РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 270 869** (13) **C2**

(51) МПК
C12P 41/00 (2006.01)
C12P 13/04 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2002104355/13, 17.06.2000**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.06.2000

(30) Приоритет: **20.07.1999 DE 19933362.9**

(43) Дата публикации заявки: **10.12.2003**

(45) Опубликовано: **27.02.2006 Бюл. № 6**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **DE 4308061 A, 15.09.1994. WO 98/27201 A, 25.06.1998. SU 1246897 A3, 23.07.1986. EP 0358428 A, 14.03.1990. GB 2031896 A, 30.04.1980.**

(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: **20.02.2002**

(86) Заявка PCT:
EP 00/05586 (17.06.2000)

(87) Публикация PCT:
WO 01/05982 (25.01.2001)

Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):
БАРЧ Клаус (DE)

(73) Патентообладатель(и):
АВЕНТИС КРОПСАЙЕНС ГМБХ (DE)

RU 2270869 C2

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-АМИНОКИСЛОТ ИЗ ИХ РАЦЕМИЧЕСКИХ N-АЦЕТИЛ-D, L-ПРОИЗВОДНЫХ ПОСРЕДСТВОМ ФЕРМЕНТАТИВНОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способам получения протеиногенных или непротеиногенных L-аминокислот, особенно L-фосфинотрицина, из их рацемических N-ацетил-D, L-производных. Способ включает ферментативное расщепление рацемата с помощью рекомбинантных гиппурат-гидролаз в результате чего селективно деацетилируются N-ацетил-L-производные соответствующих L-аминокислот, в то время как N-ацетил-D-производные соответствующих D-аминокислот не деацетилируются, и полученные деацетилированные L-аминокислоты препаративно отделяют от не деацетилированных N-ацетил-D-производных и/или не полностью деацетилированных N-ацетил-L-производных.

Изобретение позволяет получить L-аминокислоты с высоким выходом и чистотой энантиомеров. 2 н. и 7 з.п. ф-лы, 4 табл.

RU 2270869 C2

RUSSIAN FEDERATION

(19) **RU** (11) **2 270 869** (13) **C2**

(51) Int. Cl.
C12P 41/00 (2006.01)
C12P 13/04 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2002104355/13, 17.06.2000**

(24) Effective date for property rights: **17.06.2000**

(30) Priority: **20.07.1999 DE 19933362.9**

(43) Application published: **10.12.2003**

(45) Date of publication: **27.02.2006 Bull. 6**

(85) Commencement of national phase: **20.02.2002**

(86) PCT application:
EP 00/05586 (17.06.2000)

(87) PCT publication:
WO 01/05982 (25.01.2001)

Mail address:
129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj

(72) Inventor(s):
BARCh Klaus (DE)

(73) Proprietor(s):
AVENTIS KROPSAJENS GMBKh (DE)

(54) METHOD FOR PREPARING L-AMINO ACIDS FROM RACEMIC N-ACETYL-D,L-DERIVATIVES BY ENZYMATIC CLEAVAGE

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, amino acids, biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to a method for preparing proteinogenic or non-proteinogenic L-amino acids, especially L-phosphotricine, from their racemic N-acetyl-D,L-derivatives. Method involves enzymatic cleavage of racemate by using recombinant hyppurate hydrolases that results to selective deacetylation of N-acetyl-L-derivatives of corresponding L-amino acids while N-acetyl-D-derivatives of corresponding D-amino acids are not deacetylated. Prepared deacetylated L-amino acids are separated by preparative method from non-deacetylated N-acetyl-D-derivatives and/or not fully deacetylated N-acetyl-L-derivatives. Invention provides preparing L-amino acids with the high yield and purity of enantiomers.

EFFECT: improved preparing method.

9 cl, 4 tbl, 6 ex

RU 2270869 C2

RU 2270869 C2

Получение непротеиногенной аминокислоты L-PPT (L-фосфинотрицин) посредством расщепления рацемата с высокой чистотой и выходом до сих пор было описано только посредством расщепления фенацетил-фосфинотрицина с помощью пенициллин-G-ацилазой из Escherichia coli (DE-A-3048612). Но синтез фенацетил-PPT по сравнению с N-Ac-PPT является более трудоемким и дорогим. Однако пенициллин-С-ацилаза не обладает специфичностью к алифатическим ацильным остаткам и, тем самым, также к N-Ac-PPT. Другие известные ацилазы также не имеют или имеют лишь незначительную специфичность субстрата к N-Ac-PPT и до сих пор использовались только в микробных биотрансформациях без очистки ферментов (как, например, описано в заявке DE-A-2939269). Вследствие этого были достижимы только очень незначительные выходы объем/время. Из заявки на патент EP-A-0382113 известно L-специфическое расщепление сложных эфиров карбоновых кислот N-Ac-PPT с помощью ацилазы I. Этот фермент также не обладал специфичностью к свободным карбоновым кислотам, и поэтому в качестве дополнительной стадии синтеза при приготовлении субстрата требовалась этерификация.

Заявка на патент DE-A-19652284 описывает целевое выделение микробных деацетилаз из почвенных проб со специфичностью к N-ацетил-аминокислотам, предпочтительно N-ацетил-фосфинотрицину (N-Ac-PPT), а также клонирование соответствующих генов из Stenotrophomonas sp. и Comamonas acidovorans.

На основании выявленной гомологии последовательности и проведенных тестов специфичности субстрата смогли показать, что описанные деацетилазы относятся к группе гиппурат-гидролаз (EC 3.5.1.32), природным субстратом которых является N-бензоил-глицин, производное аминокислоты с одной ароматической N-ацильной функциональной группой. Поэтому представляло интерес то, что эти ферменты в качестве субстрата также могут связывать N-ацетилированные аминокислоты, в особенности N-ацетил-фосфинотрицин, причем речь идет о производных аминокислот с алифатическими N-ацильными функциональными группами. Из заявок на патенты DE-A-2939269 и DE-A-2717440 известно, что гербицидное действие рацемического фосфинотрицина вызывается только его L-энантиомером (L-PPT).

В этой связи представляло интерес, что обнаруженные деацетилазы расщепляют исключительно L-энантиомеры N-ацетил-PPT, а также N-ацетил-производные некоторых протеиногенных аминокислот с высокой специфичностью. Поэтому эти ферменты превосходно подходят для получения L-аминокислот, в особенности гербицидного биологически активного вещества L-фосфинотрицина из его рацемических N-ацетил-производных по принципу расщепления рацемата, как это описывается, например, в заявках на патенты EP-A-0304021, DE-A-2939269 и DE-A-3048612. Существенные недостатки способов, описанных в выше указанных заявках однако состоят в том, что (1) могут использоваться только незначительные концентрации субстрата (около 0,5% в случае заявки DE-A-2939269), вследствие чего техническая пригодность оценивается как незначительная, что (2) работают с не выделенными ферментами, вследствие чего проблема побочных реакций и последующих стадий очистки не решается или является очень дорогостоящей и что (3) получение продукта требует больших материальных затрат (как в случае заявки на патент DE-A-3048612).

Задача изобретения состоит в том, чтобы экспрессировать одну или более новых деацетилаз (как уже охарактеризовано в DE-A-19652284) в подходящих форме и количестве, и с помощью этих ферментов обеспечить получение L-PPT, а также некоторых протеиногенных L-аминокислот из химически очень легко доступных рацемических N-ацетил-D,L-производных посредством расщепления рацемата с высоким выходом и чистотой энантиомеров.

В случае, если ферментативная активность уже приблизительно известна, и если уже произошло клонирование последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент, первое действие состоит в том, что соответствующий фрагмент нуклеиновой кислоты переводят в подходящий вектор, для того, чтобы затем или осуществить сверхпродуцирование в пригодном штамме бактерий, и/или чтобы выделить протеин после

сверхпродуцирования. Выделенный таким образом фермент может или непосредственно использоваться для ферментативной реакции, или через подходящие связывающие группы фиксироваться на матрице.

Первый ферментативный тест может быть рекомендован для того, чтобы получить основное подтверждение, протекает ли желаемая реакция. Все дальнейшие меры служат для оптимизации параметров относительно специфичности реакции (по отношению к исходному веществу и продукту), скорости реакции, эффективности реакции, периода полураспада используемого фермента, а также возможных концентраций субстрата. В случае если отдельные параметры не точно соответствуют требованиям, следует произвести необходимые изменения в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент, которые повлекут дальнейшую оптимизацию имеющегося природного фермента.

Клонирование отдельных используемых деацетилаз уже описывалось в заявке DE-A-19652284. Фрагменты нуклеиновой кислоты, кодирующие соответствующие деацетилазы были переклонированы, как ниже приведено в примере 1, в соответствующие векторы экспрессии, для того чтобы таким образом обеспечить необходимую степень определенной специфичности субстрата и отсутствие побочных реакций. Так, в заявке DE-A-19652284 смогли показать, что N-ацетил-L-PPT деацетилируется, однако не смогли показать, что N-ацетил-D-PPT не деацетилируется. Исключительное превращение N-ацетил-L-аминокислот и N-ацетил-L-PPT представляет собой, однако, элементарное предварительное условие для рассматриваемого здесь технического применения.

Изобретение относится к способу получения протеиногенных или непротеиногенных L-аминокислот из их рацемических N-ацетил-D,L-производных, отличающемуся тем, что

a) посредством ферментативного расщепления рацемата с помощью выделенных рекомбинантных ферментов селективно деацетилируют N-ацетил-L-производные соответствующих L-аминокислот, в то время как N-ацетил-D-производные соответствующих D-аминокислот не деацетилируются, и

b) полученные деацетилированные L-аминокислоты препаративно отделяют от не деацетилированных N-ацетил-D-производных и/или не полностью деацетилированных N-ацетил-L-производных.

Изобретение относится, в особенности, к способу получения L-фосфинотрицина (L-PPT) из N-ацетил-D,L-фосфинотрицина посредством ферментативного расщепления рацемата с помощью выделенных рекомбинантных ферментов.

Далее, изобретение касается способа получения L-глутаминовой кислоты, L-гистидина, L-лейцина, L-глутамина и/или L-фенилаланина из их соответствующих N-ацетил-D,L-производных посредством ферментативного расщепления рацемата.

Далее, изобретение касается способа, отличающегося тем, что осуществляют энантиоселективное получение одной или нескольких L-аминокислот из их соответствующих рацемических N-ацетил-D,L-производных с одной или несколькими деацетилазами из группы гиппурат-гидролаз, причем в особенности осуществляют энантиоселективное получение L-фосфинотрицина, L-глутаминовой кислоты, L-гистидина, L-лейцина, L-глутамина и/или L-фенилаланина из их соответствующих рацемических N-ацетил-D,L-производных с одной или несколькими деацетилазами из группы гиппурат-гидролаз.

В особенности изобретение касается способа, отличающегося тем, что осуществляют энантиоселективное получение одной или нескольких L-аминокислот из их соответствующих рацемических N-ацетил-D,L-производных с ферментами deac 1 из Stenotrophomonas sp. и/или deac 2 из Comamonas acidovorans (обе деацетилазы описаны в заявке DE-A-19652284), и при этом в особенности касается способов, отличающихся тем, что осуществляют энантиоселективное получение L-фосфинотрицина, L-глутаминовой кислоты, L-гистидина, L-лейцина, L-глутамина и/или L-фенилаланина из их соответствующих рацемических N-ацетил-D,L-производных с ферментами deac 1 из Stenotrophomonas sp. и/или deac 2 из Comamonas acidovorans (обе деацетилазы описаны в

заявке DE-A-19652284). Оба фермента характеризуются значительной гомологией последовательности, которая обеспечивает идентичную или, по крайней мере, похожую функцию при расщеплении N-ацетил-D,L-производных.

Далее, изобретение касается применения полученных рекомбинантных деацетилаз в качестве биокатализаторов, которые позволяют проводить соответствующие реакции с высокими концентрациями субстрата и/или обеспечивают высокие выходы объем/время, в особенности при применении рекомбинантных деацетилаз в иммобилизированной форме.

Далее, изобретение касается проведения выше описанных способов при температуре реакции от около 25°C до 65°C, предпочтительно при температуре от около 30°C до 45°C и особенно предпочтительно при температуре от около 35°C до 40°C.

Далее, изобретение касается проведения выше описанных способов при концентрациях субстрата от около 10 мМ до 1500 мМ, предпочтительно при концентрациях субстрата более, чем 50 мМ, особенно предпочтительно при концентрациях более, чем 250 мМ и в высшей степени предпочтительно при концентрациях более чем 500 мМ.

Далее, изобретение касается отделения L-аминокислот или L-PTC, полученных с помощью выше описанных приемов, от соответствующих N-ацетил-D,L-производных, которые или, как в случае N-ацетил-D-производного, не подвергались превращению, или, как в случае N-ацетил-L-производных, не полностью подвергались превращению.

Пригодными способами при этом являются использование ионообменной хроматографии на кислом ионообменнике или экстракция N-ацетил-D,L-производных с помощью органических растворителей, как, например, метилизобутилкетон, причем выше упомянутые полученные L-аминокислоты или L-PTC переходят в водную фазу, из которой затем концентрируются высушиванием.

ПРИМЕРЫ:

1. Получение deac-фермента в качестве рекомбинантного протеина в Escherichia coli:

Ген структуры deac 1 из Stenotrophomonas sp., кодирующий N-Ac-PPT-специфическую деацетилазу, клонировали в виде фрагмента 1,4-kb Bam HI/Sall (описаны в DE-A-19652284) в сайт Bam HI/Sall
His-меченого вектора экспрессии pQE30 фирмы Quiagen [Quiaexpress Kit, Type IV, Katalog № 32149, Stüber и сотр. (1990), Immunological Methods, Lefkovits, I. and Pernis, B., т.IV, Academic Press, New York, стр.121-152].

Все молекулярно-биологические работы проводили по стандартным методикам, как, например, описано: Ausubel и сотр. (1995), Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons, New York. Образованный фрагмент трансформировали в штамм бактерий E.Colli M15, рекомендованном производителем (Qiagen), и рекомбинантные клоны отбирали в 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл канамицина. Экспрессия рекомбинантного слитого протеина индуцировалась посредством добавления 1 мМ инозинфосфотриглицерида (IPTG). Клетки отбирали через 4-5 часов после индукции и хранили для разделения протеина при -20°C.

Благодаря додецилсульфат натрия (SDS)/полиакриламидному электрофорезу аликвоты клеток индуцированных клонов смогли обнаружить His-меченый - deasl-слитый протеин в виде дополнительной полосы 49-кДа.

Доказательство ферментативной активности слитого протеина-деацетилазы осуществляли радиоактивным анализом с [^{14}C]-N-ацетил-L-PPT в качестве субстрата. Для этого осуществляли проницание 200 мкл индуцированных культур 0,5% толуолом, 0,5% этанолом в течение 30 мин при 37°C. Затем грануляты клеток ресуспендировали в 25 мкл 0,1 мМ [^{14}C]-N-ацетил-L-PPT, 10 мМ NaCl, 10 мМ фосфата натрия, pH 7,5 и инкубировали 1 час при 37°C. Для качественного определения образованного [^{14}C]-L-PPT анализировали по 5 мкл аликвоты тестируемой смеси посредством тонкослойной хроматографии на целлюлозных пластинах ВЭТЖХ (Merck) с растворителем: н-пропанол: 25% аммиак = 3:2. Радиоактивные связи обнаруживали на рентгеновской пленке посредством радиографии.

Для количественного определения превращения ферментов тестируемые смеси измеряли радио-ВЭЖХ с Spherisorb® SAX в качестве разделительной колонки

(растворитель: 5 мМ KH_2PO_4, 10% метанол, pH 1,92, расход 0,5 мл/мин). В этих условиях [^{14}C]-L-PPT элюировался через 4,5 мин и [^{14}C]-N-ацетил-L-PPT через 6,5 мин.

Клон экспрессии продуцировал протеин-деацетилазу с очень высокой N-ацетил-L-PPT специфической к активностью деацетилазы, согласно количественному определению с содержанием около 10% на общий протеин и использовался для очистки фермента и последующих описанных биотрансформаций.

2. Очистка деацетилазы посредством афинной хроматографии.

Выделение протеина-деацетилазы из заново названного pQEDEAC штамма экспрессии после клонирования, описанного в примере 1, происходило по методике Quiagen (Qiaexpress-Kit) посредством афинной хроматографии на никель-нитрилтриацетатной матрице (Ni-NTA) в нативных условиях. Для этого 800 мл культуры штамма экспрессии pQEDEAC ферментировали, как описано в примере 1, и индуцировали. Собранный гранулят клеток (4 г) ре-суспендировали в 20 мл лизинового буфера и обрабатывали ультразвуком. После центрифугирования смешивали прозрачный протеинолизат (120 мг общего протеина) с 4 мл 50%-ной суспензии Ni-NTA для связывания His-меченого слитого протеина и затем материал загружали в ферментативную колонку. Разделительную матрицу промывали 10 объемами водного буфера и затем элюировали с помощью 4 мл элюатного буфера. Для проверки чистоты разделения анализировали аликвоту обработанных ультразвуком клеток, промывного раствора и элюата посредством додецилсульфат натрия/полиакриламидного гель-электрофореза. Активность деацетилазы различных протеинсодержащих фракций определяли радиоактивным анализом, описанном в примере 1 (реакционные смеси: 9 мкл раствора протеина + 1 мкл 1 мМ [^{14}C]-N-ацетил-L-PPT, условия реакции описаны выше). Для количественного определения фермента инкубировали протеиновые фракции с 50 мМ N-ацетил-D,L-PPT (9 мкл раствора протеина + 1 мкл 500 мМ N-ацетил-D,L-PPT) в течение 30 мин при 37°C. Образовавшийся PPT затем измеряли в аминокислотном анализаторе (Biotronic LC 5001).

Протеин в сыром экстракте после обработки клеток имел специфическую активность в отношении деацетилазы 3 нмоль субстрата/сек./мг протеина. Из 800 мл культуры штамма экспрессии смогли выделить посредством афинной хроматографии 10 мг His-меченого -deas-слитого протеина со специфической активностью 20 нмоль субстрата/сек./мг протеина и чистотой около 80%.

3. Специфичность субстрата и стереоселективность деацетилазы.

Для исследования специфичности субстрата и стереоспецифичности deacl-протеина инкубировали по 5 мкг очищенного фермента в 20 мкл смесей 10 мМ NaCl, 10 мМ фосфата натрия, pH 7,5 и 25 мМ N-ацетил-L-аминокислот или соответствующих D-энантиомеров, указанных в таблице 1. Для сравнения использовали гиппуровую кислоту (N-бензоилглицин), природный субстрат деацетилазы. Реакционные смеси инкубировали 1 час при 37°C, и затем определяли на образование свободных аминокислот в аминокислотном анализаторе (Biotronic LC 5001). В таблице 1 указаны относительные активности в отношении деацетилазы для L-энантиомеров различных субстратов. Помимо гиппуровой кислоты и N-Ac-L-PPT также deac1-фермент расщепляет еще N-ацетил-производные ряда природных аминокислот, в особенности N-Ac-L-глутаминовую кислоту, N-Ac-глицин, N-Ac-L-гистидин, N-Ac-L-орнитин, N-Ac-L-лейцин, N-Ac-L-глутамин и N-Ac-L-фенилаланин. Во всех случаях фермент был исключительно активен с L-энантиомерами, в то время как соответствующие D-соединения ни в одном случае не могли подвергаться превращению. Во всех других тестируемых случаях (смотри таблицу 1) превращение N-ацетил-L-производных имело место только в очень незначительной степени или вообще отсутствовало.

Таблица 1
Специфичность субстрата deac-фермента

Субстрат[1]	Относ. Активность[2] [%]
Гиппуровая кислота (N-бензоил-глицин)	100
N-Ac-L-фосфинотрицин	43

N-Ac-L-орнитин	37
N-Ac-L-метионин	0
N-Ac-L-триптофан	0,4
N-Ac-L-фенилаланин	24
N-Ac-L-тирозин	11
N-Ac-L-глутаминовая кислота	100
N-Ac-L-глутамин	30
N-Ac-глицин	59
N-Ac-L-гистидин	43
N-Ac-L-лейцин	33
N-Ac-L-валин	2
N-Ac-L-серин	4
N-Ac-L-пролин	0

[1]: для всех соединений речь идет о L-энантиомерах

[2]: специфическую активность, измеренную с гиппуровой кислотой [нмоль глицина/мин/мг протеина] принимали за 100%, и остальные значения соотносились к этой величине.

4. Расщепление рацемата N-ацетил-D,L-фосфинотрицина посредством биотрансформации клетками штамма-производителя - deac:

400 мл культуры штамма экспрессии pQEDEAC ферментировали, как описано в примере 1, и индуцировали. Выращенные клетки затем промывали в 10 мМ NaCl, 10 мМ фосфата натрия, pH 7,5 и после выдерживания в течение ночи лиофилизовали. Обработанные таким образом клетки могли храниться свыше нескольких недель при 4°C, сохраняя высокую специфическую активность в отношении деацетилазы, и служили в последующих опытах в качестве биокатализатора.

2 мг лиофилизованных клеток ресуспендировали в 1 мл следующих растворов субстрата различной концентрации:

(1)	10 мМ	динатриевой соли N-ацетил-D,L-PPT		(0,3%)
(2)	50 мМ	"	"	(1,3%)
(3)	100 мМ	"	"	(2,6%)
(4)	250 мМ	"	"	(6,7%)
(5)	500 мМ	"	"	(13,3%)

Смеси содержали в качестве реакционного буфера 10 мМ NaCl, 10 мМ фосфата натрия, pH 8,0 и были инкубированы 48 час на качалке 100 об./мин и 37°C. Свободный PPT, образованный при реакции гидролиза, определяли в аминокислотном анализаторе (Biotronic LC 5001). Результаты приведены в таблице 2. Чистоту энантиомеров продукта реакции анализировали с помощью хиральной ВЭЖХ с разделительной колонкой Chirex ® (D) Penicillamin (Phenomenex). В качестве растворителя использовали 2 мМ $CuSO_4$, 10% метанол с расходом 0,5 мл/мин. Определение происходило фотометрически при 254 нм. В этих условиях элюируются эталонные растворы L-PPT через 17 мин и D-PPT через 21 мин. Во всех тестируемых пробах смогли доказать исключительно наличие L-PPT в качестве продукта реакции. Достигнутые степени конверсии [продуцированный L-PPT/N-ацетил-L-PPT в субстрате $\times$ 100] находились между 100% при низких концентрациях субстрата (10 мМ, 50 мМ) и 66% при самой высокой концентрации субстрата (500 мМ).

Таблица 2
Расщепление рацемата N-ацетил-D,L-PPT в зависимости от концентрации субстрата

Раствор субстрата N-ацетил-D,L-PPT [мМ]	Раствор продукта[1] L-PPT [мМ]	Степень конверсии L-PPT/N-ацетил-D,L-PPT в %
10	5	100
50	25	100
100	48	96
250	108	86
500	164	66

[1]: концентрация на биокатализатор: 2 мг/мл

В следующем эксперименте повышали концентрацию на биокатализатор и снимали кинетику реакции расщепления субстрата. 13 мг лиофилизованных клеток

ресуспендировали в 1 мл раствора субстрата, состоящего из 500 мМ динатриевой соли N-ацетил-D,L-PPT (13,3% вес./об.), 10 мМ NaCl, 10 мМ фосфата натрия, pH 8,0 и инкубировали на качалке при 100 об./мин и 37°C. Для определения образованного L-PPT через 55 часов отбирали по 50 мкл аликвоты из реакционной смеси, центрифугировали и супернатант замораживали вплоть до анализа при -20°C. Количественный анализ продукта реакции L-PPT, а также определение чистоты энантиомеров проводили, как было описано выше. Результаты приведены в таблице 3. При выбранных условиях L-специфичное расщепление субстрата через приблизительно 55 часов было завершено. При этом достигнуты степень конверсии около 90% и выход объем/время 483 [мг L-PPT/г биокатализатора/час].

Таблица 3
Кинетика реакции расщепления рацемата N-ацетил-D,L-PPT

Время реакции [час]	L-PPT [мМ][1]
0	0
1	27,7
4	59,7
9	106,0
23	181,6
31	186,5
47	208,6
55	221,8

[1]: концентрация на биокатализатор: 13 мг/мл.

Концентрация субстрата 500 мМ N-ацетил-D,L-PPT.

5. Иммобилизация очищенного deac-протеина.

Чтобы можно было провести ферментативную реакцию с выделенным deac-протеином, иммобилизовали фермент, очищенный как His-меченый - слитый протеин в примере 2, на полимерный носитель VINA-Epoxy Biosynth® (Riedel de Haen). Для этого концентрировали deac-протеин посредством осаждения сульфатом аммония до 15 мг/мл и после выдерживания в течение ночи проводили диализ против 1 М фосфата Na, pH 8,0. Для стандартной реакции связывания медленно встряхивали 10 мг протеина с 100 мг носителя-VINA в течение 2 дней при комнатной температуре. Затем иммобилизат центрифугировали и по 1 промывали в иммобилизованном буфере, а также в 50 мМ фосфата Na, pH 7,0. Затем для блокирования свободных эпоксигрупп носитель инкубировали 1 час при комнатной температуре с 50 мМ фосфата Na, pH 7,0, 50 мМ 2-меркаптоэтанола. После этого биокатализатор находился в 1 мл 5 мМ фосфата Na, pH 7,0, 0,02% азида натрия при 4°C. Для определения связывания протеина определяли содержание протеина в растворе до и после иммобилизации, а также в промывных растворах с помощью способа Бредфорда [Bradford (1976), Anal. Biochem. 72: 248-2541. Специфическая активность деацетилазы измерялась до и после иммобилизации радиоактивным анализом, описанном в примере 1. Относительная активность фермента после связывания составляла >90% величины, определенной для растворенного протеина.

6. Расщепление рацемата N-ацетил-D,L-фосфинотрицина с иммобилизованным deac-протеином в колоночном реакторе.

1 г иммобилизата фермента (влажный вес) загружали в колонку и использовали в качестве биокатализатора для расщепления рацемата различных концентрированных растворов субстрата с различными расходами. Растворы субстрата содержали концентрацию диаммониевой соли N-ацетил-D,L-PPT, приведенную в таблице 4 в 10 мМ NaCl, 10 мМ фосфата Na, pH 8,0. Реакции проводили при 37°C в течение свыше 10 дней. Превращение количественно оценивали посредством определения L-PPT, имеющегося в проточном средстве колонки с помощью аминокислотного анализа и хиральной ВЭЖХ (смотри пример 4). Результаты представлены в таблице 4. Наивысшая степень конверсии 83% достигалась с наивысшей концентрацией субстрата (500 мМ) и самым низким потоком субстрата (0,03 мл/мин). Выходы объем/время увеличивались с расходом и концентрацией

субстрата и достигали наивысшего значения 181 [мг L-PPT/г биокатализатора/час] при концентрации субстрата 500 мМ и потоке 0,3 мл/мин. Иммобилизованная деацетилаза демонстрировала в течение длительного времени эксперимента хорошую стабильность и обладала через 10 дней при 37°C еще приблизительно 80% исходной активности.

Таблица 4
Расщепление рацемата N-ацетил-D,L-PPT с иммобилизованным deac-протеином в колоночном реакторе

Раствор субстрата N-ацетил-D,L-PPT [мМ]	Расход [мл/мин]	Раствор продукта L-PPT [мМ]	Степень конверсии [%]	Выход объем/время [мг L-PPT/г биокатализатора/час][1]
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

[1]: Реакция при 37°C.

Формула изобретения

1. Способ получения протеиногенных или непротеиногенных L-аминокислот из рацемических N-ацетил-D, L-производных, отличающийся тем, что осуществляют ферментативное расщепление указанного рацемата при концентрации от 50 до 1500 мМ с помощью рекомбинантных гиппурат-гидролаз, в результате чего селективно деацетилируются N-ацетил-L-производные соответствующих L-аминокислот, в то время как N-ацетил-D-производные соответствующих D-аминокислот не деацетилируются, и полученные деацетилированные L-аминокислоты препаративно отделяют от недеацетилированных N-ацетил-D-производных и/или не полностью деацетилированных N-ацетил-L-производных.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что получают L-фосфинотрицин (L-PPT) из N-ацетил-D, L-фосфинотрицина.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что получают L-глутаминовую кислоту, L-гистидин, L-лейцин, L-глутамин и/или L-фенилаланин из их соответствующих N-ацетил-D, L-производных.

4. Способ по одному или нескольким пп.1-3, отличающийся тем, что осуществляют энантиоселективное получение одной или нескольких L-аминокислот из их соответствующих рацемических N-ацетил-D, L-производных, при этом в качестве рекомбинантных гиппурат-гидролаз используют рекомбинантную деацетилазу 1 из Stenotrophomonas sp. (deac 1) и/или рекомбинантную деацетилазу 2 из Comamonas acidovorans (deac 2).

5. Способ по одному или нескольким пп.1-3, отличающийся тем, что осуществляют энантиоселективное получение L-фосфинотрицина, L-глутаминовой кислоты, L-гистидина, L-лейцина, L-глутамина и/или L-фенилаланина из их соответствующих рацемических N-ацетил-D, L-производных с помощью деацетилаз deac 1 из Stenotrophomonas sp. и/или deac 2 из Comamonas acidovorans.

6. Способ по одному или нескольким пп.1-5, отличающийся тем, что полученные рекомбинантные гиппурат-гидролазы используют в иммобилизованной форме.

7. Способ по одному или нескольким пп.1-6, отличающийся тем, что ферментативное расщепление проводят при температуре приблизительно от 25 до 65°C.

8. Применение рекомбинантной деацетилазы 1 (deac 1) из Stenotrophomonas sp. и/или рекомбинантной деацетилазы (deac 2) 2 из Comamonas acidovorans в способе по пп.1-7 для энантиоселективного получения L-аминокислоты из соответствующих рацемических N-

ацетил-D, L-производных.

9. Применение по п.8 для энантиоселективного получения L-фосфинотрицина, L-глутаминовой кислоты, L-гистидина, L-лейцина, L-глутамина, L-фенилаланина из их соответствующих рацемических N-ацетил-D, L-производных.