



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К П А Т Е Н Т У

(11) 984405

(61) Дополнительный к патенту -

(22) Заявлено 14.05.80 (21) 2919350/23-04

(23) Приоритет - (32) 15.05.79

(31) 7912285 (33) Франция

Опубликовано 231282. Бюллетень № 47

Дата опубликования описания 231282

(51) М. Кл.³

С 07 С 101/00
С 12 Р 13/04

(53) УДК 547.466.
.07 (088.8)

(72) Авторы
изобретения

Иностранцы
Клод Жиллонье и Марсель Гиварш
(Франция)

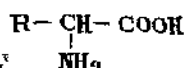
(71) Заявитель

Иностранная фирма
"А.Е.Ц. Сосьете де Шми Органик Э.Биоложик"
(Франция)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ D- α -АМИНОКИСЛОТ

РПФК

Изобретение относится к усовершенствованному способу получения D- α -аминокислот общей формулы (1)



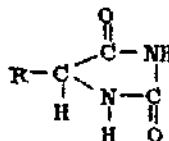
где R - 2-метилмеркаптоэтильная, фенильная, бензильная, 2-метилпропильная, пропильная, индолилметильная, 4-оксифенильная, 3-оксифенильная или 3-цианопропильная группы, используемых в фармацевтической промышленности.

Наиболее близким к предлагаемому является способ получения природных D- α -аминокислот микробиологическим гидролизом соответствующих гидантоинов с помощью микроорганизмов, например, *Pseudomonas solanacearum* AJ 11149, *Pseudomonas caryophylli* AJ 11150. Выходы целевых продуктов составляют в среднем 20% [1].

Недостатком известного способа является низкий выход целевых продуктов.

Целью изобретения является повышение выхода целевых продуктов.

Указанная цель достигается тем, что согласно способу получения D- α -аминокислот вышеуказанной общей формулы (1), где R - имеет вышеуказанное значение, микробиологическим гидролизом гидантоина общей формулы (11)



где R - имеет вышеуказанные значения с помощью микроорганизма *Pseudomonas* sp., НМ-40 (СВS 259.79) и образующуюся D- α -аминокислоту выделяют хроматографией на ионообменной смоле Dowex - 50 или осаждением в изoeлектрической точке.

Выходы целевых продуктов составляют 80-92,5%.

Отличием предлагаемого способа является то, что гидролиз осуществляют микроорганизмом *Pseudomonas* sp. НМ-40 (СВS 259.79).

Положительным эффектом предлагаемого способа является значительное увеличение выхода целевых продуктов с 20% до 80-92,5%.

Пример 1. а. Получение ферментной композиции.

Готовят культуральную среду следующего состава, г/л:

Глюкоза	20	
Однозамещенный фосфат калия	3	5
Двухзамещенный фосфат калия	7	
Сульфат магния	0,7	
Сульфат марганца	0,02	10
Сульфат железа (II)	0,02	
Хлорид натрия	1	
Гидантоин D,L-метионина	3	

Среду разливают в склянки емкостью 15 250 см³ из расчета 50 см³ на склянку и стерилизуют в течение 15 мин при температуре 120°C. После посева штамма *Pseudomonas Sp. NM-40* на избирательной среде с агаром склянки перемешивают (250 об/мин) в течение 48 ч при температуре 30°C.

Продуктивное выращивание осуществляют в ферментере емкостью 2 л, содержащем 1 л вышеуказанной культуральной среды и 1 см³ противоядного агента. Засевают склянки штаммом, приготовленным как указано выше. Культуру выращивают при температуре 30°C в течение 48 ч при перемешивании турбинной мешалкой (скорость вращения 500 об/мин) и при аэрации стерильным воздухом с расходом 1 л/мин.

К концу роста клеточную массу отделяют центрифугированием и суспендируют в 50 см³ дистиллированной воды. Данная суспензия содержит 7,6 г сухого экстракта на 100 см³.

в. Гидролиз D,L-фенилаланингидантоина.

К 200 см³ дистиллированной воды добавляют 5 г D,L-фенилаланингидантоина. Нагревают с целью частичного растворения гидантоина, затем среду охлаждают до 37°C. Доводят pH до 7,8 путем добавления 1н. раствора едкого натра. После этого добавляют 25 см³ клеточной суспензии, полученной раньше. Доводят объем реакционной смеси до 250 см³, а pH доводят до 7,8.

Реакционную смесь помещают в атмосферу азота, поддерживают температуру 37°C, поддерживают pH 7,8 путем постепенного добавления 1н. раствора едкого натра.

После умеренного перемешивания в течение 24 ч весь гидантоин переходит в раствор.

Реакционную смесь осветляют центрифугированием, затем пропускают через ионообменную смолу (смола Dowex 50, форма H⁺), элюируя 2н. раствором аммиака. Щелочные фракции упаривают досуха. Получают 3,98 г D-фенилалани-

на (выход 92,5%) со следующими свойствами.

$$[\alpha]_D^{20} = 29,2^\circ \pm 2^\circ \quad (c = 1, \text{ вода})$$

$$N (\%) = 8,63 \quad (\text{по теории } 8,48)$$

Потенциометрическое титрование: 93,3%.

Оптическая чистота полученного D-фенилаланина превышает 93%.

Пример 2. К 150 см³ дистиллированной воды добавляют 4 г D,L-метионингидантоина и 8 см³ клеточной суспензии, содержащей 0,6 г сухого экстракта (полученного в условиях, описанных в примере 1).

Доводят pH до 7,8 путем добавления 1н. раствора едкого натра. Объем реакционной смеси доводят до 200 см³ путем добавления дистиллированной воды. Реакцию проводят в течение 24 ч при температуре 37°C, поддерживая pH = 7,8 путем постепенного добавления 1н. раствора едкого натра.

Содержание D-метионина в реакционной смеси определяют по методу Штейна и Мура: его концентрация составляет 17 г/л, что соответствует 100% превращения в расчете на взятый D,L-метионингидантоин.

Реакционную смесь осветляют центрифугированием, затем пропускают через ионообменную смолу (смола Dowex 50, форма H⁺). Получают 2,7 г D-метионина (выход 80%) со следующими свойствами:

$$[\alpha]_D^{20} = -19,3^\circ \quad (c = 1; \text{ 5н. хлористоводородная кислота})$$

$$N (\%) = 9,36-9,42 \quad (\text{теоретическое: } 9,39)$$

Оптическая чистота полученного D-метионина близка к 90%.

Пример 3. а. Получение ферментной композиции.

Готовят культуральную среду следующего состава, г/л:

Глюкоза	20
Дрожжевой экстракт	10
Бактопептон	10

Среду разливают в склянки емкостью 250 см³ из расчета 50 см на склянку и стерилизуют в течение 15 мин при температуре 120°C. После посева штамма *Pseudomonas Sp. NM-40* склянки перемешивают (250 об/мин) в течение 24 ч при температуре 30°C.

Содержимое одной склянки используют для обсеменения ферментера емкостью 2 л, содержащего 1 л вышеуказанной среды. Культуру выращивают в течение 24 ч при температуре 30°C при перемешивании турбинной мешалкой со скоростью вращения 500 об/мин и аэрацией стерильным воздухом с расходом 1 л/мин.

К концу выращивания микробную массу отделяют центрифугированием и су-

пендируют в 100 см³ дистиллированной воды, эта суспензия содержит 8,9 г сухого клеточного экстракта.

в. Ферментный гидролиз метионин-гидантоина.

Растворяют 5 г D-α-метионингидантоина в 200 см³ дистиллированной воды. Доводят pH до 7,5 путем добавления 0,1 н. раствора едкого натра, затем добавляют 20 см³ полученной ранее клеточной суспензии, объем доводят до 250 см³, реакционную смесь помещают в атмосферу азота, температура реакционной смеси 37°C.

После проведения процесса в течение 5 ч содержание метионина в среде определяют хроматографическим методом по методике Штейна и Муфа. Определяют гидантоиназную активность клеточной суспензии (количество молей метионина, продуцированного на 1 мг сухого клеточного экстракта в 1 ч ферментативной реакции) она составляет 4,5.

После проведения процесса в течение 22 ч реакционную смесь осветляют центрифугированием. Образовавшийся метионин отделяют пропусканием через ионообменную смолу (Dowex 50, форма H⁺), элюируя 2н. раствором аммиака.

Элюат выпаривают досуха и сушат, получают 3,9 г D-метионина (выход 91%) со следующими свойствами:

N (%) = 9,4 (теоретическое содержание 9,33%)

$[\alpha]_D^{20} = 23^\circ$ (C = 1; 5н. хлористоводородная кислота)

Потенциометрическое титрование 98%.

Пример 4. Ферментативный гидролиз L-оксифенилглицингидантоина.

Готовят 100 см³ суспензии, содержащей 8,9 г сухого клеточного экстракта в условиях, описанных в примере 3 а.

Растворяют 5 г 4-оксифенилглицингидантоина в 250 см³ дистиллированной воды. Доводят pH до 7,5 путем добавления 0,1 н. раствора едкого натра и добавляют 20 см³ клеточной суспензии. Объем доводят до 250 см³, реакционную смесь помещают в атмосферу азота, температура реакционной смеси 37°C.

После проведения процесса в течение 5 ч определяют содержание 4-оксифенилглицина. Гидантоиназная активность составляет 1,8 μ M аминокислоты на 1 мг сухого клеточного экстракта в 1 ч протекания ферментативной реакции.

После проведения процесса в течение 22 ч 4-оксифенилглицин отделяют пропусканием через ионообменную смолу (Dowex 50, форма H⁺). Получают 3,78 г D-(4-оксифенил)-глицина (выход 87%), оказавшегося однородным

при хроматографии, со следующими свойствами:

N (%) = 7,6 (теоретическое содержание 8,4)

$[\alpha]_D^{20} = -135^\circ$ (C = 1, 5н. хлористоводородная кислота)

Потенциометрическое титрование 110%.

Пример 5. Выращивают штамм *Pseudomonas* Sp, HM-40 в следующих условиях: Состав культуральной среды, г/л:

Глюкоза	20
Двузамещенный фосфат калия	7
Однозамещенный фосфат калия	3
Сульфат магния	0,7
Сульфат марганца	0,02
Сульфат железа	0,02
Хлорид натрия	1
D-L-метионин-гидантоин	3
Дрожжевой экстракт	2

Предварительное выращивание.

Первое предварительное выращивание выполнено в склянке емкостью 250 см³, содержащей 50 см³ среды, в течение 24 ч. Второе предварительное выращивание посева, сделанного из предыдущей склянки, осуществлено тоже в течение 24 ч в ферментере емкостью 2 л, содержащем 1 л культуральной среды.

Продуцирующая культура.

Содержимое двухлитрового ферментера используют для обсеменения ферментера емкостью 7,5 л, содержащего 5 л среды. Культуру выращивают в течение 24 ч при температуре 37°C при аэрации стерильным воздухом с расходом 5 л/мин и перемешивании турбинной мешалкой со скоростью 500 об/мин.

Полученная в таких условиях биомасса составляет 3,8 г сухого экстракта на 1 л культуральной среды.

Ферментативная реакция.

По окончании выращивания микробную массу отделяют от среды центрифугированием и суспендируют в 250 см³ дистиллированной воды.

Суспендируют 10 г D,L-фенилглицингидантоина в 400 см³ дистиллированной воды и доводят pH до 7,5 путем добавления 0,1 н. раствора едкого натра. Добавляют 50 см³ вышеописанной клеточной суспензии и реакционный объем доводят до 500 см³ добавлением воды. Помещают в атмосферу азота при температуре 37°C, поддерживая pH = 7,5 в течение 17 ч.

После протекания процесса в течение 17 ч реакционную смесь осветляют центрифугированием, упаривают до 1/5 первоначального объема и подкис-

ляют до pH = 1 путем добавления концентрированной соляной кислоты.

Образующийся осадок отделяют фильтрованием и сушат. Хроматографический анализ показывает, что он представляет собой фенилглицингидантоиновую кислоту со следующими свойствами:

$N (\%) = 13,9\%$ (теоретическое содержание 14,4%)

$[\alpha]_D^{20} = -137^\circ$ ($c = 1$; 1% аммиак)

Выход полученной D-гидантоиновой кислоты 6,3% по отношению к взятому гидантоину.

Маточный раствор снова упаривают и доводят до pH = 5 путем добавления едкого натра, выпавший в осадок D-фенилглицин отделяют фильтрованием, промывают водой и этиловым спиртом, сушат. Получают 7,6 г D-фенилглицина (выход 88%) со следующими свойствами:

$N (\%) = 9,2$ (теоретическое содержание 9,3%)

$[\alpha]_D^{20} = -148^\circ$ ($c = 1$; 5н. хлористоводородная кислота)

Пример 6. Выращивают культуру *Pseudomonas* Sp., НМ-40 в условиях примера 5. После центрифугирования микробную массу суспендируют в 0,1 М фосфатом буферном растворе при pH = 7,8, эту суспензию используют в качестве катализатора гидролиза различных гидантоинов, условия реакции следующие:

10 начальная концентрация гидантоина 20 г/л в 0,1 М фосфатном буферном растворе при pH = 7,8;

15 примененная биомасса составляет 6,5 г (в расчете на сухой экстракт) на 1 л реакционной смеси;

температура реакции 37°C;

продолжительность реакции 5 ч.

20 Затем определяют содержание в реакционной смеси образующейся аминокислоты и по ней вычисляют ферментативную активность клеточного экстракта.

25 Вычисленная таким образом активность представлена в таблице в микромолях аминокислоты, образовавшейся на 1 мг сухого ферментного экстракта в 1 ч реакционного времени.

Результаты представлены в таблице.

Субстрат	Продукт	Активность штамма, мкмоль/мг/ч
DL-метионингидантоин	D-метионин	2,4
DL- 2-фенил -аланингидантоин	D- (2-фенил)-аланин	2,0
DL-лейцингидантоин	D-лейцин	1,6
DL-валингидантоин	D-валин	1,0
DL-триптофангидантоин	D-фенилглицин	0,6
DL- (4-оксифенил)-глицингидантоин	D- (4-оксифенил)-глицин	0,6
DL- (3-цианпропил)-гидантоин	D- 1-амино- (4-циан) пропионовая кислота	3,5
DL- (3-оксифенил)-глицингидантоин	D- (3-оксифенил)-глицин	0,7

Пример 7. По способу, описанному в примере 6, получают клеточную суспензию *Pseudomonas* НМ-40 в буферном фосфатном растворе. Эта суспензия содержит 6,5 г сухого экстракта в 100 см³, перед применением клетки измельчены ультразвуком при условиях:

Аппарат PONS, оборудованный зондом TC4C

60 Частота ультразвука, кГц 20

Обработанный объем, см³ 15

65 Продолжительность измельчения, мин 10

Обработанная таким образом суспензия применена для катализа процесса гидролиза гидантоинов метионина, фенилаланина и фенилглицина в условиях эксперимента, описанных в примере 6. При этом измеренная активность была следующей, мкмоль/мг/ч:

DL-метионингидантоин	1,7
DL-(2-фенил)-аланингидантоин	1,0
DL-фенилглицингидантоин	0,8

Пример 8. Клеточную суспензию *Pseudomonas* Sp. NM-40 в воде, полученную, как описано в примере 5, и содержащую 7,3 г сухого экстракта в 100 см³, лиофилизируют перед применением в следующих условиях.

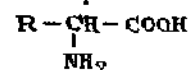
120 см³ суспензии разливают в 4 колбы емкостью 500 см³, замораживают и выдерживают при пониженном давлении (0,5·10⁻² мм рт.ст.) в течение 16 ч. Получают 8,8 г порошка лиофилизованного фермента, который применяют в условиях, описанных в примере 6.

Определена следующая активность, мкмоль/мг/ч:

DL-метионингидантоин	2,4
DL-фенилглицингидантоин	0,4
DL-(2-фенил)-аланингидантоин	1,5

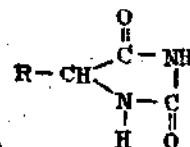
Формула изобретения

Способ получения D-α-аминокислот общей формулы



где R-2-метилмеркаптоэтильная, фенильная, бензильная, 2-метилпропильная, пропильная, индолилметильная, 4-оксифенильная, 3-оксифенильная или 3-цианопропильная группы,

микробиологическим гидролизом гидантоина общей формулы



где R имеет указанные значения, с последующим выделением целевого продукта, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода целевых продуктов, гидролиз осуществляют микроорганизмом *Pseudomonas* Sp., NM-40 (CBS 259,79).

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе
1. Патент Франции № 7817199, кл. С 12 В 13/06 опублик. 05.01.79 (прототип).

Составитель Ю. Хропов

Редактор Г. Волкова

Техред Т. Маточка

Корректор В. Бутяга

Заказ 9969/78

Тираж 445

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4

