



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

214984

(11)

(B1)

[51] Int. Cl.³
C 12 N 11/08

[22] Přihlášeno 25 11 80
[21] (PV 8149-80)

[40] Zveřejněno 31 08 81

[45] Vydáno 15 09 84

(75)
Autor vynálezu

KUBÁNEK VLADIMÍR doc. ing. CSc., KRALUPY NAD VLTAVOU, VERUOVIČ
BUDIMÍR ing. CSc., PRAHA (ČSSR), MARTÍNEK KAREL prof. ing. DrSc., BERE-
ZIN ILJA VASILJEVIČ člen korespondent AV SSSR prof. DrSc., SEMENOV ANA-
TOLIJ NIKOLAJEVIČ dipl. chem., MOSKVA (SSSR), TURKOVÁ JAROSLAVA ing.
CSc., ČESKÝ BROD, BLÁHA KAREL doc. ing. CSc., VANĚK TOMÁŠ RNDr., PRA-
HA (ČSSR)

(54) Imobilizované enzymy pro katalýzu organických reakcí a způsob jejich
výroby

Účelem vynálezu je výroba imobilizovaných enzymů pro katalýzu organických reakcí. Podstata vynálezu spočívá v tom, že enzymy jsou navázány na polymerní sorbent, vytvořený například na bázi polyetylentereftalátu, polykaprolaktamu, polyfenylenoxidu, blokového kopolymeru, polyetylenoxidu a polykaprolaktamu, polykondenzátu melaminu s formaldehydem o specifickém povrchu 1 až 700 m²/g. Imobilizace enzymů na polymerní sorbent se provádí prostorovou sorbcí enzymů z vodného roztoku o pH prostředí 4 až 10 při teplotě 1 až 40 °C, po dobu 0,1 až 48 hodin.

Imobilizované enzymy podle vynálezu mají široké uplatnění v technických katalytických procesech, obzvláště v oblasti jemné organické syntézy při přípravě léčiv a důležitých biochemických sloučenin.

Vynález se týká imobilizovaných enzymů na polymerech mikroporézní struktury o vysokém aktivním povrchu, připravovaných na bázi polyetylentereftalátu (sorsilenu), poly-6-kaprolaktamu (APA), polyfenylenoxidu (PFO), blokového kopolymeru polyetylenoxidu a poly-6-kaprolaktamu, polykondenzátu maleinanhydridu s formaldehydem, určených pro katalýzu organických reakcí, zejména pro esterifikaci aminokyselin a syntézu peptidů, přičemž se enzym sorbuje na polymer z vhodného roztoku a katalyzované reakce se provádějí v organickém rozpouštědle nemísícím se s vodou.

Mikroporézní polymery o vysokém aktivním povrchu vhodné pro imobilizaci enzymů se připravují podle čs. autorských osvědčení č. 171923, 172219, 203386, 202215, 213002 tak, že se polymer rozpustí v roztaveném rozpouštědle a po ochlazení roztoku na kompaktní hmotu, která se podrobí dalšímu mechanickému zpracování a tavné rozpouštědlo se dokonale vyextrahuje z polymerní struktury extrakčním činidlem, které dobře rozpouští tavné rozpouštědlo a neatakuje polymer. Získá se polymer obvykle v práškové formě s mikroporézní strukturou.

Tímto postupem byl připraven polymerní sorbent na bázi polyetylentereftalátu za použití 6-kaprolaktamu jako rozpouštědla a vody jako extrakčního činidla. Specifický povrch u takto připraveného sorbentu (sorsilenu) se pohybuje obvykle od 70 do 100 m²/g, velikost částic se pohybuje od 20 až 30 μm. Sorsilen je bílá, práškovitá hmota s dobrou chemickou a fyzikální stabilitou (bod tání 255 °C).

Mikroporézní sorbent na bázi alkalického poly-6-kaprolaktamu (APA) se připravuje rozpouštěním polykaprolaktamu v kaprolaktamu při teplotě 190 °C a jako extrakční činidlo pro kaprolaktam se používá voda. APA sorbent má specifický povrch kolem 15 m²/g a střední průměr sférických částic 110 Å s pravidelnou mikroporézní strukturou. APA sorbenty jsou chemicky a fyzikálně stálé, o bodu tání 216 °C.

Obdobným způsobem se připravuje i sorbent na bázi blokového kopolymeru polyetylenoxid — polykaprolaktam, přičemž se vychází z tohoto kopolymeru. Měrný povrch tohoto typu sorbentu se pohybuje kolem 8 m²/g.

Sorbent na bázi poly-2,6-dimetylfenyloxiidu (PFO) se připravuje za použití kaprolaktamu jako rozpouštědla polyfenyloxiidu při teplotě 145 °C a extrakčního činidla vody. PFO sorbent má pravidelnou mikroporézní strukturu s úzkou distribucí pórů o specifickém povrchu kolem 660 m²/g.

Polykondenzační sorbent (MLF) se připravuje polykondenzací melaminu s formaldehydem za přítomnosti anorganických solí, které se zabudují do polykondenzačního gelu a po jeho vytvrzení se tato sůl vyextrahuje obvykle vodou. MLF sorbent má velikost zrna od 0,1 do 0,5 mm a měrný povrch 200 m²/g.

Enzymy, jakožto biokatalyzátory, mají nesmírně vysokou katalytickou aktivitu v mírných podmínkách a vyhraněnou substrátovou specifitu. Z těchto vlastností vyplývá možnost širokého uplatnění v technologických katalytických procesech, obzvláště v oblasti jemné organické syntézy, při přípravě léčiv a důležitých biochemických sloučenin. Předností enzymaticky katalyzovaných reakcí je, že vedou k chirálně čistým produktům. Aplikace enzymů se usnadní a ekonomicky zvýhodní jejich imobilizací na pevný sorbent. Imobilizovaný enzym na pevný sorbent představuje nerozpustný katalyzátor, který je možno snadno odstranit z reakční směsi od rozpustného substrátu a produktu a znovu použít. Při použití organického rozpouštědla nemísícího se s vodou enzymy jsou lokalizované ve vodní fázi na povrchu pevného sorbentu (nosiče) a jsou stabilizovány proti denaturačnímu účinku organických rozpouštědel. Tím je dána možnost katalyzovat i takové reakce, jako je syntéza esterů, polymerace aminokyselin, cukrů apod., které mohou probíhat v prostředí organického rozpouštědla. Pro praktickou aplikaci imobilizovaných enzymů je rozhodujícím činitelem použití vhodného a laciného sorbentu, jakož i jednoduchého způsobu provedení imobilizace. Tomuto požadavku vyhovuje způsob imobilizace enzymů podle předkládaného vynálezu, podle kterého se imobilizace provádí prostou sorbcí enzymů z jeho vodného roztoku na polymerní sorbent o velkém aktivním povrchu a o vhodné chemické struktuře sorbentu, která usnadňuje sorbcí enzymu. Vzhledem k tomu, že katalyzovaná reakce probíhá v organickém rozpouštědle nemísícím se s vodou, nedochází k uvolňování enzymu lokalizovaného ve vodné fázi na povrchu pevného nosiče. Tím odpadá hlavní nevýhoda preparátů imobilizovaných enzymů připravovaných pouhou sorbcí, ze kterých za použití běžného vodného prostředí katalyzované reakce dochází k uvolňování enzymu do reakčního roztoku. Další předností popsaného postupu je, že enzym je ve vodné fázi na povrchu pevného nosiče (sorbentu) zároveň chráněn proti denaturačním účinkům organického rozpouštědla.

V dalším je vynález blíže objasněn na příkladech, které však rozsah vynálezu nijak neomezuje.

Příklad 1

Syntéza acetyl-L-tryptofanethylesteru z etanolu acetyl-L-tryptofanu v dvoufázovém systému voda-chloroform katalyzovaná chymotrypsinem adsorbovaným na sorsilen

a) Příprava imobilizovaného chymotrypsinu
10 g odsátého, ve vodě nabobtnalého sorsilenu (2,7 g vlhkého sorsilenu odpovídalo 1 g suchého) bylo ekvilibrováno 1M fosforečnanem draselným (pH 8). Po ukončení ekvibrace byl odsátý polymer suspendován v 20 ml 1%ního roztoku chymotrypsinu v ekvilibračním pufru (ak-

tivita volného chymotrypsinu byla 0,61 jedn. $A_{280\text{nm}}/\text{min}$ a mg stanoveného pomocí roztoku denaturovaného hemoglobinu při pH 8 podle Ansona]. Sorbce enzymu byla sledována na základě ubývající proteolytické aktivity vazebného roztoku. Po 30 min. byl prakticky téměř veškerý enzym sorbován na pevný sorsilen. Po odsátí a promytí ekvilibračním pufrem byl imobilizovaný chymotrypsin použit ke katalýze esterifikace acetyl-L-tryptofanu etanolem nebo byl ve vlhkém stavu skladován při teplotě $+4^\circ\text{C}$. Proteolytická aktivita stanovená 9,6 jedn./min a g vlhkého preparátu se neměnila při skladování průběhu sledovaného 1 měsíce. Množství chymotrypsinu sorbovaného na sorsilen klesá se stoupající hodnotou pH v rozmezí od pH 4 do pH 9,5. Proteolytická aktivita preparátu imobilizovaného chymotrypsinu připravená analogickou sorbcí při pH 7 byla proto vyšší (11 jedn./min. a g vlhkého preparátu).

b) Esterifikace acetyl-L-tryptofanu etanolem Chymotrypsin adsorbovaný na sorsilen (1 g vlhké hmoty, sorbovaný při pH 8 nebo 7) byl suspendován v 30 ml chloroformu obsahujícím $5 \times 10^{-3}\text{M}$ (nebo $2,5 \times 10^{-3}\text{M}$ nebo $1,25 \times 10^{-3}\text{M}$) N-acetyl-L-tryptofanu a 1M etanol. Suspense byla míchána za laboratorní teploty. Postup esterifikace byl sledován v alikvotních podílech odebíraných ve 30 min. intervalech pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie na koloně SiC_{18} (250 $\times$ 3 mm, 75 % metanol/voda, 0,005 M primární fosforečnan amonný, 0,005 M $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{H}_2\text{PO}_4^-$, pH 7,5, průtok 1,5 ml/min., detekce 280 nm). Procento výtěžku esterifikace se zvyšovalo se stoupajícím zředěním substrátu. Pro $1,25 \times 10^{-3}\text{M}$ acetyl-L-tryptofan byl výtěžek 95 %, pro $2,5 \times 10^{-3}\text{M}$ 91 % a pro $5 \times 10^{-3}\text{M}$ 86 %. Ve zředěných roztocích bylo dosaženo maximálního stupně esterifikace během 2 až 3 hod. u koncentrovanějších roztoků acetyl-L-tryptofanu až za 6 až 8 hod. Při nejvyšší koncentraci substrátu bylo možno zvýšit stupeň esterifikace z 86 % na 95 % rovněž tím, že se použil preparát imobilizovaného chymotrypsinu o vyšší aktivitě (sorbovaný při pH 7).

c) Izolace Ac-L-Tryptofan etylesteru Rostok 35 mg N-acetyl-L-tryptofanu po 9 hod. esterifikaci (provedeno postupem popsáním v 1b; pomocí HPLC určen 90% výtěžek) byl filtrován přes skleněnou fritu s vrstvou křemeliny a zachycená vrstva sorsilenu byla promyta 3×30 ml chloroformu. Rostok byl nalit do děličky a třepán 3×50 ml vodného roztoku NaHCO_3 , pH 10. Organická vrstva byla promyta vodou do neutrální reakce, sušena Na_2SO_4 a odpařena ve vakuu. Získáno 36,5 mg odparku, který byl dle HPLC zcela čistý acetyl-L-tryptofan-etyler.

Příklad 2

Syntéza N-acetyl-L-tryptofan-etyleru na sorsilenu s nasorbovaným N-acetyl-L-tryptofanem. 61 mg N-acetyl-L-tryptofanu bylo rozpuštěno v

1 ml 0,5 M fosfátovém pufru (pH 7,1). Do roztoku byl přidán 1 g sorsilenu a suspence byla odvzdušněna za vakua (cca 13,33 Pa). Potom bylo do suspence přidáno 10 mg chymotrypsinu. Po 30 min. míchání směsi bylo přidáno 25 ml chloroformu obsahujícího 0,1 M etanolu. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty. Po 10 hod. míchání bylo dosaženo 50% esterifikace, po 30 hod. 75% esterifikace.

Příklad 3

Syntéza benzyloxykarbonyl-L-leucyl-L-fenylalanin metylesteru

Chymotrypsin sorbovaný na sorsilen způsobem popsaným v příkladu 1a) (3,1 g sorsilenu vlhkého, na který byl sorbován enzym při pH 8, aktivita 9 jednotek na 1 g) byl suspendován v roztoku 0,32 g benzyloxykarbonyl-L-leucinu a 0,27 g L-fenylalanin-metylesteru (50% molární přebytek vůči derivátu leucinu) ve 100 ml chloroformu (p.a., stabilizovaný 1% etanolu). Směs byla míchána 10 hodin při teplotě místnosti. Poté byl pevný materiál, resp. imobilizovaný enzym, rozmíchán, resp. odcentrifugován a rozmíchán v 10 ml chloroformu a znovu odcentrifugován. Spojené chloroformové podíly byly promyty postupně 1M-HCl, vodou, 0,5 M NaHCO_3 a vodou, a nakonec odpařeny. Odparek byl přelit etylacetátem, roztok oddělen od polymerního podílu na stěnách a přidavkem petroleteru vysrážen produkt. Výtěžek se pohyboval v opakovaných pokusech mezi 20 až 30 % izolované krystalické látky o bodu tání $83-84^\circ\text{C}$, což je v dobrém souhlase s autentickým vzorkem připraveným klasickou chemickou cestou.

Příklad 4

Syntéza benzyloxykarbonyl-L-fenylalanin-glycin metylesteru

Byla provedena kondenzace benzyloxykarbonyl-L-fenylalaninu s glycin metylesterem analogicky jako v příkladu 3, která vedla k dipeptidu benzyloxykarbonyl-L-fenylalanin-L-glycin etylsteru ve výtěžku 20 % izolované látky o bodu tání $133-134^\circ\text{C}$, který je v souhlase s bodem tání autentického vzorku připraveného klasickou chemickou syntézou.

Příklad 5

Syntéza acetyl-L-tryptofanyl-L-leucinamidu 0,5 ml 0,5 M fosfátového pufru (pH 7,1) bylo smícháno s 0,5 g sorsilenu a odvzdušněno za vakua. Po přidání 10 mg chymotrypsinu byla směs míchána za laboratorní teploty po dobu 30 min. Přitom bylo přidáno 8 ml etylacetátu nasyceného vodou obsahujícího 0,005 M acetyl-L-tryptofanu a 0,008 M L-leucinamidu. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty. 0,5 ml alikvoty organické fáze odebírané v hodinových intervalech byly analyzovány tenkovrstvou chromatografií (destičky Silufol, systém chloroform-etanol-konc. amoniak = 25:10:0,25). Sk-

na o mobilitě $R_f = 0,65$ byla vyříznuta a eluována 4 ml etanolu, ve kterém byla měřena pak absorbance při 280 nm. Molární koeficient extinkce acetyl-L-tryptofanyl-L-leucinamidu v etanolu byl uvažován jako 6500. Po 24 hod. byl výtěžek syntézy dosažen téměř 60 %. Po sedminásobném použití sorbovaného chymotrypsinu si preparát udržel téměř 50 % své původní aktivity.

Příklad 6

0,5 ml 0,5 M fosfátového pufru (pH 7,1) bylo smícháno s 0,5 g APA sorbentu a odvdzdušněno za vakua. Po přidání 10 mg chymotrypsinu byla směs míchána za laboratorní teploty po dobu 30 min. Potom bylo přidáno 8 ml etylacetátu nasyceného vodou obsahujícího 0,005 M acetyl-L-tryptofanu a 0,008 M L-leucinamidu. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty. 0,5 ml alikvoty organické fáze odebírané v hodinových intervalech byly analyzovány tenkovrstvou chromatografií (destičky Silufol, systém chloroform-etanol-konc. amoniak = 25:10:0,25). Skvrna o mobilitě $R_f = 0,65$ byla vyříznuta a eluována 4 ml etanolu, ve kterém byla měřena pak absorbance při 280 nm. Molární koeficient extinkce acetyl-L-tryptofanyl-L-leucinamidu v etanolu byl uvažován jako 6500. Po 24 hod. byl výtěžek syntézy dosažen téměř 60 %. Po sedminásobném použití sorbovaného chymotrypsinu si preparát udržel téměř 50 % své původní aktivity.

Příklad 7

0,5 ml 0,5 M fosfátového pufru (pH 7,1) bylo smícháno s 0,5 g PFO sorbentu a odvdzdušněno za vakua. Po přidání 10 mg chymotrypsinu byla směs míchána za laboratorní teploty po dobu 30 min. Potom bylo přidáno 8 ml etylacetátu nasyceného vodou obsahujícího 0,005 M acetyl-L-tryptofanu a 0,008 M L-leucinamidu. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty. 0,5 ml alikvoty organické fáze odebírané v hodinových intervalech byly analyzovány tenkovrstvou chromatografií (destičky Silufol, systém chloroform-etanol-konc. amoniak = 25:10:0,25). Skvrna o mobilitě $R_f = 0,65$ byla vyříznuta a eluována 4 ml etanolu, ve kterém byla měřena pak absorbance při 280 nm. Molární koeficient extinkce acetyl-L-tryptofanyl-L-leucinamidu v etanolu byl uvažován jako 6500. Po 24 hod. byl

výtěžek syntézy dosažen téměř 60 %. Po sedminásobném použití sorbovaného chymotrypsinu si preparát udržel téměř 50 % své původní aktivity.

Příklad 8

0,5 ml 0,5 M fosfátového pufru (pH 7,1) bylo smícháno s 0,5 g MLF sorbentu a odvdzdušněno za vakua. Po přidání 10 mg chymotrypsinu byla směs míchána za laboratorní teploty po dobu 30 min. Potom bylo přidáno 8 ml etylacetátu nasyceného vodou obsahujícího 0,005 M acetyl-L-tryptofanu a 0,008 M L-leucinamidu. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty. 0,5 ml alikvoty organické fáze odebírané v hodinových intervalech byly analyzovány tenkovrstvou chromatografií (destičky Silufol, systém chloroform-etanol-konc. amoniak = 25:10:0,25). Skvrna o mobilitě $R_f = 0,65$ pak byla vyříznuta a eluována 4 ml etanolu, ve kterém byla měřena pak absorbance při 280 nm. Molární koeficient extinkce acetyl-L-tryptofanyl-L-leucinamidu v etanolu byl uvažován jako 6500. Po 24 hod. byl výtěžek syntézy dosažen téměř 65 %. Po sedminásobném použití sorbovaného chymotrypsinu si preparát udržel téměř 55 % své původní aktivity.

Příklad 9

0,5 ml 0,5 M fosfátového pufru (pH 7,1) bylo smícháno s 0,5 g sorbentu na bázi blokového kopolymeru polyetylenoxid-polykaprolaktam a odvdzdušněno za vakua. Po přidání 10 mg chymotrypsinu byla směs míchána za laboratorní teploty po dobu 30 min. Potom bylo přidáno 8 ml etylacetátu nasyceného vodou obsahujícího 0,005 M acetyl-L-tryptofanu a 0,008 M L-leucinamidu. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty. 0,5 ml alikvoty organické fáze odebírané v hodinových intervalech byly analyzovány tenkovrstvou chromatografií (destičky Silufol, systém chloroform-etanol-konc. amoniak = 25:10:0,25). Skvrna o mobilitě $R_f = 0,65$ byla vyříznuta a eluována 4 ml etanolu, ve kterém byla měřena pak absorbance při 280 nm. Molární koeficient extinkce acetyl-L-tryptofanyl-L-leucinamidu v etanolu byl uvažován jako 6500. Po 24 hod. byl výtěžek syntézy dosažen téměř 68 %. Po sedminásobném použití sorbovaného chymotrypsinu si preparát udržel téměř 58 % své původní aktivity.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Imobilizované enzymy pro katalýzu organických reakcí, zejména pro katalytické reakce prováděné v organickém rozpouštědle nemísícím se s vodou, vyznačující se tím, že enzymy jsou navázány na polymerní sorbent, vybraný ze skupiny zahrnující polyetylentereftalát, polykaprolaktam, polyfenylenoxid, blokový kopolymer polyetylenoxidu a polykaprolaktamu a polykondenzát melaminu s for-

maldehydem, o specifickém povrchu 1 až 700 m²/g.

2. Způsob výroby imobilizovaných enzymů podle bodu 1, vyznačující se tím, že se imobilizace enzymů na polymerní sorbent provádí prostou sorbcí enzymů z vodného roztoku o pH prostředí 4 až 10, při teplotě 1 až 40 °C, po dobu 0,1 až 48 hodin.