенилацетил-D,L-ФТЦ и смешивают с небольшим количеством воды. Затем раствором гидроокиси натрия доводят pH суспензии до 8,0. После этого добавляют воду до объема суспензии, равного 1,0 л, и смешивают с фиксированной пенициллин-G-ацилазой (активность примерно равна 80 В/г). Полученную реакционную смесь перемешивают 1,5 г, а затем отделяют фильтрацией нерастворимый в воде катализатор. Полученный фильтрат пропускают через колонку, заполненную 750 г сильно кислотной катионообменной смолы.

Дальнейшую обработку раствора ведут по примеру 1.

В результате получают 20 г (92 ммоль = 46%) гидрохлорида L-ФТЦ с т.пл. 199-201°C, удельным углом вращения $[\alpha]_D^{22} = 23,3^\circ$ и молярным вращением $[\mu]_D^{22} = 50,7$.

Полученная после обработки гидрохлорида окисью пропилена свободная L-ФТЦ имеет т.пл. 216-217°C, удельный угол вращения $[\alpha]_D^{22} = +28,5^\circ$ и молярное вращение $[\mu]_D^{22} = 51,6^\circ$.

Пример 3. С целью исследования стабильности, связанной с носителем пенициллин-G-ацилазы, используемой в примере 2, по отношению к N-фенилацетил-D,L-ФТЦ, 100 мг фиксированного фермента смешивают с 10 мл 5%-ного водного раствора N-фенилацетил-D,L-ФТЦ (pH суспензии стабилизируют на уровне 7,8 путем добавления фосфатного буфера). Полученную смесь перемешивают при комнатной температуре. Через 24 ч раствор субстрата фильтруют, отделяют фермент и вновь смешивают с раствором субстрата.

Активность фермента измеряют по содержанию свободной ФТЦ через 45 мин и через 22,5 ч путем окрашивания проб нингидрином.

Значительного уменьшения стабильности, связанной с носителем пенициллин-

-С-амилазы, не было обнаружено спустя 8 недель. В каждом случае через 45 мин с начала реакции гидролизовалось около 20%, а спустя 22,5 ч около 50% в расчете на примененную рацемическую смесь.

Пример 4. Для получения фиксированной пенициллин-С-амилазы берут коллагеновые мембраны, их активируют по методике Кулэ, а затем смачивают 2 мл раствора пенициллин-С-амилазы, содержащего 0,1 моль фосфата калия с

рН 8,0, 0,25 моль ацетата натрия, и 0,024%-ным раствором водного азидата натрия. Мембраны в этой смеси выдерживают 4 ч при 4°С, а затем промывают 1 М раствором хлористого натрия и 50 ммоль калийфосфатного буфера (рН равна 7,0).

Полученный материал вводят в реакцию описанным в примере 2 образом с 60 г N-фенацетил-D-L-ФТЦ. В результате получают L-ФТЦ с тем же уровнем оптической чистоты, что и гидрохлорид L-ФТЦ по примеру 2.

Составитель М. Андреева

Редактор А. Шандор

Техред Г. Гербер

Корректор Г. Решетник

Заказ 4030/60

Тираж 490

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

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

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4