

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTSCHRIFT



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 297 189 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 P 1/02
C 12 P 17/10

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 P / 343 253 8	(22)	06.08.90	(44)	02.01.92
(71)	siehe (73)				
(72)	Bode, Rüdiger, Doz. Dr. sc. nat.; Birnbaum, Dieter, Prof. Dr. sc. nat., DE				
(73)	Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Domstraße 11, O - 2200 Greifswald, DE				
(74)	Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Direktorat für Forschung, BfS, Rudolf-Petershagen-Allee, O - 2200 Greifswald, DE				
(54)	Verfahren zur enzymatischen Herstellung von 4-, 5- und 6-Methylindolpyruvat und 5- und 6-Fluorindolpyruvat				

(55) 4-, 5-, 6-Methylindolpyruvat; 5-, 6-Fluorindolpyruvat; Biochemikalien; Candida maltosa; Tryptophanaminotransferase; Isolierung; Reinigung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Herstellung von 4-, 5- und 6-Methylindolpyruvat und 5- und 6-Fluorindolpyruvat, Biochemikalien, die für Forschungen auf dem Gebiet des Tryptophanmetabolismus und des Stoffwechsels anderer Indolverbindungen verwendet werden können, aus den entsprechenden Tryptophanderivaten. Zur enzymatischen Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen wird ein aufbereiteter Enzymrohextrakt aus der Hefe Candida maltosa (ZIMET HI 28) mit Tryptophanaminotransferase als dem wirksamen Enzym eingesetzt. Die während der enzymatischen Umsetzung der Tryptophanderivate mit 2-Oxoglutarat unter Verwendung von Pyridoxalphosphat als Coenzym gebildeten Indolpyruvatderivate werden durch Aufarbeitung mit verschiedenen Anreicherungs- und Reinigungsverfahren (Extraktion, Säulenchromatografie, Umkristallisation) in reiner, kristalliner Form gewonnen.

ISSN 0433-6461

5 Seiten

Patentansprüche:

Verfahren zur Herstellung von 4-, 5- und 6-Methylindolpyruvat und 5- und 6-Fluorindolpyruvat, dadurch gekennzeichnet, daß diese Biochemikalien mittels enzymatischer Umsetzung von 4-, 5- und 6-Methyltryptophan und 5- und 6-Fluortryptophan mit 2-Oxoglutarat unter Verwendung von Pyridoxalphosphat als Coenzym und der Tryptophanaminotransferase aus *Candida maltosa* (ZIMET HI 28) hergestellt und durch Extraktion, Säulenchromatographie und mehrfache Umkristallisation in reiner, kristalliner Form gewonnen werden.

Hierzu 1 Seite Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Methyl- und Fluorderivate des Indolpyruvats sind Biochemikalien, die neben Indolpyruvat in wissenschaftlichen Einrichtungen für Forschungsuntersuchungen zum Stoffwechsel der essentiellen Aminosäure Tryptophan und ihrer Analoga und von diesen abgeleiteter wichtiger Verbindungen (Alkaloide, Phytohormone) eingesetzt werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Methyl- und Fluorderivate des Indolpyruvats sind Biochemikalien, die neben Indolpyruvat für wichtige Laboruntersuchungen zum Stoffwechsel der Aminosäure Tryptophan und anderer bedeutsamer Indolverbindungen sowie ihrer entsprechenden Analoga genutzt werden können.

Durch ihre Verwendung zusätzlich zum Indolpyruvat können sterisch bedingte Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat besser untersucht werden. Publikationen oder Patente, in denen die Herstellung dieser Biochemikalien beschrieben wird, sind nicht bekannt. In Biochemikalienkatalogen werden sie nicht angeboten.

Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, ein einfaches enzymatisches Verfahren zur Herstellung von Methyl- und Fluorderivaten des Indolpyruvats zu entwickeln, um diese Biochemikalien für analytische Untersuchungen zum Stoffwechsel der biotechnologisch bedeutsamen Aminosäure Tryptophan und ihrer entsprechenden Analoga sowie für von dieser Aminosäure abgeleitete Verbindungen zu gewinnen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein geeignetes enzymatisches Herstellungsverfahren zu entwickeln, um Methyl- und Fluorderivate des Indolpyruvats aus einfachen Ausgangsstoffen in wenigen Schritten zu produzieren. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst, indem dafür als Enzym die Tryptophanaminotransferase aus der Hefe *Candida maltosa* (ZIMET HI 28) eingesetzt wird, die 4-, 5- und 6-Methyltryptophan und 5- und 6-Fluortryptophan in einem geeigneten Reaktionsmedium zu den entsprechenden Derivaten des Indolpyruvats umzusetzen vermag. Das erfindungsgemäße Verfahren beruht darauf, daß mit einem aufbereiteten Enzymrohextrakt unter Zusatz von 2-Oxoglutarat und Pyridoxalphosphat in einem gepufferten, flüssigen Medium aus den 4-, 5- und 6-Methyl- und den 5- und 6-Fluorderivaten des Tryptophans die entsprechenden Derivate des Indolpyruvats gebildet und danach isoliert, gereinigt und kristallin gewonnen werden.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung ist dargelegt in den Figuren 1-2.

Fig. 1: Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Conversion von 4- (□), 5- (●) und 6-Methyltryptophan (■) und 5- (Δ) und 6-Fluortryptophan (▲) zu den entsprechenden Methyl- und Fluorderivaten des Indolpyruvats.

Fig. 2: Chromatographie von 4- (□), 5- (●) und 6-Methylindolpyruvat (■) und 5- (Δ) und 6-Fluorindolpyruvat (▲) auf einer Säule (2x 10cm) von DEAE-Sephadex X-25 (Acetat-Form).

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von 4-, 5- und 6-Methylindolpyruvat und 5- und 6-Fluorindolpyruvat beruht darauf, daß die entsprechenden Tryptophanderivate in einem gepufferten Medium mit 2-Oxoglutarat als Aminogruppenacceptor und Pyridoxalphosphat als Coenzym enzymatisch umgesetzt und die gebildeten Methyl- und Fluorderivate des Indolpyruvats aus dem Medium isoliert, gereinigt und in kristalliner Form gewonnen werden. In unserem Beispiel wird als Enzym die Tryptophanaminotransferase der Hefe *Candida maltosa* (ZIMET HI 28) in Form eines aufbereiteten Rohextraktes für die katalytische Umsetzung verwendet.

Präparation des Enzyms

Zur Gewinnung des Enzyms Tryptophanaminotransferase wurde die Hefe *Candida maltosa* (ZIMET HI 28) in einem flüssigen Vollmedium mit 10 g Glucose, 10 g Pepton und 5 g Hefeextrakt kultiviert. Nach 24 Stunden Wachstum bei 30°C in Schüttelkolben auf einer Schüttelmaschine wurden die Zellen aus der Kulturflüssigkeit durch Zentrifugation (15 Min.) bei 10000 x g abgetrennt. Für die Enzympräparation wurden die geernteten Zellen aus 15 Kolben vereinigt und mit 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5) gewaschen (suspendiert und erneut abzentrifugiert) und nach Resuspension im gleichen Puffer 2mal mit der X-Presse aufgebrochen.

Alle weiteren Schritte zur Enzympräparation wurden bei 4°C durchgeführt. Das Homogenat wurde bei 20000 x g 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand bis zu einer Konzentration von 1,8 M (40% Sättigung) mit festem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt. Nach 30 Minuten wurde die Lösung 10 Minuten bei 16000 x g zentrifugiert, und zum Überstand wurde erneut Ammoniumsulfat bis zu einer Gesamtkonzentration von 3,15 M (70% Sättigung) zugesetzt. Nach weiteren 30 Minuten wurde abzentrifugiert, und das erhaltene Sediment wurde in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,5, der 40% Volumenanteil Glycerol enthielt, aufgenommen. Dieser Enzymrohextrakt konnte bei -20°C mehrere Monate ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

Bestimmung der Protein-, und der Tryptophanderivatmenge sowie der Enzymaktivität

Die Proteinbestimmung im Enzymrohextrakt erfolgte nach LOWRY et al. (J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951) mit Rinderserumalbumin als Standard. Die Konzentration der Tryptophanderivate in den Ansätzen wurde nach einer Methode von MESSINEO und MUSARRA (Int. J. Biochem. 3, 700-704, 1972) mit Abänderungen nach BODE et al. (Cell. Mol. Biol. 26, 615-620, 1980) bestimmt.

Für die Bestimmung der Tryptophanaminotransferaseaktivität enthielt das Reaktionsmedium 40 µM des entsprechenden Tryptophanderivats, 80 µM 2-Oxoglutarat, 0,1 µM Pyridoxalphosphat, 100 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,1) und die notwendige Menge Enzymextrakt (2,5 mg/ml Protein) in einem Endvolumen von 1 ml. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte durch Messen der gebildeten Indolpyruvatderivate (GORDON, S.A., PALEG, L.G.: Physiol. Plantarum 10, 39-47, 1957). Zu diesem Zweck wurden dem Reaktionsmedium nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C 1,5 ml Salkowski-Reagenz (1 ml 0,5 M FeCl_3 + 50 ml Perchlorsäure, 35% Volumenanteil) zugesetzt. Proben mit einem zu hohen Gehalt an Indolpyruvatderivaten (mehr als 300 nMol) mußten vor Zugabe des Reagenz entsprechend verdünnt werden. Die Messung erfolgte nach 30 Minuten bei 530 nm.

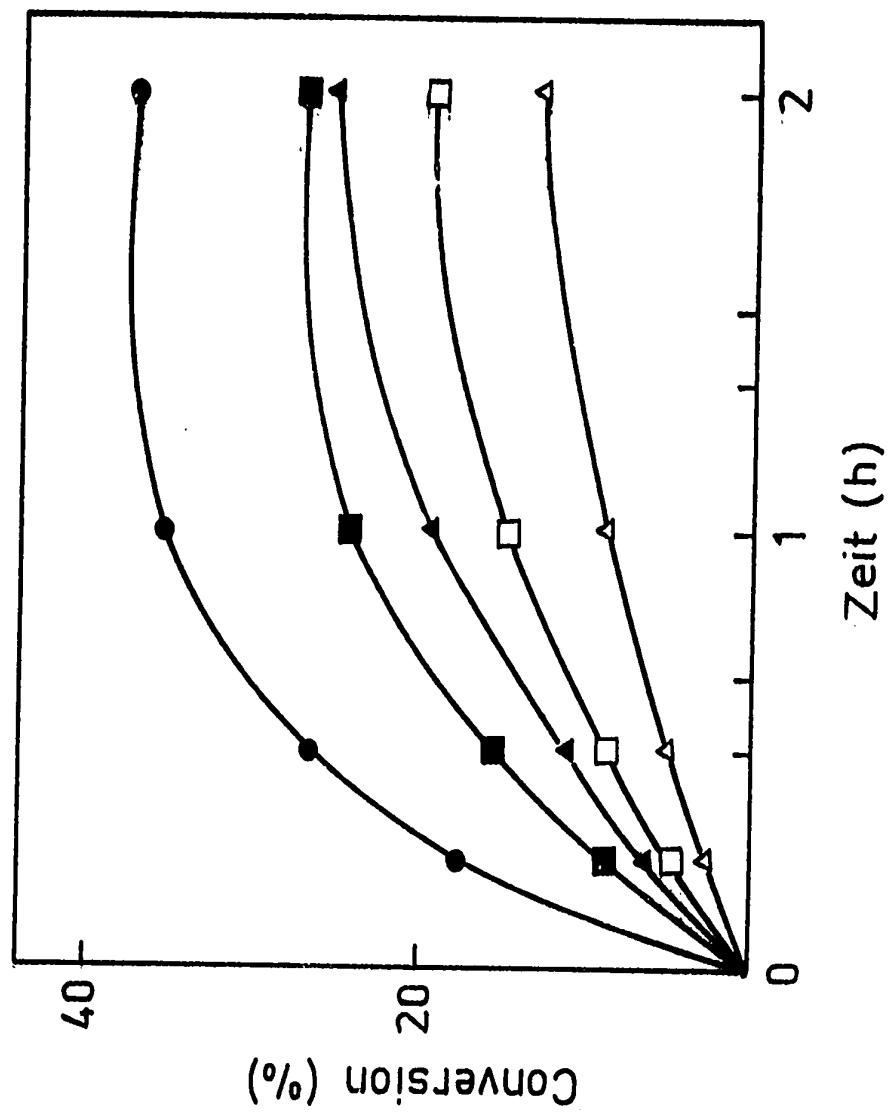
Enzymatische Herstellung und Isolierung des 4-, 5- und 6-Methylindolpyruvats und des 5- und 6-Fluorindolpyruvats

Für die enzymatische Herstellung der Derivate des Indolpyruvats wurde ein Reaktionsansatz von 100 ml Gesamtvolumen verwendet, der entsprechend dem beschriebenen Standardreaktionsmedium zur Bestimmung der Enzymaktivität zusammengesetzt war (40 mM der DL-Verbindung des entsprechenden Tryptophanderivats, 80 mM 2-Oxoglutarat, 0,1 mM Pyridoxalphosphat, 100 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,1, 2,5 mg/ml Protein). Nach 2stündiger Inkubation bei 37°C wurde das Reaktionsmedium mit konz. HCl auf pH 2 angesäuert und danach 20 Minuten bei 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde 2mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetat-Extrakte wurden bei 30°C eingeeengt und der verbleibende Rückstand in 10 ml Ethanol (in diesem und in allen weiteren Schritten wurden Ethanol mit 50% Volumenanteil verwendet) aufgenommen. Diese Ethanol-Lösung wurde auf eine Säule (2 x 10 cm) von DEAE-Sephadex A-25 (Acetat-Form) gegeben. Nach Waschen der Säule mit 30 ml Ethanol wurde mit 200 ml eines Gradienten (0-0,5 M) Essigsäure in Ethanol eluiert. Es wurden Fraktionen von 6,6 ml gesammelt. Die Fraktionen, die das gebildete Derivat des Indolpyruvats enthielten, wurden vereinigt und bei 30°C eingeeengt. Der Rückstand wurde in Ethanol aufgenommen, erneut eingeeengt, und dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Nach Resuspension des verbleibenden Rückstandes in Ethanol und langsamer Evaporation der Ethanol-Lösung bildeten sich bräunliche Kristalle des entsprechenden Methyl- oder Fluorderivats des Indolpyruvats. Die jeweils erhaltene Ausbeute ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1

Ausbeute bei der enzymatischen Umsetzung von Methyl- und Fluortryptophan zu den entsprechenden Derivaten des Indolpyruvats

Eingesetzte Verbindung	Ausbeute in % Massenanteil
DL-4-Methyltryptophan	16
DL-5-Methyltryptophan	31
DL-6-Methyltryptophan	23
DL-5-Fluortryptophan	11
DL-6-Fluortryptophan	20



-4-

