



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1834/89

(51) Int.Cl.6

C 12 P 13/00

(22) Indleveringsdag: 17 apr 1989

C 12 P 41/00

(24) Løbedag: 17 aug 1988

// C 12 N 9/90

(41) Alm. tilgængelig: 17 apr 1989

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 27 nov 1995

(86) International ansøgning nr.: PCT/DK88/00134

(86) International indleveringsdag: 17 aug 1988

(85) Videreførelsesdag: 17 apr 1989

(30) Prioritet: 17 aug 1987 DK 4268/87 10 nov 1987 DK 5861/87 03 aug 1988 NL 8802014

(73) Patenthaver: *Novo Nordisk A/S; Novo Alle; 2880 Bagsværd, DK, *Stamicarbon B.V.; Mijweg 1; 6167 AC Geleen, NL

(72) Opfinder: Sven Erik *Godtfredsen; DK, Kim *Clausen; DK, Kjeld *Ingvorsen; DK, Hubertus Fransiscus Maria *Hermes; NL, Johannes Arnoldus Maria Van *Balken; NL, Emmo Marinus *Meijer; NL

(83) Deponering af mikroorganismer Udlev.t.exp.

(74) Fuldmægtig: Novo Nordisk A/S

(54) Fremgangsmåde til enzymatisk fremstilling af aminosyreeamider eller aminosyrer

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

1834-89

Proces til racemisering af et aminosyreamid med den generelle formel I



hvorved aminosyreamidet bringes i kontakt med et enzym med aminosyreamidracemaseaktivitet. Opfindelsen vedrører i særdeleshed en proces til enzymatisk fremstilling af optisk aktive aminosyrer fra aminosyreamider ved at bringe aminosyreamidet i kontakt med en biokatalysator, som desuden har L- eller D-amidaseaktivitet.

Denne opfindelse vedrører en særlig fremgangsmåde til fremstilling af aminosyrer eller aminosyreamider med den generelle formel I



5 hvori R står for lavere alkyl som kan være substitueret med phenyl, eller R står for phenyl, og R¹ står for amino eller hydroxy.

BAGGRUND FOR OPFINDELSEN

Aminosyreamider er forbindelser, som let kan frem-
10 stilles ved kemiske og enzymatiske processer, og er som sådan vigtige som forstadier ved fremstilling af aminosyrer. Optisk aktive aminosyrer kan f.eks. fremstilles ved enantioselektiv enzymatisk hydrolyse af aminosyreamider. Samtidig enzymatisk racemisering af aminosyreamiderne, som er hidtil ukendt, vil
15 give en stor fordel, fordi fuldstændig omsætning af aminosyreamidet til den ønskede optisk aktive aminosyre så er mulig. I denne beskrivelse betegner et stereoselektivt (enantioselektivt) enzym ét, som udelukkende eller fortrinsvis reagerer med en af to enantiomere forbindelser og derved
20 frembringer et optisk rent henholdsvis optisk aktivt produkt. Et stereospecifikt (enantiospecifikt) enzym betegner ét, som udelukkende reagerer med en af enantiomerene og frembringer et optisk rent produkt.

Optisk aktive α -H, α -aminosyrer udgør en gruppe or-
25 ganiske forbindelser af stor industriel betydning. To store grupper af disse forbindelser kan identificeres: de naturlige aminosyrer, som findes i naturen, f.eks. som bestanddele af proteiner, peptider og mange andre vigtige forbindelser, og de såkaldte unaturlige aminosyrer, som har visse karakteris-
30 tiske træk i strukturen fælles med de naturligt forekommende aminosyrer, men som ikke er naturlige bestanddele af levende stof. Begge grupper af aminosyrer har vigtige industrielle anvendelser. De naturligt forekommende aminosyrer anvendes

således i stort omfang som tilsætningsstoffer til fødevarer og foderstoffer og i den farmaceutiske industri, bl.a. som komponenter i infusionsvæsker. I de senere år har unaturlige aminosyrer også fundet en række anvendelser, f.eks. som mel-
5 lemprodukter til diverse farmakologiske forbindelser.

Som følge af deres molekylstruktur kan aminosyrer med formel I forekomme i to forskellige former, som afviger med hensyn til aminosyremolekylernes såkaldte chiralitet. Disse to former af en given aminosyre betegnes sædvanligvis som D-
10 og L-formen af aminosyren. De fleste aminosyrer, der findes i naturen, har L-konfiguration, og det har vist sig at være væsentligt, at aminosyrer, der anvendes som tilsætningsstoffer til fødevarer og foderstoffer, har denne konfiguration, eftersom de tilsvarende D-isomere forbindelser sædvan-
15 ligvis ikke kan omsættes af levende celler og endda vil gribe ind i cellernes normale stofskifte og funktion. Som følge heraf kan disse unaturlige aminosyrer ofte anvendes som byggesten til farmaceutiske og agrokemiske produkter. F.eks. anvendes D-phenylglycin og D-p-hydroxyphenylglycin til bred-
20 spektrede antibiotika såsom henholdsvis Ampicillin og Amoxycillin.

På grund af det voksende behov for selektive produkter i den farmaceutiske industri, fødevareindustrien og den agrokemiske industri er det meget ønskværdigt at råde
25 over metoder til at fremstille optisk rene, d.v.s. enantiomert rene, aminosyrer af både D- og L-konfiguration, hvorimod blandinger af de to enantiomere former af en given aminosyre, som betegnes racemater, når de to former er til stede i lige-
lige mængder, er af mere begrænset industriel interesse.
30 Grunden til dette er, at kun en af de to optiske isomere forbindelser udviser en klar aktivitet i de ønskede anvendelser. Den anden optiske isomer kan derimod udvise ingen aktivitet, næsten ingen aktivitet eller endog uønsket sideaktivitet.

Kendte processer til at fremstille optisk aktive
35 forbindelser er bl.a. gæring, asymmetrisk syntese og kemisk eller enzymatiske resolutionsprocesser. De er beskrevet i oversigtsartikler, bl.a. af Schmidt-Kastner og P. Egerer i Biotechnology, H.-J. Rehm og G. Reed (Eds.), Verlag Chemie,

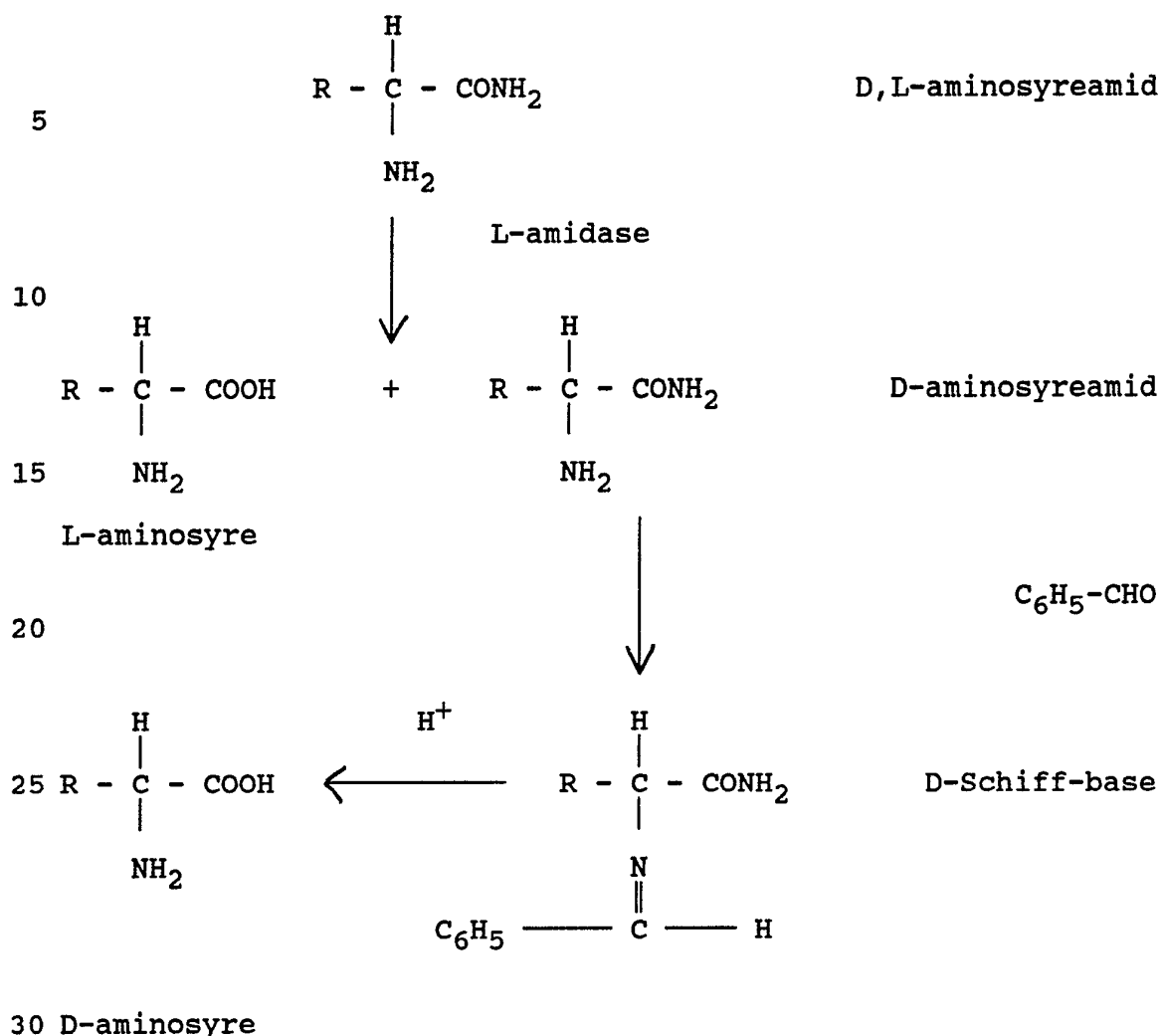
Florida-Basel, bind 6a, siderne 387-421 (1984), og af E.M. Meijer et al. i Symposium Proceedings: "Biocatalysts in Organic Syntheses", Noordwijkerhout, April 14-17, 1985, Elsevier Science Publishers.

5 Til fremstilling af L-aminosyrer er gæring med mikroorganismer en særlig velegnet fremstillingsmetode foruden et antal enzymatiske resolutionsmetoder og enzymatisk asymmetrisk syntese. I dag fremstilles således et stigende antal naturlige aminosyrer ved gæringsteknikker, som imidlertid
10 ikke kan anvendes til fremstilling af unaturlige aminosyrer, hvad enten disse er D-former af de naturligt forekommende L-aminosyrer (med undtagelse af nogle få naturligt forekommende D-aminosyrer, bl.a. D-alanin) eller aminosyrer, som på grund af deres kemiske sammensætning (afhængigt af R-substituent-
15 en) ikke forekommer i naturen. Til fremstilling af disse unaturlige aminosyrer kan de ovennævnte processer såsom asymmetrisk syntese og kemisk eller enzymatisk resolution anvendes. I de senere år har der været en stigende interesse i at anvende enzymer i organisk syntese i almindelighed. Ud-
20 viklingen på dette område skyldes erkendelsen af, at enzymer, selv om de forekommer og anvendes i naturen som biokatalysatorer til syntese af naturligt forekommende forbindelser, faktisk katalyserer en række reaktioner, som sædvanligvis ikke finder sted i naturen, men som ikke desto mindre kan
25 udnyttes med fordel af den organiske kemiker. Denne udvikling vedrørende anvendelse af enzymer til syntese er af særlig interesse i forbindelse med aminosyrefremstilling, eftersom enzymer, der jo er enantioselektive, har evnen til at katalysere dannelse af optisk rene forbindelser. I sådanne proces-
30 ser udnyttes enzymernes enantioselektive egenskaber til at frembringe en optisk ren forbindelse ved kun at omsætte den ene af de enantiomere forbindelser, der er til stede i en racemisk blanding, som typisk fremkommer ved kemisk syntese. Foruden den høje stereoselektivitet foretrækkes enzymatiske
35 processer på grund af de milde reaktionsbetingelser og den oftest brede substratspecificitet. Det sidstnævnte aspekt vedrører det forhold, at ét og samme enzympræparat kan anvendes til at fremstille flere forskellige aminosyrer. Et udmær-

ket eksempel på en enzymatisk resolutionsmetode er beskrevet i USA-patentskrift nr. 3.971.700, USA-patentskrift nr. 4.080.259 og USA-patentskrift nr. 4.172.846. I disse patenter bringes et racemisk D,L-aminosyreamid i kontakt med et 5 præparat, der indeholder L-enantioselektiv amidase som vist i skema I. Kun L-aminosyreamidet hydrolyseres, og en blanding af L-aminosyre og D-aminosyreamid dannes. L-amino-syren kan udvindes derfra ved flere metoder, f.eks. ved kry- stallisation, ved ekstraktion eller ved ionbytningskromato- 10 grafi. D-aminosyreamidet kan også udfældes som en Schiff-base ved reaktion med f.eks. benzaldehyd. Efter udvinding af Schiff basen kan D-aminosyreamidet udvindes, og herfra kan D-aminosyren så udvindes ved kemisk (syre-) hydrolyse eller ved enzymatisk hydrolyse (se f.eks. europæisk patentansøgning med 15 publikationsnummeret 179.523).

Den metode, der er beskrevet i de ovennævnte paten- ter, tjener derfor som et middel til fremstilling af optisk rene D- og L-aminosyrer. Det er imidlertid en ulempe, at højst 50% af det racemiske udgangsmateriale kan udnyttes til 20 udvinding af den tilsvarende D- eller L-aminosyre.

Skema I



Som det ses er amider vigtige forstadier ved fremstilling af optisk aktive aminosyrer.

Det generelle princip med at udnytte enzymernes enantioselektive egenskaber til at adskille en racemisk blanding af et forstadium til en aminosyre til en blanding af den optisk rene aminosyre og det optisk rene forstadium har bred anvendelighed, men lider i hvert fald af én væsentlig ulempe: sædvanligvis kræves kun den ene form af den optisk rene aminosyre i store mængder, mens der ikke er noget behov for at fremstille dens enantiomere modpart. Følgelig er der sædvanligvis ikke noget behov for enten det optisk rene forstadium eller den optisk aktive aminosyre, der bliver tilbage, efter

at den aminosyre, der faktisk behøves, er blevet fremstillet. I industriel praksis er det derfor nødvendigt at racemisere og recirkulere det ubrugte materiale, når princippet med enantioselektiv enzymatisk syntese anvendes til fremstilling af organiske kemikalier. I mange tilfælde er racemisering af forstadiemolekyler, der bliver tilbage efter omdannelse af en racemisk blanding af forstadiet, således en integreret del af den enzymatiske syntese af optisk rene aminosyrer. Følgelig er der ofret en del opmærksomhed på dette problem, og der findes en række kemiske metoder til racemisering af aminosyreforstadier.

For eksempel har man fundet, at D-aminosyreamidder let kan racemiseres ved omdannelse til deres D-N-benzylidenederivater (se USA-patentskrift nr. 4.094.904 og USA-patentskrift nr. 4.172.846).

Kemiske metoder til racemisering af aminosyreamidder er imidlertid sædvanligvis ikke kompatible med enzymatiske reaktioner, hvilket medfører, at racemiseringen og resolutionsstrinnene må udføres hver for sig. Desuden lider kemiske metoder til racemisering af aminosyreamidforstadier af den ulempe, at de medfører en ekstra omkostning på hele processen som følge af omkostningen ved kemikalier, udstyr, tab under racemiseringstrinnet, f.eks. ved biproduktdannelse, og en række andre forhold.

25 BESKRIVELSE AF OPFINDELSEN

Vi har overraskende opdaget eksistensen af enzymer med aminosyreamidracemaseaktivitet, som hidtil har været ukendt. Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af aminosyrer eller aminosyreamidder med den i hovedkravet angivne, generelle formel I, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af hovedkravet angivne.

Der kan opnås en række fordele ved at anvende fremgangsmåden ifølge opfindelsen til racemisering af aminosyreamidder i stedet for at bruge kemiske eller andre

teknologier til denne omsætning. For det første medfører de milde betingelser, der er almindelige ved enzymatiske reaktioner, at stoftabet ved biprodukt dannelse bliver lavt. Desuden kan fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes uden 5 brug af kostbare kemikalier, som efter brugen endog kan give anledning til miljøproblemer, f.eks. ved deres fjernelse. Desuden gør betingelserne, der anvendes i fremgangsmåden ifølge opfindelsen, det muligt at kombinere enzymatisk racemisering af aminosyreamid med enantioselektiv enzymatisk 10 hydrolyse af D- eller L-amid til fremstilling af optisk aktiv aminosyre i et enkelt trin uden behov for at adskille og recirkulere det ureagerede amid. De forbindelser, der kan racemiseres helt eller delvis ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, kan beskrives ved den generelle formel I



hvor R står for lavere alkyl som kan være substitueret med phenyl, eller R står for phenyl, og R¹ står for amino, kendetegnet ved, at man behandler de nævnte forbindelser med en aminosyreamidracemase, som er opnået ved dyrkning af en 20 stamme af Rhodococcus eller Pseudomonas.

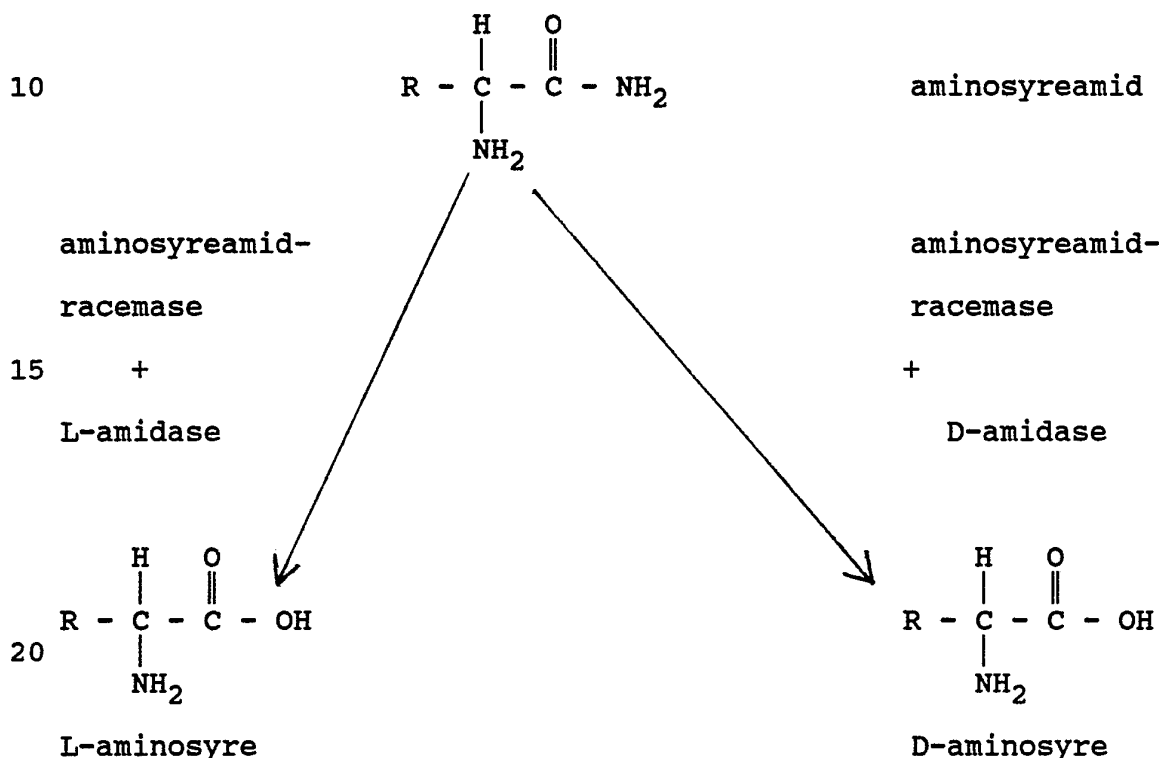
Eksempler på gruppen R er følgende: methyl, isopropyl, sekundær butyl, phenyl, benzyl og 2-phenylethyl. Betegnelsen "lavere alkyl" står for alkyl med mindre end 8, fortrinsvis mindre end 5 kulstofatomer.

25 I en særlig fordelagtig udførelsesform anvendes fremgangsmåden ifølge opfindelsen til at fremstille en optisk aktiv aminosyre fra et tilsvarende amid ved samtidig at bringe amidet i kontakt med aminosyreamidracemase og en stereoselektiv D- eller L-amidase med aktivitet over for det 30 pågældende D- eller L-aminosyreamid. (Dette amidaseenzym kaldes også sommetider aminopeptidase.) Reaktionen er vist i skema II.

Hvis L-amidase anvendes, bør der ikke være D-amidase til stede og omvendt. Endvidere bør aminosyreracemase med 35 aktivitet over for den pågældende aminosyre ikke være til stede.

Aminosyreamidet kan tilføres i ren D- eller L-form eller som en blanding af de to, f.eks. en racemisk blanding. Med denne fremgangsmåde er det endog muligt at omdanne D-aminosyreamid til L-aminosyre eller L-amid til D-syre. Det kan være særligt bekvemt at anvende en racemisk blanding af amider, der er fremstillet kemisk.

Skema II



Fordelen ved denne fremgangsmåde er, at optisk ren D- eller L-aminosyre kan fremstilles stereoselektivt ud fra 25 blandinger af enantiomere forbindelser, herunder racemiske blandinger af et aminosyreamid, eller fra optisk rent D- eller L-aminosyreamid, hvorved aminosyreamidet omdannes fuldstændigt til den ønskede aminosyre.

Den enzymatiske fremgangsmåde ifølge opfindelsen kan 30 f.eks. udføres som en batch-reaktion ved at omrøre en blanding af det aminosyreamid, der skal racemiseres, og enzymet i et vandigt medium under kontrol af reaktionsblandingsens pH og temperatur. pH i reaktionsblandingen kan variere mellem 6 og 12, især mellem 7,5 og 9,5. Reaktionstemperaturen kan være

fra frysepunktet i reaktionsmediet op til ca. 65°C, fortrinsvis mellem 20 og 45°C, og mest fortrinsvis omkring 37°C. Uden for disse områder er aktiviteten og/eller stabiliteten af biokatalysatoren sædvanligvis utilstrækkelig til at opnå 5 tilfredsstillende udbytte. Om nødvendigt kan organiske opløsningsmidler sættes til reaktionsblandingen for at forøge opløseligheden af reaktanterne. Sådanne opløsningsmidler kan f.eks. være alkoholer såsom ethanol, methanol, isopropanol eller t-butanol eller andre organiske opløsningsmidler såsom 10 dioxan, N,N-dimethylformamid, dimethylsulfoxid eller hexamethylphosphortriamid. Reaktionen kan også udføres i et to-fase-system, hvor man anvender en suspension af reaktanter eller to ublandbare opløsningsmidler som f.eks. vand og en kulbrinte såsom hexan eller cyklohexan, eller i en fuld 15 organisk fase af et hydrofobt, vandmættet organisk opløsningsmiddel.

De racemaser, der anvendes i fremgangsmåden ifølge opfindelsen, kan være rensede enzymer, en urenset enzymopløsning, mikrobielle celler, der udviser den krævede aktivitet, 20 homogeniserede celler eller permeabiliserede celler. Om nødvendigt kan enzymet anvendes i immobiliseret tilstand eller i kemisk modificeret form for at sikre god stabilitet og reaktivitet af enzymet under de anvendte betingelser. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan endvidere udføres 25 samtidig med enantioselektiv, enzymatisk hydrolyse af aminosyreamid til aminosyrer. De ovennævnte enzymer eller enzymaktiviteter kan også betegnes som biokatalysatorer. Dette skal naturligvis forstås således, at det omfatter en blanding af biokatalysatorer, der hver indeholder en af de 30 enzymaktiviteter, der skal kombineres, eller fortrinsvis én biokatalysator, i hvilken begge enzymaktiviteter er til stede. Reaktionsblandingen kan også ledes skiftevis igennem reaktorer med aminosyreamidamidase og racemaseenzymaktivitet.

Enzymer, der anvendes i fremgangsmåden ifølge 35 opfindelsen, er enzymer, der katalyserer omdannelse af én enantiomer af et aminosyreamid til den modsatte (eller, hvis amidet indeholder andre asymmetriske centre, til den epimere forbindelse).

Det er særligt hensigtsmæssigt at afprøve enzymer til anvendelse i fremgangsmåden ifølge opfindelsen ved anvendelse af chiral højtryksvæskekromotografi (HPLC) som beskrevet f.eks. i Anal. Biochemistry, 121, 370 (1982) af Weinstein et al.

De enzymer, der anvendes til fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er af mikrobiel oprindelse, idet sådanne mikroorganismer er bakterier, svampe eller andre mikroorganismer. Specielt kan racemaseenzymet fremstilles ud fra stammer af Pseudomonas (især Ps. putida) og Rhodococcus, såsom de følgende to stammer, der er deponeret af ansøgerne til patentformål under Budapesttraktatens betingelser hos National Collections of Industrial & Marine Bacteria Ltd.:

Deponeringsnummer	NCIB 12569	NCIB 40042
15 Deponeringsdato	1987-10-19	1988-08-03
Deponent	NOVO	DSM
Deponentens reference	OD 2111	79M
Taksonomisk betegnelse	Rhodococcus sp.	Ps. putida

Den aminosyreamidracemase, der anvendes i opfindelsen, er opnået ved dyrkning af en stamme af en af de ovennævnte mikroorganismer, og den kan udvindes, f.eks. ved dyrkning af stammen, i et egnet medium eller ved dyrkning af en transformeret værtsorganisme, som indeholder et gen, der koder for og udtrykker denne aktivitet, idet genet er udvundet fra en af de ovennævnte organismer.

En given stammes egnethed som kilde til aminosyreamidracemase eller tilstedeværelsen af et sådant enzym i urensede enzympræparater afprøves bekvemt ved at inkubere celler af den pågældende mikroorganisme eller det urensede enzym med de optisk rene former af det pågældende aminosyreamid. Under inkuberingen udtages prøver af reaktionsblandingen, og disse analyseres for indhold af aminosyreamider og aminosyrer f.eks. ved chiral HPLC. Forekomsten af en aminosyreamidracemase vil, i de tilfælde hvor inkuberingen foretages med L-

aminosyreamid, forårsage tilstedeværelse af det tilsvarende D-aminosyreamid og/eller D-aminosyren (når racemaseaktiviteten bruges sammen med D-amidaseaktivitet). Omvendt vil L-aminosyreamid og/eller L-aminosyre (når det bruges sammen med en 5 L-amidase) blive dannet, hvis D-aminosyreamidet inkuberes med celler eller enzymer, der udviser racemaseaktivitet.

Når man udfører de ovennævnte prøver for tilstedeværelsen af en aminosyreamidracemase i mikroorganismer eller urensede enzymer, vil aminosyreracemase og D- og/eller L-10 amidaser ofte forekomme og gøre tolkning af forsøgsresultaterne vanskelige. Ved direkte at undersøge tilstedeværelsen af disse aminosyreracemaser og deres aktiviteter ved at inkubere optisk rene aminosyrer med de pågældende urensede enzymer eller celler kan nogle af vanskelighederne imidlertid 15 overvindes. Alternativt kan man tilsætte aminosyreracemaseinhibitorer som f.eks. β -chlor-L-alanin til inkuberingsblandingen. Et andet problem med hensyn til tolkning af forsøgsresultaterne er tilstedeværelsen af D- og/eller L-amidaseaktivitet sammen med aminosyreamidracemaseaktiviteten. Aminosyreamidamidaseinhibitorer såsom α -aminomethylketoner som beskrevet af Jahreis et al. i Biomed. Biochem. Acta. 46, 683 (1987), kan anvendes til at hindre omdannelse af aminosyreamidene til de tilsvarende aminosyrer. 20

I de tilfælde, hvor analyse af celler eller urensede 25 enzymer angiver tilstedeværelse af aminosyreamidracemaseaktivitet, kan de urensede enzymer eller enzymerne fra de afprøvede celler endvidere oprenses med metoder for protein- og enzymoprensning, som er vel beskrevet i faglitteraturen. Fraktioner, der udvindes ved sådanne oprensningsprocedurer, 30 kan analyseres for aminosyreamidracemaseaktivitet ved anvendelse af chiral HPLC. Mikroorganismer til afprøvning for aminosyreamidracemaseaktivitet kan fremskaffes på en række forskellige måder:

1. Mikroorganismer kan skaffes fra kultursamlinger. Før 35 afprøvning af sådanne organismer foretrækkes det at udsætte eller dyrke mikroorganismen i tilstedeværelse af f.eks. det pågældende D-aminosyreamid. Foruden mulighe-

den for induktion af D-amidaseaktivitet kan aminosyre-amidracemaseaktivitet også induceres.

2. Mikroorganismerne kan udvælges blandt stammer, der vides at producere aminosyrer med unaturlig konfiguration, peptider indeholdende aminosyrer med unaturlig konfiguration eller forbindelser afledt fra aminosyrer med unaturlig konfiguration. Sådanne mikroorganismer er anført f.eks. i Handbook of Microbiology eller i tilsvarende værker.
- 10 3. Mikroorganismer, som kan producere aminosyreamidracemaser, kan også udvindes ved at udsætte en tilgængelig mikroorganisme for et mutagent middel såsom f.eks. NTG, ultraviolet stråling eller gammastråling. Sådanne behandlinger vides at ændre specificiteten af enzymer og at inducere udtrykning af enzymer fra kryptiske gener.
4. Mikroorganismer, der producerer aminosyreamidracemaser, kan også udvindes direkte ved screening, f.eks. ved brug af berigelseskulturteknikker. En foretrukken berigelsesmetode indebærer tilsætning af prøver af jord til et egnet berigelsesmedium suppleret f.eks. med det pågældende rene D-aminosyreamid som eneste kulstof eller nitrogenkilde. Ved denne procedure bliver mikroorganismer, som producerer aminosyreamidracemaser, beriget, og de kan derefter isoleres ved konventionelle mikrobiologiske teknikker. Et selektionspres kan etableres under screeningen ved at bruge definerede eller semisyntetiske medier. De isolerede mikroorganismer undersøges med de ovenfor beskrevne metoder. Det foretrækkes at udføre berigelsen under aerobe og anaerobe betingelser og ved forskellige temperaturer og pH-værdier for at frembringe en samling af aminosyreamidracemaser egnet til brug ved forskellige betingelser.

Et eksempel på, hvorledes en stamme med D-amidaseaktivitet kan fremskaffes, er isolering af stammen NCIB

40041: Erlenmeyer kolber med 50 ml berigelsesmedium frit for nitrogenkilder, men suppleret med D-amid, inokuleres med jordprøver. Efter 7 dage udvælges kolber der viser god vækst og gendyrkes i det samme medium. Efter yderligere 7 dage ud-
5 vælges kolber, der viser god vækst, og deres indhold analyseres for tilstedeværelse af D-amid. De kulturer, der er fri for D-amid, spredes ud på en agarplade, hvorfra kolonier udvælges og analyseres for amidaseaktivitet.

Stammen NCIB 40041 blev isoleret på denne måde.

10 Andre D-amidaser kan isoleres på tilsvarende måde, og deres specificitet kan påvirkes ved at udvalge det anvendte D-aminosyreamid efter behov. Specielt frembyder kombinationen af en biokatalysator med D-amidaseaktivitet og en biokatalysator med en tilsvarende høj grad af aminosyreamidracemaseaktivitet,
15 og fortrinsvis en enkelt mikroorganisme, som udtrykker begge aktiviteter i sammenlignelig grad, en egnet metode til at fremstille optisk rene D-aminosyrer ud fra D- eller L-aminosyreamider. Det samme gælder, mutatis mutandis, for kombinationen af en L-amidase og en aminosyreamidracemase, for-
20 trinsvis udtrykt i én mikroorganisme med nogenlunde lige høj aktivitet, med hensyn til fremstilling af optisk rene L-aminosyrer fra de ovennævnte udgangsstoffer.

Et eksempel på en mikroorganisme, der udtrykker både aminosyreamidracemase- og amidaseaktivitet, er den oven-
25 nævnte stamme af *Pseudomonas putida* NCIB 40042. Denne stamme er udvundet ifølge den metode, der beskrives i den nyligt indleverede, hollandske patentansøgning nr. 88.01864.

Den inducerbare D-amidaseaktivitet bringes til udtryk ved at inokulere denne stamme på et dyrkningsmedium,
30 hvori et D-aminosyreamid, fortrinsvis D-phenylglycinamid (hvad enten det er som N-kilde eller ej) er til stede.

Udtrykkelse af aminosyreamidracemaseaktivitet sammen med L-amidaseaktivitet kan opnås ved at dyrke denne *Pseudomonas putida*-stamme uden D-aminosyreamid til stede, hvorved
35 D-amidaseaktiviteten ikke bringes til udtryk.

Udtrykkelse af aminosyreamidracemaseaktivitet og D-amidaseaktivitet kan muligvis opnås ved f.eks. at frembringe en L-amidase-negativ mutant fra *Pseudomonas putida*-stammen

ved brug af klassiske genetiske teknikker (såsom UV-bestråling eller alkylerende reagenser) eller ved brug af rekombinant DNA-teknik, hvorefter stammen dyrkes i nærværelse af D-aminosyreamid (hvad enten den tjener som N-kilde eller ej).

5 Det er også muligt ved enzymoprensning at udvinde oprensede fraktioner med D-amidaseaktivitet på den ene side og aminosyreamidracemaseaktivitet på den anden side. En kombination af disse fraktioner frembringer så en foretrukken biokatalysator til fremstilling af optisk aktive D-aminosyrer.

10 Foruden den ovennævnte stamme NCIB 40042 kan D-amidase også afledes fra *Rhodococcus* sp. stamme NCIB 40041. Denne stamme blev deponeret til patentformål den 2. august 1988 under Budapesttraktatens betingelser hos The National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd.

15 Mange mikrobielle L-amidaser er kendt og kan anvendes ved udøvelse af denne opfindelse. Foruden det ovennævnte enzym fra stamme NCIB 40042 er et udmærket eksempel enzymet fra *Pseudomonas putida* stamme ATCC 12633.

Amidaseaktiviteterne kan afledes fra de anførte
20 mikroorganismer på samme måde som nævnt for amidracemase.

De følgende eksempler gives med henblik på at illustrere udøvelse af opfindelsen, udøvelse af processen ifølge opfindelsen:

EKSEMPEL 1

25 *Pseudomonas putida* stamme NCIB 40042 blev dyrket natten over i et YCB (10 g/l) medium med D-phenylglycinamid som N-kilde (1 g/l). Efter høst af cellerne ved centrifugering og vask blev hver gang 120 mg celledlam tilsat til 5 ml af en 1% (vægt/volumen) opløsning af D- eller L-phenylglycin-
30 amid eller D- eller L-phenylglycin som substrat. Reaktionen blev udført i 20 timer i en lille beholder ved 37°C og pH 8,5 med omrystning.

De forskellige reaktioner gav følgende resultater:

5	Substrat	Biokatalysator	% omdannelse til D-phenylglycin hhv. L-phenyl- glycin	
10	D-phenylglycinamid L-phenylglycinamid D-phenylglycinamid L-phenylglycinamid D-phenylglycin L-phenylglycin	med med uden uden med med	77% 7% <1% <1% -- <1%	14% 89% <1% <1% <1% --

Ovenstående resultater, som blev beregnet efter
 15 chiral HPLC-analyse af de opnåede reaktionsblandinger, viser
 tydeligt, at denne biokatalysator foruden den fremstillede D-
 amidaseaktivitet også har aminosyreamidracemaseaktivitet over
 for phenylglycinamid. Som vist foregår der ikke nogen race-
 misering over for den dannede aminosyre. Kun med det tilsva-
 20 rende amid som substrat (både D- og L-phenylglycinamid) dan-
 nes der både D-phenylglycin og L-phenylglycin ved den samti-
 dige tilstedeværelse af L-amidase- og D-amidaseaktiviteter.

EKSEMPEL 2

Pseudomonas putida stamme NCIB 40042 blev dyrket
 25 natten over ved 28°C i et YCB (10 g/l) medium med D-phenyl-
 glycinamid som N-kilde (1 g/l). Efter høst af cellerne ved
 centrifugering og vask blev cellerne åbnet ved hjælp af en
 French-presse, hvorefter et cellefrit ekstrakt blev udvundet
 ved centrifugering.

30 Eftersom mange enzymatiske racemiseringsreaktioner
 vides at have pyridoxal-5'-fosfat (PLP) som cofaktor, blev
 det undersøgt, om det også er tilfældet med racemisering af
 aminosyreamider.

Hvis aminosyreamidracemase er vitterlig er PLP-afhæn-
 35 g, skulle reaktionen blive inhiberet af en inhibitor, som
 er specifik for PLP-afhængige reaktioner, f.eks. hydroxyl-
 amin.

Reaktionerne blev udført i 16 timer med 5 ml 1% (vægt/volumen) D-phenylglycinamid som substrat ved 37°C og pH 8,5 og med 0,5 ml af det cellefrie ekstrakt som biokatalysator. Følgende resultater blev opnået:

5 10	Hydroxylamin-sulfat	Reaktionsprodukter	
	0,2 mmol/ml	D-phenylglycin	L-phenylglycin
	Uden 10 μ l 50 μ l	+ + +	+++ ++ +

15 I disse racemiseringsreaktioner resulterer yderligere PLP i øget aminosyreracemaseaktivitet.

Disse resultater viser, at racemisering af aminosyreamid er faktisk en PLP-afhængig reaktion, som kan inhiberes ved hjælp af hydroxylamin.

20 EKSEMPEL 3

Pseudomonas putida stamme NCIB 40042 blev dyrket natten over ved 28°C i en 30 liters bioreaktor (MBR), pH 7,1, som indeholdt 20 l medium, hvortil der ikke var sat noget D-aminosyreamid (såsom D-phenylglycinamid). Biokatalysatoren, 25 der var dyrket på denne måde, har udelukkende L-amidase og aminosyreamidracemaseaktivitet og ingen D-amidaseaktivitet. Efter høst af cellerne ved ultrafiltrering, centrifugering, vask og frysetørring (i denne rækkefølge) blev disse celler anvendt som biokatalysator i forskellige forhold over for 30 substratet i de nedenfor anførte enzymatiske reaktioner. Som substrat anvendtes 50 ml af en 2% (vægt/volumen) D,L-phenylglycinamidopløsning (pH 8,6). Reaktionerne blev udført ved 40°C. Den procentvise omdannelse blev bestemt på basis af den mængde af ammoniak, der dannedes ved den enzymatiske 35 hydrolyse af aminosyreamidet til den tilsvarende aminosyre. Denne bestemmelse af ammoniakkoncentrationen i reaktionsmedi-

et blev udført ved hjælp af en ionselektiv ammoniakelektrode (Orion).

5	Bio-katalysator mg	Enzym/ substrat- forhold	Reaktions- tid timer	% omdannelse af substratet til L-phenylglycin
	100	1:10	24 50 72	52% 53% 58%
10	500	1:2	24 50 72	53% 57% 63%
15	2000	2:1	24 50 72	65% 74% 80%

20 Selv om disse resultater tydeligt viser, at aminosyreamidracemaseaktiviteten er den begrænsende enzymatiske aktivitet i hydrolyse af aminosyreamid, viser det også, at ved enzymatisk racemisering af et aminosyreamid som substrat for reaktionen kan en procentvis omdannelse over 50% opnås.

25 Desuden blev det vist ved chiral TLC-analyse, at der udelukkende dannedes L-phenylglycin og ikke noget D-phenylglycin, hvilket gør denne proces meget velegnet til fremstilling af optisk rent L-phenylglycin.

EKSEMPEL 4

30 Eftersom de opnåede procentvise omdannelser i fremstillingsprocessen, der er beskrevet i eksempel 3, kræver en lang reaktionstid, er det muligt, at der i denne periode induceres D-amidaseaktivitet, eftersom D-phenylglycinamid er til stede i reaktionsblandingen foruden L-phenylglycinamid.

35 For at hindre dette blev den samme reaktion udført under tilstedeværelse af en inhibitor for proteinsyntese, i dette tilfælde tetracyklin, i en koncentration, der sikrer fuldstændig inhibering (10 µg/ml). Reaktionen blev udført ved

40°C og pH 8,15 og med 40 ml af en 2% (vægt/volumen) racemisk blanding af D,L-phenylglycinamid som substrat. På denne måde opnåedes følgende resultater:

5	Bio-katalysator mg	Enzym/ substrat- forhold	Reaktions- tid timer	% omdannelse af substratet
10	403	1:2	17,5 47,5 72	52% 56% 58%
15	1600	2:1	17,5 47,5 72	58% 69% 75%

Eftersom de således opnåede procentvise omdannelser er på samme niveau som dem i eksempel 3, hvor der ikke var tilsat nogen inhibitor for proteinsyntese til reaktions-
20 blandingen, kan det konkluderes, at når de førnævnte procentvise omdannelser er på over 50, må dette skyldes tilstedeværelse af en aminosyreamidracemase.

EKSEMPEL 5

Eftersom det også skulle være muligt at udvinde L-
25 phenylglycin som produkt ud fra optisk rent D-phenylglycinamid som substrat under tilstedeværelse af en biokatalysator med aminosyreamidracemaseaktivitet kombineret med L-amidaseaktivitet, blev dette gjort i et analogt forsøg (sammenlign eksempel 3 og 4). Celler af *Pseudomonas putida* stamme NCIB
30 40042, der var dyrket på samme måde som i eksempel 3, blev anvendt som biokatalysator (300 mg) i 30 ml af en 1% (vægt/volumen) vandig opløsning af D-phenylglycinamid. Reaktionen blev udført ved 40°C og pH 9,0. Den procentvise omdannelse blev igen bestemt ved måling af den dannede ammoniakmængde
35 med en ionselektiv ammoniakelektrode. Følgende resultater blev opnået:

5

Reaktionstid timer	Procentvis omdannelse af substratet
17	9%
43	26%

Dette forsøg vidner også om den enzymatiske racemisering af et aminosyreamid, i dette tilfælde optisk ren D-phenylglycinamid med samtidig hydrolyse af det dannede L-phenylglycinamid til optisk rent L-phenylglycin.

EKSEMPEL 6

For at bestemme substratspecificiteten af aminosyreamidracemasen blev to aromatiske og to alifatiske aminosyreamider anvendt som substrater (5 ml af en 1% (vægt/volumen) vandig opløsning). Som biokatalysator anvendtes frysetørrede celler, der var udvundet på samme måde som beskrevet i eksemplerne 3, 4 og 5. Reaktionen foregik i 17 timer ved 38°C og ved en pH 8,1. Som aromatiske aminosyreamider anvendtes D-phenylglycinamid og D-homophenylalaninamid, og som alifatiske aminosyreamider D-valinamid og D-leucinamid. I alle tilfælde dannedes udelukkende de tilsvarende L-aminosyrer som reaktionsprodukter ifølge analyse med chiral TLC-analyse. Dette vidner om den brede substratspecificitet hos aminosyreamidracemasen, som har racemiseringsenzymaktivitet over for aromatiske aminosyreamider såvel som alifatiske aminosyreamider.

EKSEMPEL 7

Alaninonitril blev tilsat til 5 ml af en fosfat puffer (0,1 M, pH 7,0) svarende til en koncentration af nitril på 100 mM. Reaktionsblandingen blev omrørt ved stuetemperatur, og 0,1 ml af en opslemning af frisk gærede celler af *Rhodococcus* sp. NCIB 12569 blev tilsat til reak-

tionsblandingen. Med 30 min. mellemrum målttes koncentrationen af D- og L-alaninamid og D- og L-alanin med chiral HPLC i en periode på 4 timer. Det blev konstateret, at følgende processer foregik i reaktionsblandingen: hydrolyse af 5 alaninonitril til amidet, racemisering af amidet og hydrolyse af amidet til alanin.

EKSEMPEL 8

L-alaninamid (HBr salt, 11,4 mg) blev tilsat til 1,125 ml fosfat puffer (0,1 M, pH 7,0), hvilket gav en 10 opløsning af amidet på 60 mM. Denne opløsning blev omrørt ved stuetemperatur og frisk gærede celler af *Rhodococcus* sp. NCIB 12569 opslemmet i 0,225 ml af den samme puffer blev tilsat til reaktionsblandingen. Efter 5, 10, 30, 60 og 120 min. blev der udtaget prøver af reaktionsblandingen, som blev undersøgt 15 for deres indhold af aminosyrer og aminosyreamider ved hjælp af chiral HPLC. Koncentrationen af D- og L-alanin dannet efter 60 min. inkubering blev bestemt til 13,4 henholdsvis 20,5 mM. Cellernes aminosyreracemaseaktivitet blev målt ved at inkubere den samme mængde celler med L-alanin, hvorudfra 20 der kun blev dannet 3,5 mM D-alanin i løbet af 60 min.

EKSEMPEL 9

En 60 mM opløsning af D-alaninamidhydrochlorid blev fremstillet ved at opløse 8,4 mg af amidet i 1,125 ml fosfat puffer (0,1 M, pH 7,0). Efter inkubering med *Rhodococcus* sp. 25 NCIB 12569 som anført i foregående eksempel var den målte koncentration af D- og L-alanin efter 60 min. henholdsvis 30,1 og 7,5 mM. Med en identisk celleopslemning blev 50 mM D-alanin racemiseret til kun 2,4 mM L-alanin under samme betingelser i løbet af 60 min.

EKSEMPEL 10

En opslemning af frisk gærede celler af *Rhodococcus* sp. NCIB 12569 i 0,25 ml puffer blev tilsat til 1,125 ml af en 120 mM opløsning af racemisk alaninamid i fosfat puffer (0,1 M, pH 7,0). Efter 4 timer var omdannelsen af amidet til alanin fuldstændig. Det enantiomere overskud af D-alanin (beregnet som $\frac{D - L}{D + L} \cdot 100\%$) blev bestemt til 75%.

- 10 Det ses, at D-alanin kan syntetiseres i godt udbytte og høj selektivitet ved at udsætte det racemiske amid for en D-amidase og en aminosyreamidracemase.

EKSEMPEL 11

En opslemning af frisk gærede celler af *Rhodococcus* sp. NCIB 12569 i 0,225 ml puffer og 0,225 ml af en opslemning af *Pseudomonas putida* celler, som udviste L-amidaseaktivitet som beskrevet i US-A-4,080,259 blev tilsat til en 140 mM opløsning af racemisk alaninamid i fosfat puffer (0,1 M, pH 7,0). Efter 4 timer var reaktionen fuldstændig. Det enantiomere overskud af L-alanin blev fundet til at være 80%.

EKSEMPEL 12

En opslemning af frisk gærede celler af *Rhodococcus* sp. stamme NCIB 12569 og *Pseudomonas putida* stamme NCIB 40041 (Novo stamme 23, deponeret ved NCIB 26. juni 1988) i fosfat puffer blev tilsat til en 140 mM opløsning af racemisk valinamid i fosfat puffer (0,1 M, pH 7,0). Den fremkomne blanding blev omrørt ved stuetemperatur, og reaktionens forløb blev fulgt ved hjælp af chiral HPLC. Efter 6 timer skønnedes det, at reaktionen var fuldstændig. Det enantiomere overskud af D-valin var 90%. Valin, som er beriget med L-

isomeren, kan således fremstilles ud fra det racemiske amid ved behandling med en L-amidase og en aminosyreamidracemase.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til fremstilling af D- eller L-formen af aminosyrer eller aminosyreamider med den generelle formel I



hvor i R står for lavere alkyl, som kan være substitueret med phenyl, eller R står for phenyl, og R¹ står for amino eller hydroxy, **kendetegnet** ved, at man behandler en forbindelse med den generelle formel II $R-CH(NH_2)-CONH_2$ (II), hvor R har
10 ovennævnte betydning, som foreligger i D-form, hvis man ønsker L-formen, og som foreligger i L-form, hvis man ønsker D-formen, med en aminosyreamidracemase eller et aminosyreamidracemaseholdigt produkt, som er opnået ved dyrkning af en stamme af Rhodococcus eller Pseudomonas, og om
15 ønsket under tilstedeværelse af en enantioselektiv aminosyreamidamidase med aktivitet over for det pågældende amid.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, **kendetegnet** ved, at nævnte enzym er opnået ved dyrkning af Rhodococcus sp. stamme
20 NCIB 12569 eller af en stamme af Ps. putida, fortrinsvis stamme NCIB 40042, og at der fremstilles et amid.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, **kendetegnet** ved, at nævnte enzym fremstilles ud fra stamme NCIB 12569 eller stamme NCIB 40042, og at der fremstilles et amid.

25 4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, **kendetegnet** ved, at udgangsmaterialet er en ikke racemisk blanding af forbindelser med den generelle formel II, og at der fremstilles et amid.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, **kendetegnet** ved, at nævnte enantioselektive amidase er L-specifik, og at der fremstilles en syre.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, **kendetegnet** ved, at 5 nævnte L-specifikke amidase er opnået ved dyrkning af en stamme af *Pseudomonas*, fortrinsvis *P. putida*, fortrinsvis stamme ATCC 12633 eller stamme NCIB 40042, og at der fremstilles en syre.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, **kendetegnet** ved, at 10 nævnte enantioselektive amidase er D-specifik, og at der fremstilles en syre.
8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, **kendetegnet** ved, at den D-specifikke amidase er opnået ved dyrkning af en stamme af *Rhodococcus* sp., fortrinsvis stamme NCIB 40041, eller er 15 opnået ved dyrkning af en stamme af *Pseudomonas*, fortrinsvis *P. putida*, fortrinsvis stamme NCIB 40042, og at der fremstilles en syre.
9. Fremgangsmåde ifølge krav 1, **kendetegnet** ved, at amidracemase og den enantioselektive amidaseaktivitet begge 20 udtrykkes i én mikroorganisme, og at der fremstilles en syre.
10. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af de foregående krav, **kendetegnet** ved, at processen udføres under tilstedeværelse af et organisk opløsningsmiddel.