PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:
2002 - 224

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
C 12 N 15/55
C 12 N 11/08
C 12 N 9/80
C 12 P 41/00
C 12 P 13/04

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17.06.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **20.07.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/19933362**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.06.2002**
(Věstník č. 6/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/EP00/05586**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/05982**

(71) Přihlašovatel:
AVENTIS CROPSCIENCE GMBH, Frankfurt, DE;

(72) Původce:
Bartsch Klaus, Königstein, DE;

(74) Zástupce:
Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob výroby L-aminokyselin z jejich racemických N-acetyl-D,L-derivátů enzymatickým štěpením racemátu pomocí isolovaného, rekombinantního enzymu

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu výroby proteinogenních nebo neproteinogenních L-aminokyselin z racemických N-acetyl-D,L-derivátů, při kterém se (a) enzymatickým štěpením racemátu pomocí isolovaného rekombinantního enzymu selektivně deacetylují N-acetyl-L-deriváty korespondujících L-aminokyselin, zatímco se N-acetyl-D-deriváty korespondujících D-aminokyselin nedeacetylují a (b) získané deacetylované L-aminokyseliny se preparativně od nedeacetylovaných N-acetyl-D-derivátů a/nebo neúplně deacetylovaných N-acetyl-L-derivátů oddělí.

CZ 2002 - 224 A3

18.01.02
PV 2002-127
5720

Způsob výroby L-aminokyselin z jejich racemických N-acetyl-D,L-derivátů enzymatickým štěpením racemátu pomocí isolovaného, rekombinantního enzymu

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu výroby L-aminokyselin z jejich racemických N-acetyl-D,L-derivátů enzymatickým štěpením racemátu pomocí isolovaného, rekombinantního enzymu.

Dosavadní stav techniky

Výroba neproteinogenní aminokyseliny L-PPT (L-fosfinothricin) dělením racemátu byla dosud popsána s vysokou čistotou a výtěžkem pouze štěpením fenacetyl-fosfinothricinu pomocí penicillin-G-acylasy z Escherichia coli (DE-A-3048612). Syntesa fenacetyl-PPT je ale ve srovnání s N-Ac-PPT nákladnější a dražší. Avšak penicillin-G-acylasa nemá žádnou specifitu pro alifatické acylové zbytky a tím také ne pro N-Ac-PPT. Jiné známé acylasy nemají rovněž žádnou nebo pouze nepatrnou substrátovou specifitu pro N-Ac-PPT a byly dosud použity pouze v mikrobiálních biotransformacích bez vyčištění enzymu (jak je například popsáno v DE-A-2939269). Tím byly dosažitelné pouze velmi nepatrné výtěžky za jednotku času na jednotku prostoru. Z patentové přihlášky EP-A-0382113 je známé L-specifické štěpení N-Ac-PPT esterů karboxylových kyselin acylasou I . Také tento enzym nemá však žádnou specifitu pro volné karboxylové kyseliny a vyžaduje proto esterifikaci jako dodatečný syntesní krok při přípravě substrátu.

Patentová přihláška DE-A-19652284 popisuje cílenou isolaci mikrobiálních deacetylas z půdních vzorků se specifitou pro N-acetyl-aminokyseliny, výhodně N-acetyl-fosfinothricin (N-Ac-PPT), jakož i klonování korespondujících genů ze Stenotrophomonas sp. a Comamonas acidovorans.

Na základě zjištěné sekvenční homologie a provedeného testu substrátové specifity mohlo být ukázáno, že popisované deacetylasy patří ke skupině hippurát-hydrolas (EC 3.5.1.32), jejichž přírodní substrát je N-benzoyl-glycin, derivát aminokyseliny s aromatickou N-acylovou funkcí. Proto bylo zajímavé, že tyto enzymy mohou také akceptovat jako substrát N-acetylované aminokyseliny, obzvláště N-acetyl-fosfinothricin, přičemž se jedná o deriváty aminokyselin s N-acylovými funkcemi. Z patentových přihlášek DE-A-2939269 a DE-A-2717440 je známé, že herbicidní účinek racemického fosfinothricinu samotného vychází z jeho L-enantiomeru (L-PPT).

V této souvislosti bylo zajímavé, že zjištěné deacetylasy štěpí s vysokou specifitou kromě L-enantiomerů N-acetyl-PPT rovněž N-acetyl-deriváty některých proteinogenních aminokyselin. Proto jsou vhodné tyto enzymy výborně pro výrobu L-aminokyselin, obzvláště herbicidní účinné látky L-fosfinothricinu, z jejich racemických N-acetyl-derivátů podle principu štěpení racemátů, jak je popsáno například v patentových přihláškách EP-A-0304021, DE-A-2939269 a DE-A-3048612.

Podstatné nevýhody ve třech výše uvedených patentových přihláškách však spočívají v tom, že (1) se mohou používat pouze nepatrné koncentrace substrátu (asi 0,5 % v případě

patentové přihlášky DE-A-2939269), čímž je technická způsobilost hodnocena jako nepatrná, že (2) se pracuje s neisolovanými enzymy, čímž se problematika vedlejších reakcí a následujících čistících kroků nedá řešit nebo se řeší za vysokých nákladů na cenu a že (3) je zapotřebí cenově nákladné přípravy produktu (jako je tomu v případě patentové přihlášky DE-A-3048612).

Úkol předloženého vynálezu spočívá v tom, exprimovat jednu nebo více nových deacetylas (jaké jsou již charakterisované v DE-A-19652284) ve vhodné formě a množství a umožnit pomocí těchto enzymů vyrobení L-PPT jakož i některých proteinogenních L-aminokyselin z chemicky velmi jednoduše přístupných N-acetyl-D,L-derivátů, štěpením racemátu s vysokými výtěžky a enantiomerní čistotou.

V případě, že enzymatická aktivita je již přibližně známá a ve kterém také již bylo provedeno klonování enzym kodující sekvence nukleových kyselin, spočívá první činnost v tom, že se převede odpovídající fragment nukleové kyseliny na vhodý vektor aby se potom prováděla nadprodukce ve vhodném bakteriálním kmenu a/nebo aby se po nadexpresi isoloval. Takto isolovaný enzym se může buď použít přímo pro enzymatickou reakci nebo se ale přes vhodné kopulační skupiny fixuje na matrici.

Je možno doporučit první enzymatický test, aby se získalo základní potvrzení, zda probíhá požadovaná reakce. Všechny další kroky slouží optimalisaci parametrů se zřetelem na specifitu reakce (vztaženo na edukt a produkt), reakční rychlost, specifitu reakce, doba trvání poloviny reakce s použitým enzymem, jakož i možné koncentrace substrátu. V případě, že jednotlivé parametry neodpovídají

přesně požadavkům, je možno provést vhodné změny na sekvenci aminokyselin, kodující enzym, která by měla za následek další optimalisaci předmětného přírodního enzymu.

Klonování jednotlivě používaných deacetylas bylo již popsáno v přihlášce DE-A-19652284. Pro odpovídající deacetylasy kodující fragmenty nukleových kyselin byly, jak je uvedeno v příkladě 1 a dále, překlonovány na odpovídající expresní vektory, aby se tím zajistila nutná míra jednoznačné substrátové specifity a nepřítomnost vedlejších reakcí. Tak mohla přihláška DE-A-19652284 sice ukázat, že N-acetyl-L-PPT je deacetylován, avšak nemohlo být ukázáno, že N-acetyl-D-PPT není rovněž deacetylován. Závěrečná reakce N-acetyl-L-aminokyselin a N-acetyl-L-PPT představuje však elementární výhradu pro zde zamýšlené technické řešení.

Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu je způsob výroby proteinogenních nebo neproteinogenních L-aminokyselin z racemických N-acetyl-D,L-derivátů, jehož podstata spočívá v tom, že se

(a) enzymatickým štěpením racemátu pomocí isolovaného, rekombinantního enzymu, selektivně deacetylují N-acetyl--L-deriváty korespondujících L-aminokyselin, zatímco se N-acetyl-D-deriváty korespondujících D-aminokyselin nedeacetylují

a

(b) získané deacetylované L-aminokyseliny se preparativně od

nedeacetylovaných N-acetyl-D-derivátů a/nebo neúplně deacetylovaných N-acetyl-L-derivátů oddělí.

Vynález se týká obzvláště způsobu výroby L-fosfinothricinu (L-PPT) z N-acetyl-D,L-fosfinothricinu enzymatickým štěpením racemátu pomocí isolovaného rekombinantního enzymu.

Dále se vynález týká způsobu výroby kyseliny L-glutamové, L-histidinu, L-leucinu, L-glutaminu a/nebo L-fenylalaninu z jejich korespondujících N-acetyl-D,L-derivátů enzymatickým štěpením racemátu.

Dále se týká vynález způsobu, jehož podstata spočívá v tom, že se enantioselektivní výroba jedné nebo více L-aminokyselin z jejich korespondujících racemických N-acetyl-D,L-derivátů provádí s jednou nebo více deacetylas ze skupiny hippurat-hydrolas, přičemž se obzvláště provádí enantioselektivní výroba L-fosfinothricinu, kyseliny L-glutamové, L-histidinu, L-leucinu, L-glutaminu a/nebo L-fenylalaninu z jejich korespondujících racemických N-acetyl-D,L-derivátů s jednou nebo více deacetylas ze skupiny hippurat-hydrolas.

Obzvláště se vynález týká způsobu, jehož podstata spočívá v tom, že se enantioselektivní výroba jedné nebo více L-aminokyselin z jejich korespondujících racemických N-acetyl-D,L-derivátů provádí s enzymy deac 1 ze Stenotrophomonas sp. a/nebo deac 2 ze Comamonas acidovorans (obě deacetylasy jsou popsané v DE-A-19652284) a při tom zcela obzvláště způsobu, jehož podstata spočívá v tom, že se enantioselektivní výroba L-fosfothricinu, kyseliny glutamové, L-histidinu, L-leucinu, L-glutaminu a/nebo L-fenylalaninu z jejich korespondujících racemických N-acetyl-D,L-de-

rivátů provádí s enzymy deac 1 ze Stenotrophomonas sp. a/nebo deac 2 ze Comamonas acidovorans (obě deacetylasy jsou popsané v DE-A-19652284). Oba enzymy mají signifikantní sekvenční homologii, která poskytuje identicklou nebo alespoň podobnou funkci při štěpení N-acetyl-D,L-derivátů.

Dále se týká vynález použití vyrobených rekombinantních deacetylas jako biokatalyzátorů, které dovolují provádění odpovídajících reakcí s vysokými koncentracemi substrátu a/nebo za dosažení vysokých výtěžků za jednotku času na jednotku prostoru, obzvláště za použití rekombinantních deacetylas v imobilisované formě.

Dále se vynález týká provádění výše popsaného způsobu při reakčních teplotách asi v rozmezí 25 ^{o}C až 65 ^{o}C , výhodně při reakčních teplotách asi 30 ^{o}C až 45 ^{o}C a obzvláště výhodně asi 35 ^{o}C až 40 ^{o}C .

Dále se týká vynález provádění výše popsaného způsobu při koncentracích substrátu asi 10 mM až 1500 mM , výhodně při koncentracích substrátu vyšších než 50 mM, obzvláště výhodně při koncentracích substrátu vyšších než 250 mM a zcela obzvláště výhodně při koncentracích substrátu vyšších než 500 mM.

Dále se vynález týká dělení L-aminokyselin nebo L-PTC, vyrobených pomocí výše popsaných kroků, od korespondujících N-acetyl-D,L-derivátů, které buď - jako v případě N-acetyl--D-derivátů - nezreagovaly nebo -jako v případě N-acetyl-L--derivátů - nezreagovaly úplně. Využitelné způsoby jsou při tom použití iontoměničové chromatografie na kyselém iontoměniči nebo také extrakce N-acetyl-D,L-derivátů pomocí organického rozpouštědla, jako je například methylisobutyl-

keton, přičemž před tím vyrobené L-aminokyseliny nebo L-PTC přechází do vodné fáze, ze které se potom zakoncentruje sušením.

Příklady provedení vynálezu

1. Produkce deac-enzymu jako rekombinantního proteinu z Escherichia coli

Deac 1-strukturní gen ze Stenotrophomonas sp., kodující pro N-Ac-PPT-specifickou deacetylasu, byl klonován jako 1,4-kb BamHI/Sall fragment (popsáno v DE-A-19652 284) do BamHI/Sall-štěpného místa HisTag-expresního vektoru pQE30 firmy Quiagen [Quiaexpress Kit, Type IV, Katalog Nr. 32149, Stüber a kol. (1990), Immunological Method, Lefkovits I. a Pernis B., eds., vol. IV, Academic Press, New York, pp, 121-152].

Všechny molekulárně biologické práce se provádějí podle standardních protokolů, jak je například popsáno v publikaci Ausubel a kol. (1995), Current Protocolos in molecular biology, John Wiley and Sons, New York. Religovaný konstrukt byl transformován do výrobcem (Quiagen) doporučovaného bakteriálního kmene E. coli M15 a rekombinantní klony byly selektovány na 100 µg/ml ampicilinu a 25 µg/ml kanamycinu. Exprese rekombinantního fusního proteinu byla indukována přídavkem 1 mM UPTG . Buňky byly 4 až 5 hodin po indukci odděleny a až do zpracování proteinu udržovány při teplotě -20 ^{o}C .

Pomocí SDS/polyakrylamidové elektroforesy buněčného aliquotu indukovaných klonů mohl být dokázán HisTag-deac 1-

-fusní protein jako dodatečé pásy 49-kDa.

Důkaz enzymatické aktivity deacetylasového fusního proteinu se prováděl v radioaktivním assay pomocí [^{14}C]--N-acetyl-L-PPT jako substrátu. K tomu se permeabilisuje 200 µl indukované kultury s 0,5 % toluenu a 0,5 % ethylalkoholu po dobu 30 minut při teplotě 37 ^{o}C . Buněčné pelety se potom resuspendují ve 25 µl 0,1 mM [^{14}C]-N-acetyl-L-PPT, 10 mM chloridu sodného a 10 mM fosforečnanu sodného, pH = 7,5 a inkubují se po dobu jedné hodiny při teplotě 37 ^{o}C . Pro kvantitativní stanovení [^{14}C]-L-PPT se analysuje 5 µl aliquotu testované vsázky pomocí chromatografie na tenké vrstvě na destičlách HPTLC-celulosy (Merck) za použití pohyblivé fáze n-propanol/amoniak (3 : 2). Radioaktivní pásy jsou patrné při použití autoradiografie na rentgenovém filmu.

Pro kvantifikaci enzymové reakce byly testované vsázky měřeny v radio-HPLC se Spheriosorbem^{R} SAX jako dělícím sloupcem (pohyblivá fáze : 5 mM KH_2PO_4, 10 % methylalkohol, pH = 1,92, hodnota toku : 0,5 ml/min). Za těchto podmínek eluuje [^{14}C]-L-PPT okolo 4,5 minut a [^{14}C]-N-acetyl-L-PPT okolo 6,5 minut.

Expresní klon s nejvyšší N-acetyl-L-PPT-specifickou deacetylasovou aktivitou produkuje deacetylasa-protein podle semikvantitativního stanovení s podílem asi 10 % celkového proteinu a byl použit pro čištění enzymu a dále popsané biotransformace.

18.01.02

2. Čištění deacetylasy afinitní chromatografií

Isolace deacetylasa-proteinu z podle příkladu 1 popsaného klonování, nově uvedeného expresního kmene pQEDEAC, se provádí podle Quiagen-protokolu (Quiaexpress--Kit) afinitní chromatografií na nikl-nitrioacetátové matrici (Ni-NTA) za nativních podmínek. K tomu se fermentuje a indukuje 800 ml expresního kmene pQEDEAC, jak je popsáno v příkladě 1 . Získané buněčné pelety (4 g) se resuspendují ve 20 ml lysního pufru a rozloží se ultrazvukem. Po odstředění se čirý lysát proteinu (120 mg celkového proteinu) smísí se 4 ml 50% Ni-NTA-suspense pro vazbu HisTag-fusního proteinu a materiál se potom nanese na enzymový sloupec. Afinitní matrice se promyje 10 objemy promývacího pufru a potom se eluuje 4 ml elučního pufru. Pro přezkoušení afinitního čištění se aliquoty buněčného rozkladu, promývacích roztoků a eluátu analysují pomocí SDS/polyakrylamid-gelové elektroforesy. Aktivita deacetylasy různých proteiny obsahujících frakcí byla stanovována pomocí radioaktivních assay, popsaných v příkladě 1 (reakční vsázka : 9 µl roztoku proteinu + 1 µl 1 mM [^{14}C]-N-acetyl-L-PPT, reakční podmínky : viz výše). Pro kvantitativní stanovení enzymu byly frakce proteinu inkubovány s 50 mM N-acetyl-D,L--PPT (9 µl roztoku proteinu + 1 µl 500 mM N-acetyl-D,L--PPT) po dobu 30 minut při teplotě 37 ^{o}C . Získaný PPT byl potom měřen v analysátoru aminokyselin (Biotronic LC 5001).

Protein v surovém extraktu po rozložení buněk měl specifickou aktivitu deacetylasy 3 nkat/mg proteinu (1 nkat = 1 nmol substrátu/s). Z 800 ml kultury expresního kmene mohlo být isolováno afinitní chromatografií 10 mg HisTag--deac-fusního proteinu se specifickou aktivitou 20 nkat/mg proteinu a čistotou asi 80 % .

18.01.02

3. Substrátová specifita a stereoselektivita deacetylasy

Pro zkoušku substrátové specifity a stereospecifity deac 1-proteinu bylo inkubováno 5 µg čištěného enzymu ve 20 µl vsázek v 10 mM NaCl, 10 mM fosforečnanu sodného, pH = = 7,5 se vždy 25 mM v tabulce 1 uvedených N-acetyl-L-aminokyselin, popřípadě odpovídajících D-enantiomerů. Pro srovnání byla použita kyselina hippurová (N-benzoyl-glycin) jako přírodní substrát deacetylasy. Vzorky byly inkubovány po dobu jedné hodiny při teplotě 37 ^{o}C a potom byly zkoušeny na tvorbu volných aminokyselin v analysátoru aminokyselin (Biotronic LC 5001). V tabulce 1 jsou uvedeny relativní aktivity deacetylasy pro L-enantiomery různých substrátů. Vedle kyseliny hippurové a N-Ac-L-PPT štěpí deac 1-enzym také ještě N-acetyl-deriváty řady přírodních aminokyselin, obzvláště N-Ac-L-glutamové kyseliny, N-Ac-glycinu, N-Ac-L--histidinu, N-Ac-L-ornithinu, N-Ac-L-leucinu, N-Ac-L-glutaminu a N-Ac-L-fenylalaninu. Ve všech případech byl enzym aktivní výhradně s L-enantiomery, zatímco odpovídající D-sloučeniny nemohly být v žádném případě zreagované. Ve všech případech (viz tabulka 1) probíhala reakce N-acetyl--L-derivátu pouze ve velmi nepatrné míře nebo neprobíhala vůbec.

18.01.02

T a b u l k a 1 : Substrátová specifita deac-enzymu

Substrát[1]	Rel. aktivita[2] [%]
kyselina hippurová (N-benzoyl-glycin)	100
N-Ac-L-fosfinothricin	43
N-Ac-L-ornithin	37
N-Ac-L-methionin	0
N-Ac-L-tryptofan	0,4
N-Ac-L-fenylalanin	24
N-Ac-L-tyrosin	11
N-Ac-L-glutamová kyselina	100
N-Ac-L-glutamin	30
N-Ac-L-glycin	59
N-Ac-L-histidin	43
N-Ac-L-leucin	33
N-Ac-L-valin	2
N-Ac-L-serin	4
N-Ac-L-prolin	0

1 : U všech sloučenin se jedná o L-enantiomery

2 : Specifická aktivita, naměřená s kyselinou hippurovou [nmol glycinu/min/mg proteinu] byla stanovena jako 100 % a ostatní hodnoty jsou k tomu vztahované

18.01.02

4. Štěpení racemátu N-acetyl-D,L-fosfinothricinu biotransformací s buňkami deac-produkčního kmene

400 ml kulturyexpresního kmene pQEDEAC byla fermentovaná a inkubovaná stejně, jako je popsáno v příkladě 1. Oddělené buňky se potom promyjí v 10 mM NaCl, 10 mM fosforečnanu sodného, pH = 7,5 a přes noc se lyofilisují. Takto zpracované buňky se mohou skladovat mnoho týdnů při teplotě 4 ^{o}C za zachování vysoké specifické deacetylasové aktivity a mohou sloužit v následujících pokusech jako biokatalyzátor.

2 mg lyofilisovaných buněk se resuspendují v 1 ml následujících roztoků substrátů s různými koncentracemi.

(1) 10 mM N-acetyl-D,L-PPT, dvojsodná sůl (0,3 %)
(2) 50 mM N-acetyl-D,L-PPT, dvojsodná sůl (1,3 %)
(3) 100 mM N-acetyl-D,L-PPT, dvojsodná sůl (2,6 %)
(4) 250 mM N-acetyl-D,L-PPT, dvojsodná sůl (6,7 %)
(4) 500 mM N-acetyl-D,L-PPT, dvojsodná sůl (13,3 %)

Vsázky obsahovaly jako reakční pufr 10 mM NaCl, 10 mM fosforečnanu sodného, pH = 8,0 a byly inkubovány po dobu 48 hodin na třepačce při 100 otáčkách za minutu a při teplotě 37 ^{o}C . Volný PPT , vytvořený při hydrolysní reakci, se stanovuje v analysátoru aminokyselin (Biotronic LC 5001). Získané výsledky jsou shrnuté v tabulce 2. Čistota enantiomerů reakčního produktu byla analysovaná pomocí chirální HPLC s dělícím sloupcem Chirex^{R}(D) Penicilamin (Phenomenex). Jako pohyblivá fáze bylo použito 2 mM $CuSO_4$, 10 % methanolu s hodnotou toku 0,5 ml/min. Detekce se prováděla fotometricky při 254 nm. Za těchto podmínek eluují referenční

roztoky L-PPT okolo 17 minut a D-PPT okolo 21 minut. Ve všech testovaných vzorcích mohl být jao reakční produkt dokázán pouze L-PPT. Dosažené konversní hodnoty [produkovaný L-PPT/N-acetyl-L-PPT v substrátu x 100] ležely v rozmezí 100 % u nízkých koncentrací substrátu (10 mM, 50 mM) a 66 % u nejvyšších použitých koncentrací substrátu (500 mM).

T a b u l k a 2 : Štěpení racemátu N-acetyl-D,L-PPT v závislosti na koncentraci substrátu

Roztok substrátu N-Acetyl-D,L-PPT [mM]	Roztok produktu* L-PPT [mM]	Hodnota konverse L-PPT/N-Acetyl-D,L-PPT [%]
10	5	100
50	25	100
100	48	96
250	108	86
500	164	66

* : Koncentrace biokatalyzátoru : 2 mg/ml

V následujícím pokusu byla koncentrace biokatalyzátoru zvýšena a byla zachycena reakční kinetika štěpení substrátu. 13 mg lyofilisovaných buněk se resuspenduje v 1 ml roztoku substrátu, sestávajícího z 500 mM dvojsodné soli N-acetyl-D,L-PPT (13,3 % w/v), 10 mM NaCl a 10 mM fosforečnanu sodného, pH = 8,0 a inkubuje se na třepačce při 100 otáčkách za minutu a při teplotě 37 ^{o}C . Pro stanovení vytvořeného L-PPT v časovém období 55 hodin odebere vždy 50 µl alikvotu z reakční vsázky, odstředí se a kapaliny se až do

18.01.02

analysy zmrazí při teplotě -20 °C . Kvantitativní analysa reakčního produktu L-PPT , jakož i stanovení čistoty enantiomeru byly prováděny způsoby, uvedenými výše. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 3 . Za zvolených podmínek bylo L-specifické štěpení substrátu po asi 55 hodinách ukončeno. Při tom bylo dosaženo hodnot konverse asi 90 % a výtěžku za jednotku času na jednotku prostoru 483 [mg L-PPT/g biokatalyzátoru/h].

T a b u l k a 3 : Reakční kinetika štěpení racemátu N-acetyl-D,L-PPT

Reakční doba [h]	L-PPT [mM]*
0	0
1	27,7
4	59,7
9	106,0
23	181,6
31	186,5
47	208,6
55	221,8

* : Koncentrace biokatalyzátoru : 13 mg/ml ; koncentrace substrátu : 500 mM N-acetyl-D,L-PPT

5. Imobilisace čištěného deac-proteinu

Aby se mohla provést enzymová reakce s isolovaným deac-proteinem, imobilisuje se v příkladě 2 jako HisTag-fusní protein čištěný enzym na polymerní nosič VINA-Epoxy

Biosynth^{R} (Riedel de Haen). K tomu se deac-protein zakoncentruje pomocí srážení síranem amonným na 15 mg/ml a dialysuje se přes noc proti 1 M fosforečnanu sodného, pH = 8,0. Pro standardní kopulační reakci se 10 mg proteinu pomalu třepe se 100 mg nosiče VINA po dobu 2 dnů při teplotě místnosti. Potom se imobilisát odstředí a promyje se jednou v imobilisačním pufru a v 50 mM fosforečnanu sodného, pH = 7,0 . Pro blokování volných epoxy-skupin se nosič potom inkubuje po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti s 50 mM fosforečnanu sodného, pH = 7,0 a 50 mM 2-merkaptoethanolu. Biokatalyzátor se potom skladuje v 1 ml 5 mM fosforečnanu sodného, pH = 7,0 a 0,02 % azidu sodného při teplotě 4 ^{o}C. Pro stanovení kopulace proteinu se stanovuje obsah proteinu v roztoku před a po imobilisaci, jakož i v promývacích roztocích pomocí Bradfordovy metody [Bradford (1976), Anal. Biochem. 72 : 248-254]. Specifická aktivita deacetylasy byla měřena před a po imobilisaci pomocí radioaktivního assay, popsaného v příkladě 1 . Relativní aktivita enzymu byla po kopulaci > 90 % hodnoty, zjištěné pro rozpuštěný protein.

6. Štěpení racemátu N-acetyl-D,L-fosfinothricinu imobilisovaným deac-enzymem ve sloupcovém reaktoru

1 g imobilisátu enzymu (vlhká hmotnost) se nanese na sloupcový reaktor a použije se jako biokatalyzátor pro štěpení racemátu různě koncentrovaných roztoků substrátu s různými hodnotami toku. Roztoky substrátu obsahují v tabulce 4 uvedené koncentrace N-acetyl-D,L-PPT, diamoniovou sůl v 10 mM NaCl a 10 mM fosforečnanu sodného, pH = 8,0. Reakce se provádějí při teplotě 37 ^{o}C po dobu celkem 10 dnů. Reakce se kvantifikují stanovením L-PPT, přítomného v lát-

ce, která proteče reaktorem, pomocí analysy aminokyselin a chirální HPLC (viz příklad 4). Výsledky jsou uvedené v tabulce 4 . Nejvyšší hodnota konverse 83 % byla dosažena s nejvyšší koncentrací substrátu (500 mM) a s nejnižší hodnotou toku substrátu (0,03 ml/min). Výtěžek za jednotku času na jednotku prostoru stoupá s hodnotou toku a koncentrací substrátu a dosahuje nejvyšší hodnoty 181 [mg L-PPT/g biokatalyzátoru/h] při koncentraci substrátu 500 mM a toku 0,3 ml/min. Imobilisovaná deacetylasa vakazuje po celou dobu trvání pokusu dobrou stabilitu a má po 10 dnech při teplotě 37 ^{o}C ještě asi 80 % původní aktivity.

T a b u l k a 4 : Štěpení racemátu N-acetyl-D,L-PPT imobilisovaným deac-enzymem ve sloupcovém reaktoru

Roztok substrátu N-Acetyl-D,L-PPT [mM]	hodnota toku [ml/min]	roztok produktu L-PPT [mM]	hodnota konverse [%]	výtěžek za čas na prostor [mg L-PPT/g bio-katalyzátor/h]*
100	0,1	29,7	59	39
	0,3	22,0	44	87
	0,5	13,8	28	91
250	0,1	38,4	31	50
	0,3	25,0	20	99
	0,5	18,1	14	119
500	0,1	71,1	28	93
	0,3	46,0	18	181
	0,5	26,3	11	173
500	0,03	208,2	83	82

*: Reakce při teplotě 37 °C

18.01.02
PV 2002-124
1740

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PRAHA 2

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby proteinogenních nebo neproteinogenních L-aminokyselin z racemických N-acetyl-D,L-derivátů, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se

(a) enzymatickým štěpením racemátu pomocí isolovaného rekombinantního enzymu selektivně deacetylují N-acetyl--L-deriváty korespondujících L-aminokyselin, zatímco se N-acetyl-D-deriváty korespondujících D-aminokyselin nedeacetylují

a

(b) získané deacetylované L-aminokyseliny se preparativně od nedeacetylovaných N-acetyl-D-derivátů a/nebo neúplně deacetylovaných N-acetyl-L-derivátů oddělí.

2. Způsob podle nároku 1 pro výrobu L-fosfinothricinu (L-PPT) z N-acetyl-D,L-fosfinothricinu.

3. Způsob podle nároku 1 pro výrobu kyseliny L-glutamové, L-histidinu, L-leucinu, L-glutaminu a/nebo L-fenylalaninu z korespondujících N-acetyl-D,L-derivátů.

4. Způsob podle jednoho nebo více z nároků 2 až 3 , v y z n a č u j í c í s e t í m , že se provádí enantioselektivní výroba jedné nebo více L-aminokyselin z jejich korespondujících racemických N-acetyl-D,L-derivátů s jednou nebo více deacetylasami ze skupiny hippurát-hydrolas.

5. Způsob podle jednoho nebo více z nároků 2 až 3 , v y z n a č u j í c í s e t í m , že se provádí enantioselektivní výroba L-fosfinothricinu, kyseliny L-glutamové, L-histidinu, L-leucinu, L-glutaminu a/nebo L-fenylalaninu z jejich korespondujících racemických N-acetyl-D,L-derivátů s jednou nebo více deacetylasami ze skupiny hippurat-hydrolas.

6. Způsob podle jednoho nebo více z nároků 2 až 3 , v y z n a č u j í c í s e t í m , že se provádí enantioselektivní výroba jedné nebo více L-aminokyselin z jejich korespondujících racemických N-acetyl-D,L-derivátů s enzymy deac 1 ze Stenotrophomonas sp. a/nebo deac 2 z Comamonas acidovorans.

7. Způsob podle jednoho nebo více z nároků 2 až 3 , v y z n a č u j í c í s e t í m , že se provádí enantioselektivní výroba L-fosfinothricinu, kyseliny L-glutamové, L-histidinu, L-leucinu, L-glutaminu a/nebo L-fenylalaninu z jejich korespondujících racemických N-acetyl-D,L-derivátů s enzymy deac 1 ze Stenotrophomonas sp. a/nebo deac 2 z Comamonas acidovorans.

8. Způsob podle jednoho nebo více z nároků 4 až 7 , při kterém se vyrobené rekombinantní deacetylasy používají v imobilisované formě.

9. Způsob podle jednoho nebo více z nároků 4 až 8 , při kterém reakční teploty činí asi 25 ^{o}C až 65 ^{o}C .

10. Způsob podle jednoho nebo více z nároků 4 až 8 , při kterém se substrát vyskytuje v koncentraci asi 10 až 1500 mM.

11. Použití jedné nebo více hippurát-hydrolas pro enantioselektivní výrobu jedné nebo více L-aminokyselin z jejich korespondujících racemických N-acetyl-D,L-derivátů.

12. Použití jedné nebo více hippurát-hydrolas pro enantioselektivní výrobu L-fosfinothricinu, kyseliny L-glutamové. L-histidinu, L-leucinu, L-glutaminu a/nebo L-fenylalaninu z jejich korespondujících racemických N-acetyl-D,L-derivátů.

13. Použití deac 1 ze Stenotrophomonas sp. a/nebo deac 2 z Comamonas acidovorans pro enantioselektivní výrobu jedné nebo více L-aminokyselin z jejich korespondujících racemických N-acetyl-D,L-derivátů.

14. Použití deac 1 ze Stenotrophomonas sp. a/nebo deac 2 z Comamonas acidovorans pro enantioselektivní výrobu L-fosfinothricinu, kyseliny L-glutamové. L-histidinu, L-leucinu, L-glutaminu a/nebo L-fenylalaninu z jejich korespondujících racemických N-acetyl-D,L-derivátů.