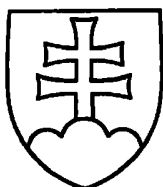


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: 17. 6. 2000
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 199 33 362.9
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: 20. 7. 1999
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: DE
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: 4. 4. 2002
Vestník ÚPV SR č.: 4/2002
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: PCT/EP00/05586
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: WO01/05982

(11), (21) Číslo dokumentu:

40-2002

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷ :

**C12N 15/55,
C12N 11/08,
C12N 9/80,
C12P 41/00,
C12P 13/04**

(71) Prihlasovateľ: **AVENTIS CROPSCIENCE GMBH, Frankfurt, DE;**

(72) Pôvodca: **Bartsch Klaus, Königstein, DE;**

(74) Zástupca: **Hörmannová Zuzana, Ing., Bratislava, SK;**

(54) **Názov: Spôsob výroby L-aminokyselín z ich racemických N-acetyl-D,L-derivátov enzymatickým štiepením racemátu pomocou izolovaného rekombinantného enzýmu**

(57) **Anotácia:**

Je opísaný spôsob výroby proteinogénnych alebo neproteinogénnych L-aminokyselín z racemických N-acetyl-D, L-derivátov, pri ktorom sa (a) enzymatickým štiepením racemátu pomocou izolovaného rekombinantného enzýmu selektívne deacetyľujú N-acetyl-L-deriváty korešpondujúcich L-aminokyselín, zatiaľ čo sa N-acetyl-D-deriváty korešpondujúcich D-aminokyselín nedeacetyľujú a (b) získané deacetylované L-aminokyseliny sa preparatívne od nedeacetylovaných N-acetyl-D-derivátov a/alebo neúplne deacetylovaných N-acetyl-L-derivátov oddelia.

SPÔSOB VÝROBY L-AMINOKYSELÍN Z ICH RACEMICKÝCH N-ACETYL-D,L-DERIVÁTOV ENZYMATICKÝM ŠTIEPENÍM RACEMÁTU POMOCOU IZOLOVANÉHO, REKOMBINANTNÉHO ENZÝMU

Oblasť techniky

Vynález sa týka spôsobu výroby L-aminokyselín z ich racemických N-acetyl-D,L-derivátov enzymatickým štiepením racemátu pomocou izolovaného, rekombinantného enzýmu.

Doterajší stav techniky

Výroba neproteinogénnej aminokyseliny L-PPT (L-fosfinotricín) delením racemátu bola dosiaľ opísaná s vysokou čistotou a výťažkom iba štiepením fenacetyl-fosfinotricínu pomocou penicilín-G-acylázy z *Escherichia coli* (DE-A-3048612). Syntéza fenacetyl-PPT je ale v porovnaní s N-Ac-PPT nákladnejšia a drahšia. Avšak penicilín-G-acyláza nemá žiadnu špecifickosť pre alifatické acylové zvyšky a tým tiež nie pre N-Ac-PPT. Iné známe acylázy nemajú rovnako žiadnu alebo iba nepatrnú substrátovú špecifickosť pre N-Ac-PPT a boli dosiaľ použité iba v mikrobiálnych biotransformáciách bez vyčistenia enzýmu (ako je napríklad opísané v DE-A-2939269). Tým boli dosiahnuté iba veľmi nepatrné výťažky za jednotku času na jednotku priestoru. Z patentovej prihlášky EP-A-0382113 je známe L-špecifické štiepenie N-Ac-PPT esterov karboxylových kyselín acylázou I. Tiež tento enzým nemá však žiadnu špecifickosť pre voľné karboxylové kyseliny a vyžaduje preto esterifikáciu ako dodatočný syntézny krok pri príprave substrátu.

Patentová prihláška DE-A-19652284 opisuje cielenú izoláciu mikrobiálnych deacetyláz z pôdnych vzoriek so špecifickosťou pre N-acetyl-aminokyseliny, výhodné N-acetyl-fosfinotricín (N-Ac-PPT), ako i klonovanie korešpondujúcich génov zo *Stenotrophomonas sp.* a *Comamonas acidovorans*.

Na základe zistenej sekvenčnej homológie a uskutočneného testu

substrátovej špecifičnosti mohlo byť ukázané, že opisované deacetylázy patria k skupine hipurát-hydroláz (EC 3.5.1.32), ktorých prírodný substrát je N-benzoyl-glycín, derivát aminokyseliny s aromatickou N-acylovou funkciou. Preto bolo zaujímavé, že tieto enzýmy môžu tiež akceptovať ako substrát N-acetylované aminokyseliny, obzvlášť N-acetylfosfinotricín, pričom ide o deriváty aminokyselín s N-acylovými funkciami. Z patentových prihlášok DE-A-2939269 a DE-A-2717440 je známe, že herbicídny účinok racemického fosfinotricínu samotného vychádza z jeho L-enantioméru (L-PPT).

V tejto súvislosti bolo zaujímavé, že zistené deacetylázy štiepia s vysokou špecifičnosťou okrem L-enantiomérov N-acetyl-PPT rovnako N-acetyl-deriváty niektorých proteinogénnych aminokyselín. Preto sú vhodné tieto enzýmy výborne na výrobu L-aminokyselín, obzvlášť herbicídne účinné látky L-fosfinotricínu, z ich racemických N-acetyl-derivátov podľa princípu štiepenia racemátov, ako je opísané napríklad v patentových prihláškach EP-A-0304021, DE-A-2939269 a DE-A-3048612.

Podstatné nevýhody v troch vyššie uvedených patentových prihláškach však spočívajú v tom, že (1) sa môžu používať iba nepatrné koncentrácie substrátu (asi 0,5 % v prípade patentovej prihlášky DE-A-2939269), čím je technická spôsobilosť hodnotená ako nepatrná, že (2) sa pracuje s neizolovanými enzýmami, čím sa problematika vedľajších reakcií a nasledujúcich čistiacich krokov nedá riešiť alebo sa rieši za cenu vysokých nákladov a že (3) je potrebná cenovo nákladná príprava produktu (ako je to v prípade patentovej prihlášky DE-A-3048612).

Úloha predloženého vynálezu spočíva v tom, exprimovať jednu alebo viacero nových deacetyláz (ako sú už charakterizované v DE-A-19652284) vo vhodnej forme a množstve a umožniť pomocou týchto enzýmov vyrobenie L-PPT ako i niektorých proteinogénnych L-aminokyselín z chemicky veľmi jednoducho prístupných N-acetyl-D,L-derivátov, štiepením racemátu s vysokými výťažkami a enantiomérou čistotou.

V prípade, že enzymatická aktivita je už približne známa a v ktorom tiež už bolo uskutočnené klonovanie enzým kódujúcej sekvencie nukleových

kyselín, spočíva prvá činnosť v tom, že sa prevedie zodpovedajúci fragment nukleovej kyseliny na vhodný vektor aby sa potom uskutočňovala nadprodukcia vo vhodnom bakteriálnom kmeni a/alebo aby sa po nadexpresii izoloval. Takto izolovaný enzým sa môže buď použiť priamo na enzymatickú reakciu alebo sa ale cez vhodné kopulačné skupiny fixuje na matici.

Je možné odporučiť prvý enzymatický test, aby sa získalo základné potvrdenie, či prebieha požadovaná reakcia. Všetky ďalšie kroky slúžia na optimalizácii parametrov so zreteľom na špecifickosť reakcie (vztiahnuté na edukt a produkt), reakčnú rýchlosť, špecifickosť reakcie, čas trvania polovice reakcie s použitým enzýmom, ako i možné koncentrácie substrátu. V prípade, že jednotlivé parametre nezodpovedajú presne požiadavkám, je možné uskutočniť vhodné zmeny na sekvencii aminokyselín kódujúcich enzým, ktoré by mali za následok ďalšiu optimalizáciu predmetného prírodného enzýmu.

Klonovanie jednotlivito používaných deacetyláz bolo už opísané v prihláške DE-A-19652284. Pre zodpovedajúce deacetylázy kódujúce fragmenty nukleových kyselín boli, ako je uvedené v príklade 1 a ďalej, preklonované na zodpovedajúce expresné vektory, aby sa tým zaistila nutná miera jednoznačnej substrátovej špecifickosti a neprítomnosť vedľajších reakcií. Tak mohla prihláška DE-A-19652284 síce ukázať, že N-acetyl-L-PPT je deacetylovaný, avšak nemohlo byť ukázané, že N-acetyl-D-PPT nie je rovnako deacetylovaný. Záverečná reakcia N-acetyl-L-aminokyselín a N-acetyl-L-PPT predstavuje však elementárnu výhradu pre tu zamýšľané technické riešenie.

Podstata vynálezu

Predmetom predloženého vynálezu je spôsob výroby proteinogénnych alebo neproteinogénnych L-aminokyselín z racemických N-acetyl-D,L-derivátov, ktorého podstata spočíva v tom, že sa

- (a) enzymatickým štiepením racemátu pomocou izolovaného, rekombinantného enzýmu, selektívne deacetylujú N-acetyl-L-deriváty korešpondujúcich L-aminokyselín, zatiaľ čo sa N-acetyl-D-deriváty

korešpondujúcich D-aminokyselín nedeacetylujú a

- (b) získané deacetylované L-aminokyseliny sa preparatívne od nedeacetylovaných N-acetyl-D-derivátov a/alebo neúplne deacetylovaných N-acetyl-L-derivátov oddelia.

Vynález sa týka obzvlášť spôsobu výroby L-fosfinotricínu (L-PPT) z N-acetyl-D,L-fosfinotricínu enzymatickým štiepením racemátu pomocou izolovaného rekombinantného enzýmu.

Ďalej sa vynález týka spôsobu výroby kyseliny L-glutámovej, L-histidínu, L-leucínu, L-glutamínu a/alebo L-fenylamínu z ich korešpondujúcich N-acetyl-D,L-derivátov enzymatickým štiepením racemátu.

Ďalej sa týka vynález spôsobu, ktorého podstata spočíva v tom, že sa enantioselektívna výroba jednej alebo viac L-aminokyselín z ich korešpondujúcich racemických N-acetyl-D,L-derivátov uskutočňuje s jednou alebo viacerými deacetylázami zo skupiny hipurát-hydroláz, pričom sa obzvlášť uskutočňuje enantioselektívna výroba L-fosfinotricínu, kyseliny L-glutámovej, L-histidínu, L-leucínu, L-glutamínu a/alebo L-fenylalanínu z ich korešpondujúcich racemických N-acetyl-D,L-derivátov s jednou alebo viacerými deacetylázami zo skupiny hipurát-hydroláz.

Obzvlášť sa vynález týka spôsobu, ktorého podstata spočíva v tom, že sa enantioselektívna výroba jednej alebo viac L-aminokyselín z ich korešpondujúcich racemických N-acetyl-D,L-derivátov uskutočňuje s enzýmami deac 1 zo *Stenotrophomonas sp.* a/alebo deac 2 z *Comamonas acidovorans* (obe deacetylázy sú opísané v DE-A-19652284) a pri tom celkom obzvlášť spôsobu, ktorého podstata spočíva v tom, že sa enantioselektívna výroba L-fosfinotricínu, kyseliny glutámovej, L-histidínu, L-leucínu, L-glutamínu a/alebo L-fenylalanínu z ich korešpondujúcich racemických N-acetyl-D,L-derivátov uskutočňuje s enzýmami deac 1 zo *Stenotrophomonas sp.* a/alebo deac 2 z *Comamonas acidovorans* (obe deacetylázy sú opísané v DE-A-19652284). Oba enzýmy majú významnú sekvenčnú homológiu, ktorá poskytuje identickú alebo aspoň podobnú funkciu pri štiepení N-acetyl-D,L-derivátov.

Ďalej sa týka vynález použitia vyrobených rekombinantných deacetyláz ako biokatalyzátorov, ktoré dovoľujú uskutočňovanie zodpovedajúcich reakcií s vysokými koncentráciami substrátu a/alebo za dosiahnutia vysokých výťažkov za jednotku času na jednotku priestoru, obzvlášť za použitia rekombinantných deacetyláz v imobilizovanej forme.

Ďalej sa vynález týka uskutočňovania vyššie opísaného spôsobu pri reakčných teplotách asi v rozmedzí 25 °C až 65 °C, výhodne pri reakčných teplotách asi 30 °C až 45 °C a obzvlášť výhodne asi 35 °C až 40 °C.

Ďalej sa týka vynález uskutočňovania vyššie opísaného spôsobu pri koncentráciách substrátu asi 10 mM až 1500 mM, výhodne pri koncentráciách substrátu vyšších ako 50 mM, obzvlášť výhodne pri koncentráciách substrátu vyšších ako 250 mM a celkom obzvlášť výhodne pri koncentráciách substrátu vyšších ako 500 mM.

Ďalej sa vynález týka delenia L-aminokyselín alebo L-PTC, vyrobených pomocou vyššie opísaných krokov, od korešpondujúcich N-acetyl-D,L-derivátov, ktoré buď - ako v prípade N-acetyl-D-derivátov - nezreagovali alebo - ako v prípade N-acetyl-L-derivátov - nezreagovali úplne. Využiteľné spôsoby sú pri tom použitie iónomeničovej chromatografie na kyslom iónomeniči alebo tiež extrakcia N-acetyl-D,L-derivátov pomocou organického rozpúšťadla, ako je napríklad metylizobutylketón, pričom pred tým vyrobené L-aminokyseliny alebo L-PTC prechádzajú do vodnej fázy, z ktorej sa potom zakoncentrujú sušením.

Príklady uskutočnenia vynálezu

1. Produkcia deac-enzýmu ako rekombinantného proteínu z *Escherichia coli*

Deac 1-štruktúrny gén zo *Stenotrophomonas sp.*, kódujúci pre N-Ac-PPT-špecifickú deacetylázu, bol klonovaný ako 1,4-kb BamHI/Sall fragment (opísané v DE-A-1965284) do BamHI/Sall-štiepneho miesta HisTag-expresného vektora 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].

Všetky molekulárne biologické práce sa uskutočňujú podľa štandardných protokolov, ako je napríklad opísané v publikácii Ausubel a kol. (1995), *Current Protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons, New York. Religovaný konštrukt bol transformovaný do výrobcom (Quiagen) doporučovaného bakteriálneho kmeňa *E. coli* M15 a rekombinantné klony boli selektované na 100 µg/ml ampicilínu a 25 µg/ml kanamycínu. Expresia rekombinantného fúzneho proteínu bola indukovaná prídavkom 1 mM UPTG. Bunky boli 4 až 5 hodín po indukcii oddelené a až do spracovania proteínu udržiavané pri teplote - 20 °C.

Pomocou SDS/polyakrylamidovej elektroforézy bunkového alikvótu indukovaných klonov mohol byť dokázaný HisTag-deac 1-fúzny proteín ako dodatočné pásy 49-kDa.

Dôkaz enzymatickej aktivity deacetylázového fúzneho proteínu sa uskutočňoval v rádioaktívnej vzorke pomocou [¹⁴C]-N-acetyl-L-PPT ako substrátu. K tomu sa permeabilizuje 200 µl indukovanej kultúry s 0,5 % toluénu a 0,5 % etylalkoholu počas 30 minút pri teplote 37 °C. Bunkové pelety sa potom resuspendujú v 25 µl 0,1 mM [¹⁴C]-N-acetyl-L-PPT, 10 mM chloridu sodného a 10 mM fosforečnanu sodného, pH = 7,5 a inkubujú sa počas jednej hodiny pri teplote 37 °C. Pre kvantitatívne stanovenie [¹⁴C]-L-PPT sa analyzuje 5 µl alikvótu testovanej vsádzky pomocou chromatografie na tenkej vrstve na doštičkách HPTLC-celulózy (Merck) za použitia pohyblivej fázy n-propanol/amoniak (3:2). Rádioaktívne pásy sú zrejmé pri použití autorádiografie na röntgenovom filme.

Pre kvantifikáciu enzymovej reakcie boli testované vsádzky merané v rádio-HPLC so Spheriosorbom^R SAX ako deliacim stĺpcom (pohyblivá fáza : 5 mM KH₂PO₄, 10 % metylalkohol, pH = 1,92, hodnota toku : 0,5 ml/min). Za týchto podmienok eluuje [¹⁴C]-L-PPT okolo 4,5 minút a [¹⁴C]-N-acetyl-L-PPT okolo 6,5 minút.

Expresný klon s najvyššou N-acetyl-L-PPT-špecifickou deacetylázovou aktivitou produkuje deacetyláza-proteín podľa semikvantitatívneho stanovenia

s podielom asi 10 % celkového proteínu a bol použitý na čistenie enzýmu a ďalej opísanej biotransformácie.

2. Čistenie deacetylázy afinitnou chromatografiou

Izolácia deacetyláza-proteínu z opísaného klonovania novo uvedeného expresného kmeňa pQEDEAC podľa príkladu 1, sa uskutočňuje podľa Quiagen-protokolu (Quiaexpress-Kit) afinitnou chromatografiou na nikel-nitriloacetátovej matrici (Ni-NTA) za natívnych podmienok. K tomu sa fermentuje a indukuje 800 ml expresného kmeňa pQEDEAC, ako je opísané v príklade 1. Získané bunkové pelety (4 g) sa resuspendujú v 20 ml lýzneho pufru a rozložia sa ultrazvukom. Po odstredení sa číry lyzát proteínu (120 mg celkového proteínu) zmieša so 4 ml 50 % Ni-NTA-suspenzie pre väzbu HisTag-fúzneho proteínu a materiál sa potom naniesie na enzýmový stĺpec. Afinitná matrica sa premyje 10 objemami premývacieho pufru a potom sa eluuje 4 ml elučného pufru. Na preskúšanie afinitného čistenia sa alikvóty bunkového rozkladu, premývacích roztokov a eluátu analyzujú pomocou SDS/polyakrylamid-gélovej elektroforézy. Aktivita deacetylázy rôznych proteínových frakcií bola stanovovaná pomocou rádioaktívnych vzoriek, opísaných v príklade 1 (reakčná vsádzka: 9 μ l roztoku proteínu + 1 μ l 1 mM [14 C]-N-acetyl-L-PPT, reakčné podmienky: pozri vyššie). Na kvantitatívne stanovenie enzýmu boli frakcie proteínu inkubované s 50 mM N-acetyl-D,L-PPT (9 μ l roztoku proteínu + 1 μ l 500 mM N-acetyl-D,L-PPT) počas 30 minút pri teplote 37 °C. Získaný PPT bol potom meraný v analyzátore aminokyselín (Biotronic LC 5001).

Proteín v surovom extrakte po rozložení buniek mal špecifickú aktivitu deacetylázy 3 nkat/mg proteínu: (1 nkat = 1 nmol substrátu/s). Z 800 ml kultúry expresného kmeňa mohlo byť izolované afinitnou chromatografiou 10 mg HisTag-deac-fúzneho proteínu so špecifickou aktivitou 20 nkat/mg proteínu a čistotou asi 80 %.

3. Substrátová špecifičnosť a stereoselektivita deacetylázy

Na skúšku substrátovej špecifičnosti a stereošpecifičnosti deac 1-proteínu bolo inkubované 5 µg čisteného enzýmu v 20 µl vsádzok v 10 mM NaCl, 10 mM fosforečnanu sodného, pH = 7,5 so vždy 25 mM v tabuľke 1 uvedených N-acetyl-L-aminokyselín, prípadne zodpovedajúcich D-enantiomérov. Na porovnanie bola použitá kyselina hipurová (N-benzoyl-glycín) ako prírodný substrát deacetylázy. Vzorky boli inkubované počas jednej hodiny pri teplote 37 °C a potom boli skúšané na tvorbu voľných aminokyselín v analyzátore aminokyselín (Biotronic LC 5001). V tabuľke 1 sú uvedené relatívne aktivity deacetylázy pre L-enantioméry rôznych substrátov. Okrem kyseliny hipurovej a N-Ac-L-Phe štiepi deac 1-enzým tiež ešte N-acetyl-deriváty mnohých prírodných aminokyselín, obzvlášť N-Ac-L-glutámovej kyseliny, N-Ac-glycínu, N-Ac-L-histidínu, N-Ac-L-ornitínu, N-Ac-L-leucínu, N-Ac-L-glutamínu a N-Ac-L-fenylalanínu. Vo všetkých prípadoch bol enzým aktívny výhradne s L-enantiomérmi, zatiaľ čo zodpovedajúce D-zlúčeniny nemohli byť v žiadnom prípade zreagované. Vo všetkých prípadoch (pozri tabuľka 1) prebiehala reakcia N-acetyl-L-derivátu iba vo veľmi nepatrnej miere alebo neprebiehala vôbec.

Tabuľka 1 : Substrátová špecifičnosť deac-enzýmu

Substrát ¹	Rel. aktivita ² [%]
kyselina hipurová (N-benzoyl-glycín)	100
N-Ac-L-fosfinotricín	43
N-Ac-L-ornitín	37
N-Ac-L-metionín	0
N-Ac-L-tryptofán	0,4
N-Ac-L-fenylalanín	24
N-Ac-L-tyrozín	11
N-Ac-L-glutámová kyselina	100
N-Ac-L-glutamín	30
N-Ac-L-glycín	59
N-Ac-L-histidín	43
N-Ac-L-leucín	33
N-Ac-L-valín	2
N-Ac-L-serín	4
N-Ac-L-prolín	0

¹: Pri všetkých zlúčeninách ide o L-enantioméry

²: Špecifická aktivita, nameraná s kyselinou hipurovou [nmol glycínu/min/mg proteínu] bola stanovená ako 100 % a ostatné hodnoty sú k tomu vzťahované

4. Štiepenie racemátu N-acetyl-D,L-fosfinotricínu biotransformáciou s bunkami deac-produkčného kmeňa

400 ml kultúry expresného kmeňa pQEDEAC boli fermentované a inkubované rovnako, ako je opísané v príklade 1. Oddelené bunky sa potom premyjú v 10 mM NaCl, 10 mM fosforečnanu sodného, pH = 7,5 a cez noc sa lyofilizujú. Takto spracované bunky sa môžu skladovať veľa týždňov pri teplote 4 °C za zachovania vysokej špecifickej deacetylázovej aktivity a môžu slúžiť v nasledujúcich pokusoch ako biokatalyzátor.

2 mg lyofilizovaných buniek sa resuspendujú v 1 ml nasledujúcich roztokoch substrátov s rôznymi koncentráciami.

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

Vsádzky obsahovali ako reakčný pufor 10 mM NaCl, 10 mM fosforečnanu sodného, pH = 8,0 a boli inkubované počas 48 hodín na trepačke pri 100 otáčkach za minútu a pri teplote 37 °C. Voľný PPT, vytvorený pri hydrolyznej reakcii, sa stanovuje v analyzátore aminokyselín (Biotronic LC 5001). Získané výsledky sú zhrnuté v tabuľke 2. Čistota enantiomérov reakčného produktu bola analyzovaná pomocou chirálnej HPLC s deliacim stĺpcom Chirex^R(D) Pnenicilamín (Phenomenex). Ako pohyblivá fáza bolo použité 2 mM CuSO₄, 10 % metanolu s hodnotou toku 0,5 ml/min. Detekcia sa uskutočňovala fotometricky pri 254 nm. Za týchto podmienok eluujú referenčné roztoky L-PPT okolo 17 minút a D-PPT okolo 21 minút. Vo všetkých testovaných vzorkách mohol byť ako reakčný produkt dokázaný iba L-PPT. Dosiahnuté konverzné hodnoty [produkovaný L-PPT/N-acetyl-L-PPT v substráte x 100] ležali v rozmedzí 100 % pri nízkych koncentráciách substrátu (10 mM, 50 mM) a 66 % pri najvyšších použitých koncentráciách substrátu (500 mM).

Tabuľka 2: Štiepenie racemátu N-acetyl-D,L-PPT v závislosti od koncentrácie substrátu

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

*** : Koncentrácia biokatalyzátora: 2 mg/ml**

V nasledujúcom pokuse bola koncentrácia biokatalyzátora zvýšená a bola zachytená reakčná kinetika štiepenia substrátu. 13 mg lyofilizovaných buniek sa resuspenduje v 1 ml roztoku substrátu, pozostávajúceho z 500 mM dvojsodnej soli N-acetyl-D,L-PPT (13,3 % w/v), 10 mM NaCl a 10 mM fosforečnanu sodného, pH = 8,0 a inkubuje sa na trepačke pri 100 otáčkach za minútu a pri teplote 37 °C. Na stanovenie vytvoreného L-PPT v časovom období 55 hodín sa odoberie vždy 50 µl alikvótu z reakčnej vsádzky, odstredí sa a kvapaliny sa až do analýzy zmrazia pri teplote -20 °C. Kvantitatívna analýza reakčného produktu L-PPT, ako i stanovenie čistoty enantioméru boli uskutočňované spôsobmi, uvedenými vyššie. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 3. Za zvolených podmienok bolo L-špecifické štiepenie substrátu po asi 55 hodinách ukončené. Pri tom boli dosiahnuté hodnoty konverzie asi 90 % a výťažku za jednotku času na jednotku priestoru 483 [mg L-PPT/g biokatalyzátora/h].

Tabuľka 3: Reakčná kinetika štiepenia racemátu N-acetyl-D,L-PPT

Reakčný čas [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

*: Koncentrácia biokatalyzátora: 13 mg/ml; koncentrácia substrátu: 500 mM N-acetyl-D,L-PPT

5. Imobilizácia čisteného deac-proteínu

Aby sa mohla uskutočniť enzýmová reakcia s izolovaným deac-proteínom, imobilizuje sa v príklade 2 ako HisTag-fúzny proteín čistený enzým na polymérny nosič VINA-Epoxy Biosynth^R (Riedel de Haen). Na to sa deac-proteín zakoncentruje pomocou zrážania síranom amónnym na 15 mg/ml a dialyzuje sa cez noc proti 1 M fosforečnanu sodného, pH = 8,0. Pre štandardnú kopulačnú reakciu sa 10 mg proteínu pomaly trepe so 100 mg nosiča VINA počas 2 dní pri teplote miestnosti. Potom sa imobilizát odstredí a premyje sa raz v imobilizačnom pufri a v 50 mM fosforečnanu sodného, pH = 7,0. Pre blokovanie voľných epoxy-skupín sa nosič potom inkubuje počas jednej hodiny pri teplote miestnosti s 50 nM fosforečnanu sodného, pH = 7,0 a 50 nM 2-merkaptóetanolu. Biokatalyzátor sa potom skladuje v 1 ml 5 mM fosforečnanu sodného, pH = 7,0 a 0,02 % azidu sodného pri teplote 4 °C. Na stanovenie kopulácie proteínu sa stanovuje obsah proteínu v roztoku pred a po imobilizácii, ako i v premývacích roztokoch pomocou Bradfordovej metódy [Bradford (1976), Anal. Biochem. 72: 248-254]. Špecifická aktivita deacetylázy bola meraná pred a po imobilizácii pomocou rádioaktívnej vzorky, opísanej v príklade 1. Relatívna

aktivita enzýmu bola po kopulácii > 90 % hodnoty, zistenej pre rozpustený proteín.

6. Štiepenie racemátu N-acetyl-D,L-fosfinotricínu imobilizovaným deac-enzýmom v stĺpcovom reaktore

1 g imobilizátu enzýmu (vlhká hmotnosť) sa naniesie na stĺpcový reaktor a použije sa ako biokatalyzátor pre štiepenie racemátu rôzne koncentrovaných roztokov substrátu s rôznymi hodnotami toku. Roztoky substrátu obsahujú v tabuľke 4 uvedené koncentrácie N-acetyl-D,L-PPT, diamóniovú soľ v 10 mM NaCl a 10 mM fosforečnanu sodného, pH = 8,0. Reakcia sa uskutočňuje pri teplote 37 °C počas celkom 10 dní. Reakcie sa kvantifikujú stanovením L-PPT, prítomného v látke, ktorá pretečie reaktorom, pomocou analýzy aminokyselín a chirálnej HPLC (pozri príklad 4). Výsledky sú uvedené v tabuľke 4. Najvyššia hodnota konverzie 83 % bola dosiahnutá s najvyššou koncentráciou substrátu (500 mM) a s najnižšou hodnotou toku substrátu (0,03 ml/min). Výťažok za jednotku času na jednotku priestoru stúpa s hodnotou toku a koncentráciou substrátu a dosahuje najvyššie hodnoty 181 [mg L-PPT/g biokatalyzátora/h] pri koncentrácii substrátu 500 mM a toku 0,3 ml/min. Imobilizovaná deacetyláza vykazuje po celý čas trvania pokusu dobrú stabilitu a má po 10 dňoch pri teplote 37 °C ešte asi 80 % pôvodnej aktivity.

Tabuľka 4: Štiepenie racemátu N-acetyl-D,L-PPT imobilizovaným deac-enzýmom v stĺpcovom reaktore

Roztok substrátu N-Acetyl-D,L- PPT [mM]	hodnota toku [ml/min]	roztok produktu L- PPT [mM]	hodnota konverzie [%]	výťažok za čas na priestor [mg L-PPT/g biokatalyzátor/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

*: Reakcia pri teplote 37 °C

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob výroby proteinogénnych alebo neproteinogénnych L-aminokyselín z racemických N-acetyl-D,L-derivátov, **vyznačujúci sa tým, že**

(a) enzymatickým štiepením racemátu pomocou izolovaných rekombinantných hipurát-hydroláz selektívne deacetylujú N-acetyl-L-deriváty korešpondujúcich L-aminokyselín, zatiaľ čo sa N-acetyl-D-deriváty korešpondujúcich D-aminokyselín nedeacetylujú

a

(b) získané deacetylované L-aminokyseliny sa preparatívne od nedeacetylovaných N-acetyl-D-derivátov a/alebo neúplne deacetylovaných N-acetyl-L-derivátov oddelia.

2. Spôsob podľa nároku 1 na výrobu L-fosfinotricínu (L-PPT) z N-acetyl-D,L-fosfinotricínu.

3. Spôsob podľa nároku 1 na výrobu kyseliny L-glutámovej, L-histidínu, L-leucínu, L-glutamínu a/alebo L-fenylalanínu z korešpondujúcich N-acetyl-D,L-derivátov.

4. Spôsob podľa jedného alebo viacerých nárokov 1 až 3, **vyznačujúci sa tým, že** sa uskutočňuje enantioselektívna výroba jednej alebo viac L-aminokyselín z ich korešpondujúcich racemických N-acetyl-D,L-derivátov s enzýmami deac 1 zo *Stenotrophomonas sp.* a/alebo deac 2 z *Comamonas acidovorans*.

5. Spôsob podľa jedného alebo viacerých nárokov 1 až 3, **vyznačujúci sa tým, že** sa uskutočňuje enantioselektívna výroba L-fosfinotricínu, kyseliny L-glutámovej, L-histidínu, L-leucínu, L-glutamínu a/alebo L-fenylalanínu z ich korešpondujúcich racemických N-acetyl-D,L-derivátov s enzýmami deac 1 zo *Stenotrophomonas sp.* a/alebo deac 2 z *Comamonas acidovorans*.

6. Spôsob podľa jedného alebo viac z nárokov 1 až 5, pri ktorom sa vyrobené rekombinantné hipurát-hydrolázy používajú v imobilizovanej forme.

7. Spôsob podľa jedného alebo viac z nárokov 1 až 6, pri ktorom reakčné teploty sú asi 25 °C až 65 °C.

8. Spôsob podľa jedného alebo viacerých nárokov 1 až 7, pri ktorom sa substrát vyskytuje v koncentrácii asi 50 mM až 1500 mM.

9. Použitie jednej alebo viac hipurát-hydroláz v spôsobe podľa jedného alebo viacerých nárokov 1 až 8 na enantioselektívnu výrobu jednej alebo viacerých L-aminokyselín z ich korešpondujúcich racemických N-acetyl-D,L-derivátov.

10. Použitie jednej alebo viac hipurát-hydroláz v spôsobe podľa jedného alebo viacerých nárokov 1 až 8 na enantioselektívnu výrobu L-fosfinotricínu, kyseliny L-glutámovej, L-histidínu, L-leucínu, L-glutamínu a/alebo L-fenylalanínu z ich korešpondujúcich racemických N-acetyl-D,L-derivátov.

11. Použitie deac 1 zo *Stenotrophomonas sp.* a/alebo deac 2 z *Comamonas acidovorans* v spôsobe podľa jedného alebo viacerých nárokov 1 až 8 na enantioselektívnu výrobu jednej alebo viac L-aminokyselín z ich korešpondujúcich racemických N-acetyl-D,L-derivátov.

12. Použitie deac 1 zo *Stenotrophomonas sp.* a/alebo deac 2 z *Comamonas acidovorans* v spôsobe podľa jedného alebo viac z nárokov 1 až 8 na enantioselektívnu výrobu L-fosfinotricínu, kyseliny L-glutámovej, L-histidínu, L-leucínu, L-glutamínu a/alebo L-fenylalanínu z ich korešpondujúcich racemických N-acetyl-D,L-derivátov.