

УДК 577.152:547.466

© 1991 г.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ РАСПЩЕПЛЕНИЯ РАЦЕМАТОВ АМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Верховская М. А., Ямков И. А.

Обзор посвящен современным методам расщепления рацематов аминокислот и их производных под действием ферментов. Рассмотрены процессы энантиоселективного ферментативного гидролиза как С- (эфиры, амиды, нитрилы аминокислот), так и N-производных (ацил- и аллоксикарбониламинокислоты), а также их циклических производных. Приведены примеры каталитического получения оптически активных производных из рацемических аминокислот.

Библиография – 119 ссылок.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	2250
II. Энантиоселективный ферментативный гидролиз производных аминокислот	2252
III. Энантиоселективная ферментативная дериватизация аминокислот и их производных	2272

I. ВВЕДЕНИЕ

Оптически активные аминокислоты находят широкое применение в различных отраслях народного хозяйства, в том числе в сельском хозяйстве (кормовые добавки, гербициды), пищевой промышленности (подсластители, ароматизаторы, продукты для диетического питания), медицине (инфузионные растворы, терапевтические средства). Стремительный рост промышленного производства оптически активных аминокислот связан в большей степени с открытием новых областей их использования. Так, например, внедрение в производство искусственного подсластителя аспартамина вызвало многократное увеличение объема производства *L*-фенилаланина и *L*-аспаргиновой кислоты за 5 лет (табл. 1) [1].

Совершенствование методов получения аминокислот с использованием новых достижений биотехнологии позволяет значительно снизить стоимость оптически активных аминокислот, что, в свою очередь, открывает возможности их применения в новых областях и значительно расширяет рынок сбыта. Наглядным примером такого влияния технологии на цену и объем производства выпускаемой аминокислоты является производство лизина (табл. 2) [1].

Как правило, химический синтез аминокислот приводит к рацемическому продукту, получение же энантиомеров требует стадии оптического разделения. Существующие методы расщепления рацематов аминокислот можно разделить на три основные группы: физико-химические методы, химические и биотехнологические (с участием ферментов или клеток микроорганизмов). Физико-химические методы включают механическое разделение, селективную кристаллизацию и хроматографическое разделение. В случае химического разделения на рацемическую аминокислоту или ее производное действуют хиральным соединением и один из диастереомеров отделяют с помощью кристаллизации, хроматографии и т. д.

Таблица 1

Производство *L*-фенилаланина и *L*-аспарагиновой кислоты [1]

Год	Аминокислота	Основная область применения	Общая стоимость (млн. долл.)
1979	<i>L</i> -Phe	Инфузионные растворы	7,4
1984	<i>L</i> -Phe	Аспартам	~100,0
1979	<i>L</i> -Asp	Терапия, ароматизаторы	1,2
1984	<i>L</i> -Asp	Аспартам	~15,0

Таблица 2

Производство *L*-лизина

Год	Эффективность производства (усл. ед.)	Средняя цена (долл./фунт)	Мировой объем производства (млн. фунтов)	Общая стоимость (млн. долл.)
1956	1	23,7	0,2	5
1969	4	4,45	7,0	31
1980	8	2,10	90,0	189

Первые две группы пригодны для решения аналитических задач, а также для крупномасштабного разделения ограниченного ряда аминокислот (например, *L*-глутаминовой кислоты с помощью селективной кристаллизации), однако они не годятся для промышленного получения широкого набора оптически активных аминокислот.

Наиболее распространенными в настоящее время являются методы получения энантиомеров аминокислот с использованием ферментов или микробных клеток. В данном обзоре не рассматриваются работы, опубликованные до 1982 г., которые вошли в обзор Швядаса и Галаева [2]. Высокая скорость и стереоспецифичность — характерные особенности ферментативных реакций. Значительное ускорение реакции при использовании ферментов можно продемонстрировать на следующем примере: константа скорости неферментативного гидролиза мочевины — $4,15 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ при 100°C , в то время как константа скорости реакции, катализируемой уреазой равна $3 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$ при 20°C . Другой, не менее важной чертой ферментов является специфичность по отношению к реакциям и субстратам. Специфичность может быть абсолютной или почти абсолютной, так некоторые ферменты действуют на молекулы только одного субстрата, в то время как другие действуют на молекулы с сильными различиями в структуре, например, на целые классы соединений. Как правило, ферменты проявляют высокую специфичность к реакциям, но некоторые из них способны катализировать и «чужие» реакции, например большинство гидролаз катализируют реакции, типичные для трансфераз. Кроме того, некоторые группы ферментов катализируют различные типы реакций, т. е. проявляют мультикаталитическую функцию. В большинстве случаев ферменты «безошибочно» демонстрируют абсолютную стереоспецифичность в катализе, когда они действуют на участки молекулы, связанные с хиральным центром субстрата, или образуют хиральные продукты из ахиральных субстратов, исключением в этом отношении являются рацемазы и изомеразы. Даже ферменты, обладающие широкой специфичностью по отношению к структуре субстрата, могут проявлять абсолютную стереоспецифичность; например, оксидазы *D*-аминокислот (ЕС 1.4.3.3.) катализируют окисление широкого круга *D*-амино- и *D*-иминокислот, не затрагивая *L*-аминокислот, аналогично действуют оксидазы *L*-амино-

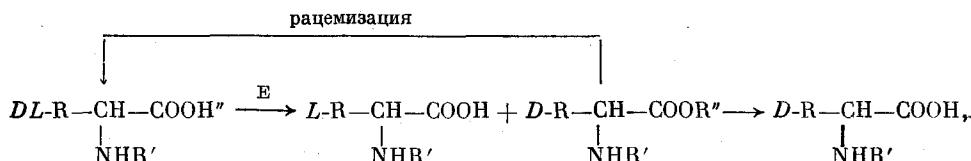
кислот (ЕС 1.4.3.2.). Стереоспецифичность не является обязательным свойством для ферментов, действующих на группы, удаленные от хирального центра субстрата; так карбоксизтераза (ЕС 3.1.1.1.) катализирует гидролиз этиловых эфиров *L*- и *D*-тироцина с одинаковой скоростью. В целом стереоспецифичность, свойственная ферментам, трудно достижима химическим путем, несмотря на то что в последние годы асимметрический синтез получил значительное развитие.

В силу этих факторов ферментативные методы получения оптически активных аминокислот находятся в центре внимания исследователей на протяжении нескольких десятилетий. Их можно разделить на 2 группы: 1) энантиоселективный ферментативный гидролиз производных аминокислот; 2) энантиоселективная ферментативная дериватизация аминокислот и их производных.

II. ЭНТИОСЕЛЕКТИВНЫЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

1. Сложные эфиры аминокислот

Энантиоселективное ферментативное расщепление сложных эфиров — как метод получения оптически активных аминокислот известен еще с начала века [3].



E-фермент.

Продуктами гидролиза являются *L*-аминокислота и эфир *D*-изомера, который подвергают неферментативному гидролизу или рацемизации для последующего вовлечения в процесс расщепления рацемата. Известно много ферментов животного и микробного происхождения, обладающих эстеразной активностью. Наиболее изученным из них являются α -химотрипсин, отличающийся высокой активностью и энантиоселективностью действия, в первую очередь, по отношению к специфическим субстратам — эфирам арматических *N*-ациламинокислот. Практическому применению фермента для разделения рацематов препятствует его высокая цена и недоступность в больших количествах; иммобилизация фермента позволяет снизить стоимость биокатализатора. В настоящее время исследования химотриптического гидролиза специфических субстратов направлены, в основном, на разработку непрерывных процессов получения оптически активных аминокислот [4, 5]. Так, *N*-ацетил-*L*-фенилаланин получают из его рацемического метилового эфира в реакторе мембранныго типа (мощность — 1,3 кг/м²·дн) [4].

Другой путь снижения стоимости биокатализатора — использование более дешевых ферментов, в том числе протеаз микробного происхождения и целых клеток. Так, Глензер с соавт. [6, 7] изучили возможность использования пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для энантиоселективного гидролиза рацемических эфиров N-ацетиламинонкислот. Ранее было известно [4], что клетки *S. cerevisiae* обладают оксидоредуктазной активностью: они катализируют энантиоспецифическое восстановление кетонов; об их гидролитической активности имелось весьма мало данных. Оказалось, что они способны гидролизовать сложные эфиры N-

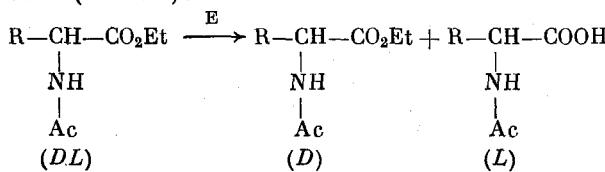
Таблица 3

Энантиоселективный анаэробный гидролиз эфиров N-ацетиламинокислот
(*DL*-AcNHCH(R)COOEt) клетками *Saccharomyces cerevisiae*

Субстрат, №	R	Выход эфира D-АК, %	Энантио-мерный избыток, %	Субстрат, №	R	Выход эфира D-АК, %	Энантио-мерный избыток, %
1	Me	47	100	4	CH ₂ CHMe ₂	48	92
2	Et	48	96	5	CH ₂ Ph	38	97
3	изо-Pr	75	13	6	CH ₂ CO ₂ Et	49	86
3	изо-Pr	38	80 *	7	CH ₂ CH ₂ CO ₂ Et	46	89

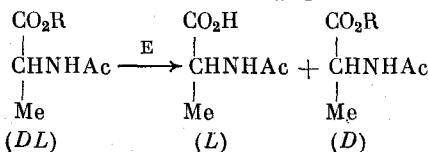
* Аэробный гидролиз.

ацетиламинокислот с неразветвленной цепью с высокой степенью энантиоселективности (табл. 3).



Заместители в β -положении ингибируют реакцию (субстрат 3, табл. 3), γ -заместители не оказывают негативного действия (субстрат 4, табл. 3). Гидролиз не протекает в случае субстратов с N-ацетиламиногруппой в β -положении. При наличии двух химически различных эфирных групп (субстраты 6 и 7, табл. 3) реакция проходит только по α -эфирной группе, не затрагивая ω -группу эфиров N-ацетил-L-аспартиновой и -глутаминовой кислот. Аналогичным образом характеризуется и гидролитическое действие α -химотрипсина.

Изменения в спиртовой компоненте, как правило, не оказывают значительного влияния на ход гидролиза эфира N-ацетилаланина:



R — метил, этил, *n*-пропил, изо-пропил, *n*-бутил, *n*-октил, бензил, циклогексил, *tert*-*m*-бутил.

трет-Бутиловый эфир не подвергается гидролизу, метиловый эфир гидролизуется несколько медленнее, чем остальные эфиры первичных и вторичных спиртов, скорость расщепления которых примерно одинакова, а энантиомерный избыток — не менее 96 %.

Исходя из того, что эстеразное действие клеток *S. cerevisiae* и α -химотрипсина имеет много общего, было выдвинуто предположение, что основным действующим началом являются протеиназы. Для подтверждения этого был проведен гидролиз субстрата 1, катализируемый мутантным штаммом дрожжей ABYS1, характеризующимся недостатком неспецифических протеиназ и карбоксипептидаз, а также диким штаммом X-2180-1A (табл. 4).

Во многих случаях использование ферментов и микробных клеток для расщепления рацемических эфиров ограничено низкой растворимостью субстратов в воде. Применение двухфазных систем «вода — не смешивающейся с водой органический растворитель» не всегда возможно, так, на-

Таблица 4

Ферментативный гидролиз этилового эфира N-ацетил-DL-аланина

Время реакции, ч	<i>S. cerevisiae</i>		Дикий штамм X-2180-1A		Мутантный штамм ABYS1	
	энантиомер-ный избыток, %	выход D-эфира, %	энантиомер-ный изомер, %	выход D-эфира, %	энантиомер-ный избыток, %	выход D-эфира, %
24	92	не определяли	89	52	1	95
48	100	47	100	43	2	81

Таблица 5

Гидролиз метиловых эфиров N-ацетил-DL-аминокислот под действием пекарских дрожжей в водной среде и в обращенных мицеллах

№ п/п	Субстрат *	Про-дукт **	Время реакции, ч		Выход, %		Избыток энантио-мера, %	
			вода	обращен-ные мицеллы	вода	обращен-ные мицеллы	вода	обращен-ные мицеллы
1	Phg	1а	72	48	64	60	96	98
		1б	72	48	60	46	>99	>99
2	Phe	2а	48	24	57	53	98	98
		2б	48	24	56	48	99	99
3	Ala	3а	60	32	72	65	97	96
		3б	60	32	52	40	>99	>99

* Метиловый эфир N-Ac-DL-АК;

** N-Ac-L-АК (а), N-Ac-D-АК (б).

пример, при добавлении к водной системе, содержащей фермент и субстрат, хлороформа или этилацетата гидролиз эфиров N-ацетиламинокислот (аланина, фенилаланина, фенилглицина) не наблюдался [8], что, по-видимому, связано со сдвигом равновесия «гидролиз — синтез» в данной системе в сторону синтеза эфира. Для решения этой проблемы Фаднавис с соавт. [8] предлагают проводить ферментативный гидролиз эфиров в обращенных мицеллах. Авторы считают, что клетки микроорганизмов, обладающие ферментативной активностью, можно в принципе рассматривать как систему, содержащую фермент, иммобилизованный включением или присоединением к клеточной стенке. Для подтверждения этого предположения был осуществлен гидролиз эфиров N-ацетиламинокислот клетками *S. cerevisiae*, спитыми глютаровым альдегидом в водной среде и в обращенных мицеллах (органическая фаза — хлороформ — изооктан (1:9 — соотношение объемов), детергент — бис-(2-этилгексил)сульфосукцинат, натриевая соль) (табл. 5).

Ферментативный гидролиз D-энантиомера не наблюдался, спонтанный гидролиз в обращенных мицеллах составил менее 1,5% за 72 ч (меньше, чем в водной среде). Преимущества использования обращенных мицелл видны в случае субстратов с низкой растворимостью, например при гидролизе 5 г субстрата 1 (табл. 5) в 200 мл через 72 ч. Энантиомерный избыток непрореагированного D-эфира составил 30% в водной среде и 75% — в среде обращенных мицелл.

Поиск ферментов, способных расщеплять эфиры рацемических аминокислот привел к обнаружению эстеразной активности у липаз [9, 10]. Из литературных данных известно, что липазы способны энантиоселективно расщеплять сложные эфиры рацемических спиртов, а также карбоновых кислот, они легко доступны, дешевы, стабильны. Исследование

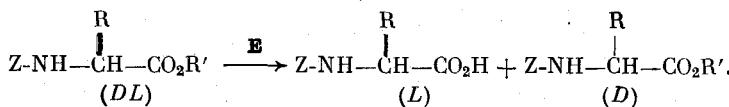
Таблица 6

Гидролиз эфиров N-З-аминокислот (Z-NH-CH(R)CO₂R') под действием липаз

№ п/п	R	R' = CH ₂ CH ₂ Cl						R' = CH ₂ CF ₃	
		A. niger		P. fluorescence		C. cylindraceae		ПЖ	
		A	B	A	B	A	B	A	B
1	Метил	36	89	46	16	38	7	39	21
2	Этил	40	96	49	52	36	7	40	97
3	н-Пропил	27	86	43	58	—	—	39	98
4	н-Бутил	32	85	52	60	42	30	38	92
5	н-Пентил	44	95	25	80	47	66	40	87
6	н-Гексил	31	94	47	87	—	—	33	61
7	изо-Пропил	14	92	8	53	—	—	Не субстрат	
8	CH ₂ =CHCH ₂	34	86	40	52	31	27	38	93
9	Бензил	32	94	12	57	35	63	40	>99
10		37	94	40	70	35	43	44	89

Примечание: А — степень конверсии, %; Б — избыток *L*-энантиомера, %

гидролиза субстрата — эфира N-(Z)- α -амино-*D,L*-гентановой кислоты под действием липаз из шести микроорганизмов показало, что наилучшие результаты были получены в случае липазы из *Aspergillus niger* и удовлетворительные — в случае липаз из *P. fluorescence* и *C. cylindracea*; под действием этих трех ферментов, а также липазы из поджелудочной железы (ПЖ) свинины был проведен гидролиз эфиров ряда природных и синтетических аминокислот (табл. 6).



В общем случае энантиоселективность действия липаз убывает в ряду: $\text{ПЖ} \approx \text{из } A. niger > \text{из } P. fluorescence > \text{из } C. cylindracea$. Три типа неприродных аминокислот: 1) с неразветвленной углеродной цепью (субстраты 2–6, табл. 6), 2) с ненасыщенной связью (№ 8, табл. 6) и 3) гетероароматическим кольцом (№ 10, табл. 6) в боковой цепи R были разделены с высокими значениями энантиомерного избытка (85–95%) липазами из *A. niger* и из поджелудочной железы (кроме субстрата 6, табл. 6), хотя условия реакции не были оптимизированы. Хороший результат особенно важен в случае субстрата 10 (табл. 6), так как другие ферментативные процессы (например, с использованием ацилазы I) не позволяют расщепить радиометретром этой гетероароматической аминокислоты.

Известно, что переход от эфиров аминокислот с N -ациламиногруппой к эфирам аминокислоты со свободной аминогруппой приводит к уменьшению энантиоселективности ферментативного гидролиза [11], однако во многих случаях она достаточно велика, и возможно разделять энантиомеры аминокислот со свободной аминогруппой путем ферментативного энантиоселективного гидролиза их сложных эфиров. Одним из наиболее широко используемых биокатализаторов для этой цели — α -химотрипсин. В последние годы исследования в этом направлении можно разделить на две основные группы. К первой относятся работы по разработке эффективных непрерывных процессов с участием иммобилизованного α -химотрипсина [12, 13]; снизить стоимость процесса можно также за счет

рацемизации *D*-изомера и его дальнейшего вовлечения в процесс разделения [14]. Такие процессы можно осуществлять и в двухфазных системах «вода — не смешивающийся с водой органический растворитель» [15, 16].

Ко второй группе исследований можно отнести работы, посвященные химотриптическому расщеплению рацемических аминокислот, содержащих заместители в боковой группе R [17] или при α -углеродном атоме [18]. Так, метиловые (этиловые) эфиры орто- (мета-, пара-) фтор-*D,L*-фенилаланина можно разделить на энантиомеры с высокими выходами и энантиомерной чистотой [17].

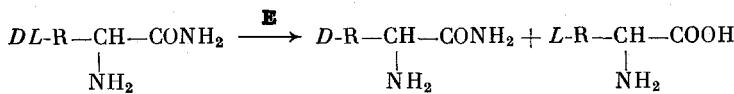
Известно, что введение α -заместителей значительно снижает скорость ферментативного гидролиза; например при введении α -метильной группы в молекулу амида N-ацетилтирозина скорость гидролиза падает в 10^5 раз, что связано, по-видимому, с неправильной ориентацией гидролизуемой связи [19]; в случае эфиров аминокислот эффект менее значителен. Однако потребность в оптически активных α -метиламинокислотах существует, например, они находят применение в исследовании связи «структура — активность» в пептидных гормонах, поэтому ферментативное разделение их рацемических производных представляет значительный интерес. В работе [18] осуществлено разделение метиловых эфиров α -метил-*D,L*-аминокислот (триптофана, фенилаланина и пара-фтор-фенилаланина) (37°C ; pH 5,0; время — $30 \div 40$ ч).

Высокая энантиоселективность действия фермента позволила получить *L*-изомеры с хорошими выходами (33—36%) и оптической чистотой (96% — для α -метил-*L*-триптофана); примесь *D*-изомера авторы относят за счет неферментативного спонтанного гидролиза, так как гидролиз *D*-эфиров под действием α -химотрипсина не наблюдался.

Для эфиров аминокислот со свободной аминогруппой как и в случае эфиров N-ациламинокислот альтернативой использования дорогостоящих ферментов животного происхождения является применение ферментов (или ферментных комплексов) из микроорганизмов или целых клеток. Так, в работе [20] осуществлено расщепление метиловых эфиров *D,L*-фенилаланина и *D,L*-тирозина, также бензилового эфира *D,L*-аланина в препаративном масштабе (25 г), и исследованы закономерности гидролиза эфиров ряда аминокислот под действием щелочной протеиназы из *Bacillus licheniformis*, основным компонентом которой является субтилизин А (субтилизин Карлсберг). Фермент стабилен и активен при комнатной и более высоких температурах (период полуупактивации при 60°C — около 5 ч) и в широком интервале pH (6—12). Энантиоселективный гидролиз рацемата приводит к получению продукта с высоким выходом (*L*-фенилаланин — 48%, метиловый эфир *D*-фенилаланина — 42,5%) и энантиомерной чистотой (*L*-энантиомер — 90%, *D*-энантиомер — 100%). В работе [21] для разделения эфиров ряда аминокислот со свободной аминогруппой, а также N-ациламинокислот был использован субтилизин 8350, полученный при замещении шести аминокислот в белковой цепи субтилизина BPN' из *Bacillus amiloliquefaciens*. Полученный фермент оказался в 50 раз стабильнее исходного в воде и в 100 раз — в безводном диметилформамиде. При расщеплении рацемических эфиров достигалась практически 50%-ная конверсия; выходы продукта и непреагировавшего субстрата составили более 40%, энантиомерный избыток — более 91% (исходный фермент обладал низкой селективностью).

2. Амиды аминокислот

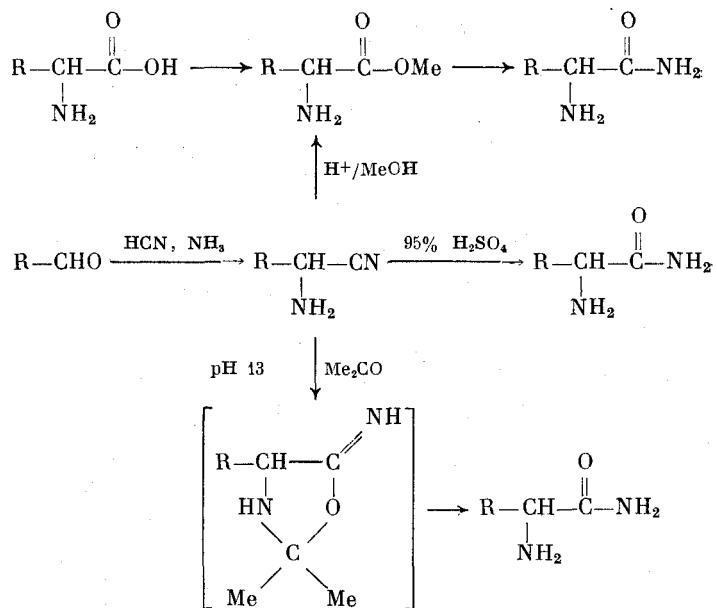
В общем случае энантиоселективный ферментативный гидролиз амидов АИ протекает по схеме:



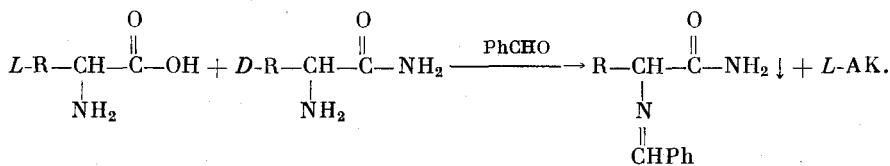
Ферменты, обладающие амидазной активностью, встречаются во многих микроорганизмах; для расщепления рацемата могут быть использованы как очищенные ферменты или их комплексы [22], так и целые клетки [23–25]. В работе [22] изучена возможность использования протеолитического комплекса проназы из *Streptomyces griseus*, содержащего сериновые протеазы и аминопептидазы, для разделения рацемических амидов лейцина, фенилаланина и триптофана на энантиомеры. Катализируемый проназой гидролиз амидов аминокислот характеризуется высокими значениями скорости, энантиоселективности и степени конверсии *L*-субстрата. Амид *DL*-лейцина может быть также разделен на антиподы с 50%-ным выходом и целыми клетками *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas sp.* и др. [23]. *L*-Аминопептидаза из *Pseudomonas putida* позволяет расщепить амиды Met и Phe на оптические антиподы [24]. Встречаются ферменты, обладающие энантиоселективным действием по отношению к *D*-субстратам [26–28]. Так, амид *DL*-валина можно разделить на антиподы, используя либо клетки *Pseudomonas rasea*, гидролизующие амиды *L*-аминокислот (выход *L*-валина 50%, 40°C, время – 5 ч) [25], либо клетки *Rhodococcus erythropolis*, гидролизующие амиды *D*-аминокислот (выход *D*-валина 38–47%, 40°C, время – 2 ч) [27]. *D*-Амидаза из штамма *Ochrobactrum anthropis*, выделенного из почвы, была частично очищена и охарактеризована [28]. Данные по субстратной специфичности приведены в табл. 7, также были определены скорости гидролиза по отношению к *L*-субстратам (за исключением норвалина и норлейцина), которые составили менее 0,1% от скорости гидролиза *D*-энантиомера.

Среди немногочисленных работ, посвященных ферментативному разделению амидов аминокислот работы [29–33] занимают особое место. Считая промышленное ферментативное разделение производных аминокислот перспективным и вполне конкурентоспособным по сравнению с асимметрическим синтезом и химическим разделением, авторы тщательно разработали все этапы получения оптически активных аминокислот из рацемических амидов, начиная с получения исходных продуктов. Известно, что амиды могут быть получены из аминокислот через соответствующие сложные эфиры. Более целесообразным, вероятно, является использование в качестве исходных веществ α -аминонитрилов – интермедиатов в синтезе аминокислот из альдегидов по реакции Штреккера. Превращение α -аминонитрилов в соответствующие амиды можно осуществлять различными путями. Перспективным представляется метод, предложенный авторами [29]: одностадийное превращение аминонитрила в амид через интермедиат – оксазолидин в щелочной среде в присутствии катализитических количеств ацетона (выходы продукта – не менее 90%).

Известно много микроорганизмов, производящих аминопептидазы (например, *Aspergillus* и др.), однако, их применение для разделения амидов аминокислот, по мнению авторов, ограничено невысокой активностью, узкой субстратной специфичностью, нежелательными побочными эффектами. Проведенный поиск показал, что ферментативный препарат аминопептидазы из *Pseudomonas putida* обладает наилучшими характеристиками. Высокая (почти 100%-ная) энантиоселективность сочетается с очень широкой субстратной специфичностью. Относительная активность колеблется от 20% (амид *L*-фенилаланина) до 100% (амид *D*-фенилглицина), концентрация субстрата может достигать 20%, не влияя на активность фермента. Большим достоинством является и то, что реакцию можно проводить в широком интервале рН. Для разделения *L*-аминокис-



лоты и амида *D*-аминокислоты используют такие традиционные методы, как ионообменная хроматография или экстракция. В тех случаях, когда есть потребность в *D*-аминокислоте, авторы предлагают использовать один из двух разработанных ими методов. Первый заключается в использовании биокатализаторов, не обладающих энантиоселективным действием. Такой биокатализатор был найден: фермент с амидазной активностью по отношению к *L*- и *D*-субстратам из клеточных препаратов *Rhodococcus erythropolis*. Выходы *D*-аминокислот, полученные этим методом, очень высоки по сравнению с обычным химическим гидролизом. Другой метод основан на образовании практически нерастворимых в воде (и, следовательно, легко выделяемых) оснований Шиффа из бензальдегида и амида *D*-аминокислоты:



Кислотный гидролиз полученного соединения при температуре ниже 100°С дает *D*-аминокислоту без рацемизации *D*- и *L*-аминокислоты, полученные таким путем, обладают высокой оптической чистотой (99% и выше).

В тех случаях, когда *D*-энантиомер не находит широкого применения, целесообразно *D*-субстрат подвергать рацемизации для дальнейшего вовлечения в процесс разделения. С этой целью разработан процесс рацемизации основания Шиффа — *N*-(не)замещенного бензилиденамида аминокислоты в водно-органической среде в присутствии основания [31]. Полученный рацемат основания Шиффа гидролизовали до амида *DL*-аминокислоты, который подвергали энантиоселективному гидролизу под действием фермента из *Pseudomonas putida*. Разработанный метод [29–32] позволил разделить рацематы фенилглицина, *n*-гидроксифенилглицина, валина, фенилаланина, триптофана, метионина, лизина, тиенилглицина и их производных. Для проявления активности фермента из *Pseudomonas* ри-

Таблица 7

Амидазная активность фермента из *Ochobacterium anthropis*

Субстрат — амид <i>D</i> -АК	V^* отн, %	Субстрат — амид <i>D</i> -АК	V^* отн, %	Субстрат — амид <i>D</i> -АК	V^* отн, %
Phe	100	Norleu	40	Phg	15
Tyr	97	Ala	33	Pro	9,7
Trp	96	Met	28	Lys	2,5
Leu	46	Norval	15	His	1,5

* V отн — скорость гидролиза.

tida необходимыми структурными элементами аминокислот являются незамещенная аминогруппа и α -водородный атом. Исходя из того что α -алкилированные аминокислоты также представляют значительный научный и коммерческий интерес, авторы [33] разработали новый биокатализатор из *Micobacterium neoagut*, обладающий амидазной активностью по отношению к α -алкилированным аминокислотам. Были разделены энантиомеры α -метилвалина, -лейцина, -фенилглицина, -фенилаланина, -4-метоксифенилаланина и α -этилфенилаланина с высокими выходами и энантиомерной чистотой (например, выход *L*- α -метиллейцина — 49,5%, амида *D*- α -метиллейцина — 48,7%).

3. Нитрилы аминокислот

Известно, что многие штаммы микроорганизмов, таких, как *Corynebacterium sp.*, *Nocordia rhodochrous*, *Pseudomonas sp.*, *Penicillium sp.*, *Escherichia coli* и ряд других способны катализировать гидролиз нитрилов до соответствующих амидов или кислот, причем вследствие разнообразия микроорганизмов спектр субстратов весьма широк: это алифатические и ароматические нитрилы, α -гидрокси- и α -аминонитрилы [34, 35].

В работе [36] исследованы многие штаммы и среди них — *Brevibacterium sp. R312*, который гидролизует практически все водорастворимые нитрилы до соответствующих кислот, но реакции протекают не энантиоселективно. Была осуществлена селекция штамма *R312* в среде, содержащей фторацетамид, токсичный для него, так как под действием неспецифической амидазы происходит гидролиз до фторуксусной кислоты. Скрининг позволил отобрать ряд мутантов, не осуществляющих эту реакцию, один из них *A₄* был отобран для дальнейших исследований. Спектр нитрилазной активности *A₄* и *R312* оказался абсолютно идентичен, что подтвердило предположение авторов о том, что ферментативная система, осуществляющая гидролиз нитрилов, включает в себя два фермента — нитрилазу и амидазу. Исследование амидазной активности целых клеток и клеточных экстрактов показало, что *R312* гидролизует практически все исследованные амиды за исключением акриламида, метакриламида, *L*- и *D*-аспартамина и *D*-глутамина, причем последний гидролизуется клеточным экстрактом. Амидазная активность *A₄* существенно уже: он гидролизует только формамид, мочевину, никотинамид, *L*-глутамин и амиды α -аминокислот, причем при гидролизе амидов *DL*-АК выход не превышает 50%, а продуктами гидролиза являются *L*-аминокислоты.

Дополнительные исследования подтвердили энантиоселективность действия фермента: *D*-аминопропионамид не является субстратом, а *L*-энантиомер количественно превращается в *L*-аланин. Использование штамма *A₄* позволило разделить рацемат α -амино- γ -метилтиобутиронитрила количественно в течение 2–3 ч. Продукты гидролиза — *L*-метионин и амид *D*-метионина, который можно подвергнуть рацемизации или гидролизовать

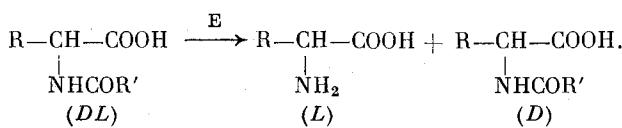
до *D*-аминокислоты под действием штамма *R312*. Аналогичные процессы позволили получить *L*-аланин, *L*- α -аминомасляную кислоту, *L*-фенилаланин, *L*-валин и *L*-лейцин.

В процессе расщепления рацемических аминонитрилов под действием штамма *Pseudomonas MY-1* [37], видимо, также принимают участие два фермента: *DL*-аминонитрилаза и энантиоселективная амидаза; разделение энантиомеров нитрила *DL*-фенилглицина до *L*-аминокислоты и амида *D*-аминокислоты проходит количественно за 0,5 ч при 15°С. Оптически активный *L*-Phe можно получить из всей массы рацемического производного в результате сопряженного процесса, в котором происходит гидролиз *DL*-аминонитрила до амида *DL*-аминокислоты под действием клеток *Acinetobacter calcoaceticus* с последующим гидролизом амида *L*-аминокислоты и рацемизацией амида *D*-фенилаланина под действием клеток *Arthrobacter ATCC 31652* [38].

Однако есть данные, что участие в процессе гидролиза энантиоселективной амидазы – не единственный путь расщепления рацемических нитрилов. В работе [39] показано, что оптически активные аминокислоты или их амиды (например, амид *L*-лейцина) можно получить из рацемических нитрилов энантиоселективным действием нитрилазы (штамм 311).

4. Ациламинокислоты

Энантиоселективный гидролиз *N*-ациламинокислоты под действием ацилаз – самый распространенный метод крупномасштабного разделения энантиомеров аминокислот.



Промышленная разработка этого метода, включающая и процесс рацемизации *D*-энантиомера для дальнейшего вовлечения в процессе разделения, была осуществлена в 50–60-е годы на фирме Tanabe Seiyaku Co., Ltd.

В конце 60-х гг. был создан ферментативный реактор, содержащий иммобилизованную ионным связыванием с ДЕАЕ-сепадексом ацилазу для непрерывного получения аминокислот – это было первое промышленное применение иммобилизованного фермента. С 1969 г. разработано несколько типов ферментативных реакторов для получения *L*-метионина, *L*-валина, *L*-фенилаланина и других аминокислот из их рацемических *N*-ацил-производных [40, 41].

Ферменты, обладающие ацилазной активностью выделяют из животных, растительных и микробных источников. Из ацилаз животного происхождения наиболее изучен фермент из почек свиньи – ацилаза I, специфичный по отношению к алифатическим аминокислотам.

Работа [42] посвящена исследованию ацилаз животных, принадлежащих к четырем классам: рыб (карп серебристый), земноводных (лягушка), птиц (голубь) и млекопитающих (мышь, крыса, кошка, собака, корова, свинья), а также ацилазы человека. Источником фермента служил свежеприготовленный гомогенат почек. В качестве субстратов использовали *N*-ацетильные производные *DL*-аминокислот (норвалина, норлейцина, валина, лейцина, глутаминовой кислоты, фенилаланина и триптофана), а также *N*-хлорацетил-*DL*-фенилаланин и *N*-формил-*DL*-метионин. У большинства животных характер субстратной специфичности оказался схожим. Максимальная скорость проявлялась в гидролизе *N*-формилметионина. Так как удельная активность ферментов различалась более чем в 16 раз (от 4,2 у лягушки до 65,5 мкмоль·мин⁻¹·мг белка⁻¹ у коровы), то

оценку субстратной специфичности проводили в относительных единицах (для N-формилметионина $V_{\max} = 100\%$). Скорость гидролиза неприродной аминокислоты N-ацетилнорлейцина составила 30–49%. Сравнение скоростей гидролиза ациламинокислот с разветвленными и неразветвленными радикалами (лейцин, валин и норлейцин, норвалин) показывает, что последние являются более подходящими субстратами (различие в скорости составляет 1,2–4,0 раза). N-ацетильные производные ароматических и дикарбоновых аминокислот — плохие субстраты ($0,5\% \leq V_{\text{отн}} \leq 10\%$). Как и следовало ожидать, замена ацетильной группы на хлорацетильную приводит к возрастанию скорости в 2–3 раза. Несколько отличается субстратная специфичность ацилазы свиньи (АС) и человека (АЧ): максимальная скорость гидролиза наблюдалась в случае N-ацетилнорлейцина ($V_{\text{отн}} = 208\%$ — АС, 124% — АЧ); на втором месте — N-ацетилнорвалин (181% — АС, 110% — АЧ); N-формилметионин — на третьем месте (100%). В случае остальных субстратов проявляется сходство с другими ацилазами. Полученные данные хорошо согласуются с предложенной ранее структурой активного центра в виде узкой гидрофобной щели длиной 5 метиленовых звеньев [43], а также позволяют предположить, что первоначальная и основная роль фермента заключалась в гидролизе N-формилметионина.

Ферменты, обладающие ацилазной активностью, встречаются во многих микроорганизмах [2], они дешевы, доступны в больших количествах и находят широкое применение для расщепления рацематов ациламинокислот [44–53]. Вплоть до настоящего времени ведутся разработки по применению свободных ферментов или микробных клеток [44–47], однако преимущества использования иммобилизованного фермента были бесспорно доказаны еще в конце 60-х гг. (эффективность использования в течение 3 мес. иммобилизованного фермента более чем в 10 раз выше, чем свободного) [54]. Различные методы иммобилизации аминоацилаз рассмотрены в работе [55]. Субстратная специфичность микробных ацилаз существенно шире, чем ацилазы I; субстратами являются не только алифатические аминокислоты, но и различные производные ароматических и дикарбоновых аминокислот [2]. Исследование специфичности по отношению к ацильной группе фенилаланина для грибной ацилазы (хорошими субстратами которой являются ароматические аминокислоты) и ацилазы I было проведено в работе [56]. Относительная скорость гидролиза изучалась в pH-оптимуме, определенном для каждой ацильной группы в случае грибной ацилазы (pH 6–7,5) и при pH 7 — в случае ацилазы I. Скорость гидролиза падала в ряду формил > хлорацетил > ацетил > пропаноил > бутаноил > пентаноил > гексаноил > этилоксикарбонил > бензилоксикарбонил (Z); трет-бутилоксикарбонил (Boc) ≈ 0 — при катализе грибной ацилазой и в ряду бутаноил > хлорацетил > пропаноил > пентаноил > ацетил > гексаноил > формил > этилоксикарбонил > бензилоксикарбонил; трет-бутилоксикарбонил ≈ 0 — при катализе ацилазой I. Производные уретанового типа значительно менее реакционноспособны, чем обычные ацильные производные, ни трет-бутилоксикарбонил, ни бензилоксикарбонил производные практически не подвергались гидролизу. Корреляция между длиной цепи углеводородного фрагмента ацильной группы ($\text{H}-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{O})$, $n=0 \div 5$) и относительной скоростью гидролиза приведена на рис. 1. Для подтверждения пригодности формильной группы для практического разделения был осуществлен гидролиз N^α-формил-N⁶-трет-бутилоксикарбонил-DL-орнитина ацилазой (выход L-аминокислоты — 48,5%, D-производного аминокислоты — 44%).

В работах [57, 58] исследована кинетика энантиоселективного гидролиза N-ацетил-DL-аминокислот (метионина, лейцина, аланина, валина, серина, триптофана, фенилаланина и фенилглицина) под действием свободной и иммобилизованной на DEAE-Filtradex R50 ацилазы из *Aspergillus oryzae*.

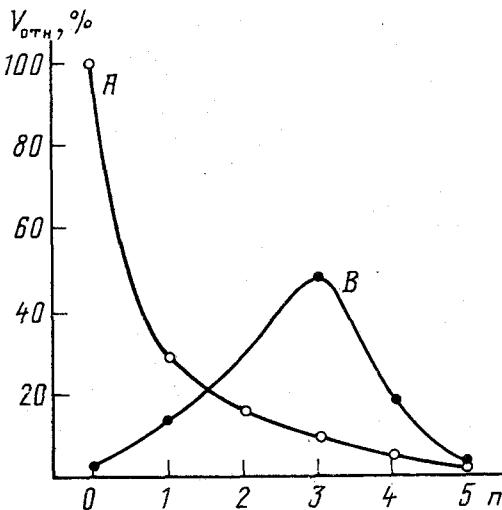


Рис. 1. Зависимость относительной скорости гидролиза N-ацилфенилаланина под действием грибной ацилазы (A) и ацилазы I (B) от числа метиленовых звеньев n ацильной группы

С целью более широкого применения ацилаз для получения оптически активных аминокислот проводился поиск новых ферментов, обладающих ацилазной активностью [59, 60], а также выявление такой активности у ферментов других классов [61, 62]. Так была обнаружена ацилаза из *Cotatopos testosteroni*, специфичная по отношению к ацил-*L*-пролину [59]: высокая энантиоселективность позволяет расщеплять N-ацетил-*D,L*-пролин на энантиомеры; замена ацетильной группы на хлорацетильную ускоряет гидролиз N-производного-*L*-пролина в 3,6 раза; реакция не идет в случае бензилоксикарбонил- и *трет*-бутилоксикарбонил производных, активность по отношению к производным других аминокислот на один — два порядка меньше, чем к N-ацетил-*L*-пролину. В работе [60] исследована ацилаза из *Bacillus thermoglucosidius*: фермент специфичен по отношению к алифатическим аминокислотам ($V_{отн}=100\%$ для N-Ac-*L*-метионина), скорость гидролиза ароматических аминокислот примерно на порядок ниже.

Большинство N-ацетильных производных кислых и основных *L*-аминокислот, а также исследованных N-Ac-*D*-аминокислот (метионина, лейцина, валина) инертны к действию фермента ($V_{отн}<1\%$). Замена ацетильной группы на хлорацетильную приводит к увеличению скорости $V_{отн}$ примерно в 10 раз; бензилоксикарбонил- и *трет*-бутилоксикарбонил производные инертны. Исследованный фермент имеет много общего с ацилазой I и ацилазой из *Asp. oryzae*; все они содержат Zn^{2+} , активируются ионами Co^{2+} , pH-оптимум действия — 8,0—8,5, имеют похожий аминокислотный состав. Однако молекулярная активность ацилазы из *Bacillus thermoglucosidius* примерно на два порядка выше по отношению к N-хлорацетильным производным *D,L*-аланина и *D,L*-норлейцина. Кроме того фермент отличается высокой стабильностью в экстремальных условиях: при нагревании до 70°С в течение 10 мин он полностью сохраняет активность, до 80°С — сохраняет 90% активности; устойчив к органическим растворителям (этанол — до 50%; изопропанол — до 30%), сохраняет 80% активности в присутствии 5% додецилсульфата натрия и 85% активности в 8 М мочевине при 37°С в течение 30 мин. Эти особенности ацилазы из *B. thermoglucosidius* позволяют предположить перспективность ее использования для получения оптически активных аминокислот.

Эти же авторы обнаружили ацилазную активность по отношению к ациламинокислотам у очищенной дипептидазы из *B. stearothermophilus*, которая составила 3–30% от ее активности в гидролизе дипептидов [61]. Однако этот фермент проявлял более высокую специфичность к производным ароматическим аминокислот ($V_{\text{отн}}=100\%$ – для *N*-ацетил-*L*-метионина, 110% – для *N*-ацетил-*L*-тирофена, 160% – для *N*-ацетил-*L*-фенилаланина). Как и в предыдущем случае замена ацетильной группы на хлор-ацетильную приводит к увеличению $V_{\text{отн}}$ не менее чем в 10 раз. В работе [62] выявлена способность полимиксин-ацилазы гидролизовать и *N*-ацил-производные аминокислот, хотя и с невысокой энантиоселективностью. Из всех исследованных ацильных групп, содержащих от 2 до 16 атомов углерода, легче всего подвергались гидролизу каприноильные (C_{10}) производные; следует также отметить, что при получении фермента при определенных условиях он способен (хотя и с невысокой скоростью) снимать защитную *Z*-группу.

В последние годы *D*-аминокислоты находят все более широкое применение. В этой связи особый интерес представляют сообщения о наличии *D*-ацилазной активности в клетках некоторых микроорганизмов. Ранее было известно о *D*-аминоацилазах микроорганизмов вида *Pseudomonas* [63, 64] и *Streptomyces* [65, 66]. Недостатком этих ферментов была невысокая энантиоселективность, что ограничивало их использование для производства *D*-аминокислот. Авторами работы [67] было проведено исследование 800 штаммов микроорганизмов, выделенных из почвы и найден источник *D*-аминоацилазы, обладающей высокой активностью и энантиоселективностью по отношению к *N*-ацил-*D*-аминокислотам – штамм *Alcaligenes denitrificans DA 181*. Фермент, выращенный в оптимальных условиях, обладает активностью 250 мкмоль·ч⁻¹·мл⁻¹ (*D*-ацилаза из *Pseudomonas* sp. – 10 мкмоль·ч⁻¹·мл⁻¹ [64], из *Streptomyces olivaceus* – 84 мкмоль·ч⁻¹·мл⁻¹ [65]). Максимальная удельная активность проявлялась в гидролизе *N*-ацетил-*D*-метионина – 108 600 мкмоль·ч⁻¹·мг⁻¹ (*Pseudomonas* sp. – 6,8 мкмоль·ч⁻¹·мг⁻¹, *Str. olivaceus* – 571 мкмоль·ч⁻¹·мг⁻¹). Фермент катализирует гидролиз *L*-субстратов в незначительной степени (табл. 8).

Использование аминоацилаз для разделения энантиомеров дает возможность получать редко встречающиеся и неприродные оптически активные аминокислоты. Рацемические ацильные производные таких аминокислот, а также α -метиламинокислот были разделены на энантиомеры под действием ацилазы I и ацилазы из *Aspergillus* sp. в препаративных количествах (табл. 9) [68].

Приводимые в табл. 9 значения энантиомерной чистоты характеризуют значительную энантиоселективность действия фермента (выделенные аминокислоты не подвергались перекристаллизации). В случае *N*-ацил- α -метил-АК, активность по отношению к которым была низкой ($V_{\text{отн}}<1\%$; для *N*-ацетилметионина – $V_{\text{отн}}=100\%$), проводили гидролиз под действием ацилазы I, включенной в мембрану, что дало возможность многократно применять большие количества белка в малых реакционных объемах; использование ацилазы из *Asp. oryzae* было нецелесообразно, так как ее удельная активность на два порядка меньше, чем ацилазы I.

5. Карбаматы аминокислот

Структура многих пестицидов содержит карбаматные группы – $\text{NH}(\text{CO})\text{OMe}$. Ранее было показано, что в почве под действием микроорганизмов происходит разложение *N*-фенилкарбаматов [69].

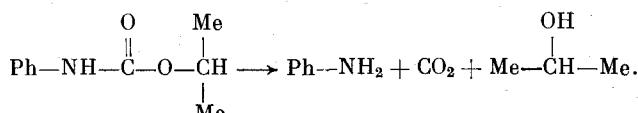


Таблица 8

Относительная скорость гидролиза *D*- и *L*-субстратов под действием аминоацилазы из *A. dentrificans*

Субстрат	V _{отн.} , %		Субстрат	V _{отн.} , %	
	<i>D</i> -энантиомер	<i>L</i> -энантиомер		<i>D</i> -энантиомер	<i>L</i> -энантиомер
N-Ac-Met	100	0,1	N-Ac-Trp	33	0,6
N-Ac-Phe	81	0,3	N-Ac-Asp	47	0,0
N-ClAc-Val	66	0,0	N-Ac-alolIleu	12	см. *
N-Ac-Leu	60	0,4	N-Ac-Val	6	0,0
N-Ac-Ala	25	0,8	N-Ac-Phg	5	см. *

* Не определяли.

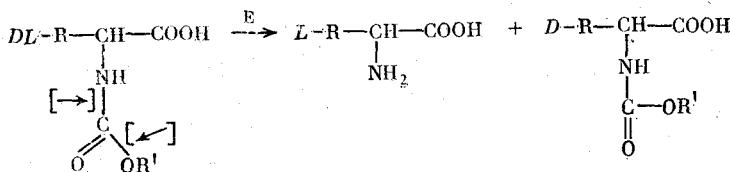
Таблица 9

Расщепление рацематов ациламинокислот под действием аминоацилаз

R	Ациль-ная группа	Фер-мент *	Co ²⁺	Выход, %		Энантиомерная чистота, %	
				<i>L</i>	<i>D</i>	<i>L</i>	<i>D</i>
Et	Ac	AI	—	40	32	>99,5	>99,5
Et	ClAc	AI	—	40	41	>99,5	>99,5
Pr	Ac	AA	+	33	32	>99,5	>99,5
CH ₂ =CHCH ₂ —	ClAc	AI	—	41	33	>99,5	>99,5
транс-Me—CH=CH—CH ₂	Ac	AA	+	33	38	99	93
цис-Me—CH=CH—CH ₂	Ac	AI	—	44	47	>99,5	>99,5
>—CH	ClAc	AI	+	37	42	99	84
▷—CH ₂	Ac	AA	+	50	50	95	98
—CH ₂ —	Ac	AA	+	45	41	99	см. **
—S—CH ₂ ***	ClAc	AI	+	51	31	93	см. **
—CH ₂ —	ClAc	AI	+	43	46	91	80
OH——CH ₂ ***	ClAc	AI	+	30	63	97	48

* AI — ацилаза I; AA — ацилаза из *Aspergillus* sp.; ** Свободную аминокислоту не выделяли; *** N-ацильные производные α-метил-АК.

С разработкой эффективного метода химического синтеза карбаматов аминокислот [70] появилась возможность получения оптически активных аминокислот ферментативным расщеплением этих производных. С этой целью Кула с соавт. попробовали осуществить гидролиз карбаматов ряда аминокислот эстеразой из печени свиньи, гидантоиназой из *Pseudomonas fluorescens* DSM 84, уреазой из черных бобов, ацилазой из почек свиньи и ацетилхолинэстеразой из эритроцитов свиньи и человека [71, 72]. Энантиоселективный ферментативный гидролиз карбаматов аминокислот проекает по следующей схеме:



Энантиоселективное снятие N-алоксикарбонильной группы наблюдалось только в случае ацилазы и ацетилхолинэстеразы, причем из трех исследованных N-замещенных *DL*-аминокислот — аллоксикарбонильных производных аланина, валина и N,N'- α , ϵ -дизамещенного *DL*-лизина — ацилаза гидролизовала карбаматы аланина и валина как с метокси-, так и с этоксикарбонильными (ЕОС) заместителями; в случае аллоксикарбонильного производного лизина происходил полный гидролиз, но только с метоксикарбонильной (МОС) группой. Ацетилхолинэстераза осуществляла расщепление N-(МОС)-производных всех трех аминокислот, причем в случае лизина гидролиз проходил региоселективно по α -заместителю; N-(ЕОС)-производные гидролизу не подвергались. рН-Оптимум действия ацетилхолинэстеразы 7,5–8, ацилазы — 7,5; константа Михаэлиса (K_m) при гидролизе N-(МОС)-*DL*-Ala составляет 68 мМ в случае ацетилхолинэстеразы и 8,2 мМ — в случае ацилазы. Активность каждого из ферментов при гидролизе производных валина и аланина примерно одинакова, при гидролизе α , ϵ -ди-(МОС)-*DL*-Lys она на порядок меньше. Активность ацетилхолинэстеразы в 15–20 раз меньше, чем активность ацилазы, причем величина последней при гидролизе N-(МОС)-*DL*-Val(Ala) составляет менее 1% активности ацилазы при гидролизе N-ацетилметионина (значения K_m имеют один порядок) (табл. 10).

Обсуждая механизм реакции ферментативного гидролиза карбаматов аминокислот, авторы предлагают два возможных пути протекания реакции [72]. Первый — с разрывом эфирной связи карбамата; при этом продуктами реакции являются спирт и замещенная карбаминовая кислота. Производные карбаминовой кислоты нестабильны, и полученный интермедиат спонтанно разлагается на аминокислоту и диоксид углерода. Ферментативная атака карбонильного атома с разрывом по амидной связи — более вероятный путь. Продуктами этой реакции являются аминокислота и моноэфир угольной кислоты, который разлагается на спирт и CO₂. В любом случае образуются два летучих продукта, которые могут быть легко удалены из сферы реакции. Это позволяет проводить реакцию до конца и упростить выделение аминокислоты.

Однако невысокие значения карбаматазной активности ацилазы и ацетилхолинэстеразы исключают возможность использования этих ферментов для масштабного разделения рацематов аминокислот. В этой ситуации есть два выхода: поиск новых источников ферментов, обладающих высокой активностью, и селекция мутантных штаммов. Кула и Самбале избрали первый путь [73, 74]. Они исследовали 42 штамма микроорганизмов, выделенных из почв, ранее подвергавшихся обработке пестицидами, содержащими карбаматные структуры, а также 36 штаммов из германской коллекции микроорганизмов (из *Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Arthrobacter globiformis*, *Bacillus coagulans*, *Corynebacterium sepedonicum*, *Enterobacter cloacae*, *Mucobacterium spegmatis*, *Pseudomonas fluorescens* *Pseudomonas putida*). Из германской коллекции семь штаммов проявили невысокую активность по отношению к производному аланина и четыре — к производному лизина. Наибольшей активностью обладал штамм из *Pseudomonas fluorescens* DSM 50124 — 2,3 нмоль/мин·мг (N-(МОС)-Ala) и 1,6 нмоль/мин·мг (N-(МОС)-Val).

Таблица 10

Гидролиз карбаматов аминокислот ацилазой почки свиньи
(температура — 37° С)

Карбамат <i>DL</i> -AK	α , МКМОЛЬ· МИН ⁻¹ ·МГ ⁻¹	K_M , мМ	Время, ч	Обнаружено <i>L</i> -AK, %	
				А	Б
N-MOC-Ala	0,63	8,2	78	47,5	43,0
N-EOC-Ala	0,56	8,2	70	45,5	44,0
N-MOC-Val	0,45	9,1	70	45,5	44,5
N-EOC-Val	0,40	9,1	76	42,5	34,5

Примечание. α — удельная активность; А — до хроматографического разделения; Б — после хроматографического разделения.

Штаммы микроорганизмов, выделенных из почв, культивировали на средах, обогащенных одним из субстратов — N-(MOC)-Ala N-(MOC)-Val или N,N'- α , ε -ди-(MOC)-Lys, а затем определяли наличие карбаматазной активности. Оказалось, что такой активностью обладает значительно меньшее количество штаммов, культивированных в средах, обогащенных производным валина, чем в случае производных аланина и лизина. Это может быть связано с бактериостатическими свойствами валина [75]. Большинство штаммов, обладающих карбаматазной активностью, осуществляют гидролиз всех трех субстратов, причем активность по отношению к производному лизина была наименьшей. Интересно отметить, что штаммы, культивированные на средах, обогащенных N-(MOC)-*DL*-Ala, обладали большей активностью по отношению к производным валина и лизина, чем культивированные на средах, обогащенных N-(MOC)-*DL*-Val или N,N'- α , ε -ди-(MOC)-*DL*-Lys. Шесть образцов было выделено для дальнейших исследований (табл. 11). *D*-энантиомеры исследованных субстратов устойчивы к ферментативному действию, гидролиз рацемических субстратов приводит к продукту, содержащему примесь *D*-изомера только в случае аланина, но это, видимо, связано с наличием аланинрациемазы.

В большинстве случаев гидролиз N,N'- α , ε -ди-(MOC)-Lys приводил к N- ε -(MOC)-Lys; N- α -(MOC)-Lys в продуктах реакции не был обнаружен. Четыре штамма давали незамещенный лизин, два других — смесь лизина и N- ε -(MOC)-Lys.

В ходе дальнейших исследований был найден штамм, обладающий *DL*-карбаматазной активностью (121 нмоль/мин·мг — в случае произвольного аланина; 170 нмоль/мин·мг — валина и 6,0 нмоль/мин·мг — лизина) [74]. В результате очистки было выделено два фермента — *L*-карбаматаза (мол. масса — 160 000) и *D*-карбаматаза (мол. масса — 90 000). Исследована их субстратная специфичность по отношению к боковой цепи аминокислот и спиртовой компоненте карбаматной группы (табл. 12). *L*-Карбаматаза проявляет наибольшую активность по отношению к N-(MOC)-*L*-Phe, в то время как для *D*-карбаматазы лучшим субстратом оказался N-(MOC)-*D*-Ala. Увеличение числа углеродных атомов в спиртовой компоненте карбаматной группы вызывает изменения активности, весьма существенные в случае *L*-карбаматазы и незначительные — в случае *D*-карбаматазы.

Стереоселективный гидролиз N,N'- α , ε -ди-(MOC)-*DL*-Lys проходит только по α -аминогруппе. Такой региоселективный фермент мог бы играть важную роль в пептидном синтезе для снятия N- α -защитной группы.

В заключение следует отметить, что удельная активность штаммов, найденных при первичной селекции недостаточна для разработки ферментативного процесса, однако тот факт, что многие микроорганизмы, принадлежащие к различным видам, обладают карбаматазной активностью, по-

Таблица 11

Гидролиз N-метоксикарбонил-*DL*-аминокислот различными штаммами микроорганизмов, выделенных из почв

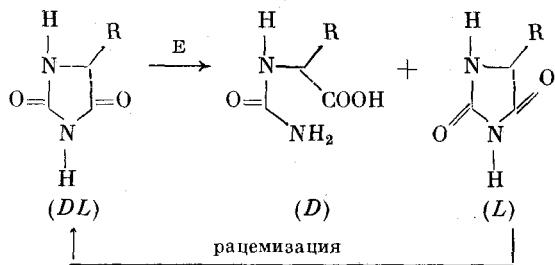
Штамм	α, нмоль/мин·мг			Гидролиз N-(MOC)- <i>DL</i> -Val				Выход, %
	N-MOC- <i>DL</i> -Ala	N-MOC- <i>DL</i> -Val	N,N'-α,β- <i>DL</i> -Lys	[бетокс], мг/мл	[субстрат], мМ	Время, ч	[продукт], мМ	
A3 <i>Xanthomonas maltophilia</i>	166	126	96	0,2	180	65,5	18,5	10,6
A4 <i>Methylobacterium extorquens</i>	318	81	45	1,2	180	65,0	29,5	16,9
L8 (не опр.)	19,5	4,1	8,9	1,5	180	63,5	9,2	5,4
L10 <i>Pseudomonas putida</i>	59,0	8,8	0,0	0,5	180	67,0	46,0	26,3
L12 (не опр.)	8,3	6,1	0,0	4,0	180	64,0	74,7	42,7
L18 <i>Alcaligenes</i> sp.	20,9	51,8	0,0	1,4	350	64,5	162,5	46,5

зволяет надеяться на то, что дальнейший поиск и исследования приведут к получению ферментов, пригодных для промышленного расщепления карбаматов аминокислот.

6. Циклические производные аминокислот

а) 5-монозамещенные гидантоины

Ферменты, обладающие гидантоиназной активностью, встречаются в целом ряде микроорганизмов — *Hansenula* sp. [76], *Pseudomonas* [77–79], *Agrobacterium* [80], *Arthrobacter* [81, 82], *Corynebacterium* [83], *Bacillus* [84] и др. Они катализируют реакцию раскрытия гидантоинов в N-карбамоил- α -аминокислоты.



Гидантоины являются промежуточными соединениями в синтезе α -аминокислот из альдегидов, KCN и мочевины или карбоната аммония [85]. По сравнению с другими производными аминокислот они имеют важное преимущество: спонтанно рацемизируются в условиях ферментативной реакции, что дает возможность переводить практически 100% рацемата в один из энантиомеров.

Снятие N-карбамоильной группы возможно химическим путем: под действием эквимолярного количества нитрита натрия в кислой среде; при этом наблюдается полное сохранение конфигурации, степень конверсии близка к 100% [86].

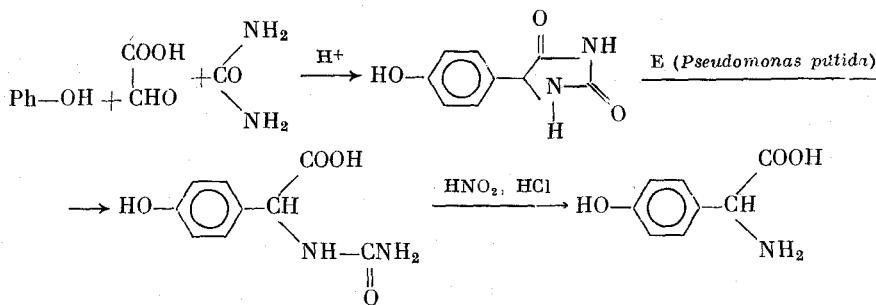
Этот метод позволил создать один из наиболее экономичных процессов крупномасштабного производства такой аминокислоты как *D*-*n*-гидроксифенилглицин, используемой при получении полусинтетического пенициллина — амоксициллина и цефароспоринов — цефадроксила и цефатризина [86]. Разработка процесса включала в себя и создание простого и эконо-

Таблица 12

Удельная активность очищенных ферментов

Карбамат <i>DL</i> -аминокислоты	Активность <i>L</i> -карбаматазы, мкмоль/мин·мг	Активность <i>D</i> -карбаматазы, мкмоль/мин·мг
N-(MOC)- <i>DL</i> -Val	12,1	4,5
N-(EOC)- <i>DL</i> -Val	1,1	2,1
N-(MOC)- <i>DL</i> -Ala	25,6	51,3
N-(EOC)- <i>DL</i> -Ala	8,9	26,7
N-(MOC)- <i>DL</i> -Phe	42,6	0,1
N-(MOC)- <i>DL</i> -Leu	3,3	1,0
N,N'- α , ε -ди-(MOC)- <i>DL</i> -Lys	1,0	0,5

мичного метода химического синтеза субстрата *DL*-5-(*n*-гидроксифенил)гидантоина из фенола, глиоксиловой кислоты и мочевины в кислой среде.



Аналогичным образом разработано производство *D*-фенилглицина и *D*-валина, которые используются для синтеза антибиотиков и пестицидов.

Катализическое превращение *DL*-5-(*n*-гидроксифенил)гидантоина происходит и под действием клеток *Pseudomonas* sp. *AJ-11220*, однако в этом случае продуктом является не *N*-карбамоил-*D*-аминокислота, а *D*-*n*-гидроксифенилглицин [87, 88]. Аналогичные процессы гидролиза изучены и в работах [89, 90].

Йокозеки с соавт. исследовали штамм *AJ-11220*, оптимизировали условия выращивания клеток и проведения ферментативного гидролиза (рН-оптимум действия 0,8; оптимальная $t=43^\circ\text{C}$), определили субстратную специфичность фермента (табл. 13) [87].

Все продукты за исключением глицина и аланина имеют *D*-конфигурацию. В случае аланина получение рацемического продукта авторы связывают с присутствием в клетках аланин-рацемазы, что было подтверждено дальнейшими экспериментами.

В работе [87] впервые продемонстрирована возможность получения *D*-лизина из его гидантоинового предшественника. Следует также отметить, что под действием клеток *AJ-11220* дигидроурацил гидролизовался в очень незначительной степени, в то время как являлся лучшим субстратом для фермента из *Pseudomonas putida* [86]. Все эти данные позволили предположить, что в катализическом процессе участвует фермент с иной субстратной специфичностью. Для его исследования была проведена частичная очистка и определена специфичность выделенных фракций [88]. Клетки *Pseudomonas* sp. *AJ-11220*, сuspendedированные в буфере 0,02 М *tris*-HCl (рН 7,5), содержащем либо 10 мМ CoCl_2 и CaCl_2 (вариант I), либо 10 мМ дитиотреитола (вариант II), подвергали действию ультразвукового осциллятора с последующим фракционированием на колонке с DEAE-Toyopearl 650 M, предварительно уравновешенной соответствующим буфером. Выделение по первому варианту приводило к тому, что дости-

Таблица 13

Субстратная специфичность фермента из *Pseudomonas* sp. AJ-11220

Продукт гидролиза	<i>V</i> отн. %	Продукт гидролиза	<i>V</i> отн. %
<i>D</i> -цианоэтилглицин	100	<i>D</i> -His	33
<i>D</i> -Met	80	<i>D</i> -Trp	21
Gly	80	<i>D</i> -Ile	19
<i>D</i> -Gln	72	<i>D</i> -Lys	18
<i>D</i> -Phe	62	<i>D</i> -Val	15
<i>D</i> - <i>n</i> -гидрокси-Phe	61	<i>D</i> -Glu	12
<i>DL</i> -Ala	58	<i>D</i> -3,4-метилендиокси-Phe	11
<i>D</i> -Phe	41		

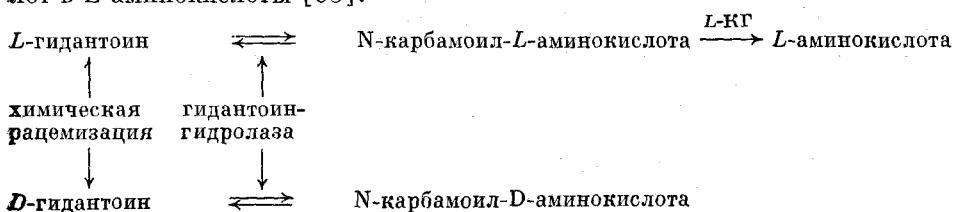
таялась 27-кратная очистка фермента — *D*-гидантоин-гидролазы (*D*-ГГ) с общим выходом активности в 63% (табл. 14). *L*-Гидантоин-гидролаза обнаружена не была. Гидролаза *N*-карбамоил-АК (КГ), найденная в неочищенном экстракте, после фракционирования на ДЕАЕ-Тоупорл обнаружена не была. Результаты очистки *D*- и *L*-гидролаз *N*-карбамоил-АК приведены в табл. 15.

Очистка по варианту II привела к тому, что *D*-гидантоиназная активность, найденная в неочищенном экстракте, после фракционирования на ДЕАЕ-Тоупорл обнаружена не была. Результаты очистки *D*- и *L*-гидролаз *N*-карбамоил-АК приведены в табл. 15.

Полученные данные позволили сделать вывод о механизме асимметрического гидролиза *DL*-гидантоинов аминокислот под действием *Pseudomonas* sp. AJ-11220: только *D*-изомеры гидантоинов превращаются в соответствующие *N*-карбамоил-*D*-аминокислоты под действием *D*-ГГ (рН-оптимум 8,0; оптимум $t=55^{\circ}\text{C}$); *N*-карбамоил-*D*-аминокислоты гидролизуются до *D*-аминокислот под действием *D*-КГ (рН-оптимум 7,0; оптимум $t=50^{\circ}\text{C}$); *L*-гидантоины аминокислот спонтанно рацемизуются, и полученные *D*-изомеры вовлекаются в процесс гидролиза. При использовании препаратов *D*-ГГ и *D*-КГ, полученных ДЕАЕ-Тоупорл — фракционированием, в процессе гидролиза *DL*-5-(*n*-гидроксифенил)гидантоина (рН 8,0) продукт — *D*-(*n*-гидрокси)фенилглицин был получен количественно. Также определена субстратная специфичность трех частично очищенных ферментов (табл. 16).

Аналогичным образом исследован штамм *Flavobacterium* sp.-3912, под действием которого *DL*-5-индолилметилгидантоин с довольно высоким выходом гидролизуется до *L*-триптофана, а также мутантный штамм AJ-3940, у которого блокированы пути распада триптофана (выход *L*-триптофана — почти 100%) [91—93]; рН-оптимум действия штамма AJ-3940 — 8,5; оптимальная t — около 50°C ; данные по субстратной специфичности приведены в табл. 17.

В ходе очистки фермента из штамма AJ-3912 на всех стадиях была обнаружена активность гидантоингидролазы по отношению как к *L*-, так и к *D*-субстратам (соотношение удельных активностей *L*/*D* — 2,6÷2,7). Активность гидролазы *N*-карбамоил-АК также была обнаружена на всех этапах очистки, но только по отношению к *L*-субстратам. Так как в штамме не была обнаружена рацемаза *N*-карбамоил-АК, то был предложен следующий механизм ферментативного превращения гидантоинов *DL*-аминокислот в *L*-аминокислоты [93]:



Частичная очистка *D*-гидантоин-гидролазы

Таблица 14

Фракция	Общее количество белка, мг	Образование			
		<i>D</i> -энантиомера		<i>L</i> -энантиомера	
		А *, нмоль/мин	α , нмоль/ мин·мг	А *, нмоль/мин	α , нмоль/ мин·мг
Неочищенный экстракт ДЭАЕ-Toyopearl	540 13	36 000 22 620	67 1795	0 0	0 0

* А — общая активность.

Частичная очистка гидролаз N-карбамоил-*L*- и *D*-аминокислот

Таблица 15

Фракция	Общее количество белка, мг	Образование			
		<i>D</i> -энантиомера		<i>L</i> -энантиомера	
		А, нмоль/мин	α , нмоль/ мин·мг	А, нмоль/мин	α , нмоль/ мин·мг
Неочищенный экстракт ДЭАЕ-Toyopearl	475 10	7200 2600	15 261	2290 0	5 0

Таблица 16

Субстратная специфичность ферментов (*D*-гидантоин-гидролазы и гидролаз N-карбамоил-*D*- и *L*-аминокислот)

Субстрат — гидантоиновое производное АК	$V_{\text{отн.}} \%$ (<i>D</i> -ГГ)	Субстрат — N-карбамоил- <i>D</i> - или <i>L</i> -АК	$V_{\text{отн.}} \%$	
			<i>D</i> -КГ	<i>L</i> -КГ
<i>D</i> -Met	100	Met	100	47
<i>DL</i> -Met	54	Phg	94	—
<i>L</i> -Met	30	<i>n</i> -гидрокси-Phg	88	—
<i>D</i> -Phe	57	ДОФА	62	0
<i>D</i> -Val	40	Leu	61	98
<i>D</i> -Phg	34	Ala	56	44 *
<i>D</i> - <i>n</i> -гидрокси-Phg	33	Asn	48	2
<i>DL</i> - <i>n</i> -гидрокси-Phg	23	Phe	32	10
<i>L</i> -Lys	28	Glu	32	3
<i>D</i> -Tyr	19	Trp	31	0
<i>DL</i> -ДОФА	18	Тир	30	9
β -Ala	9	Val	18	100
<i>DL</i> -Leu	8	Gly	8	0
<i>D</i> -Trp	6	β -Ala	8	—
Gly	5	—	—	—
<i>L</i> -Glu	5	—	—	—
<i>L</i> -Asp	5	—	—	—
<i>A</i> -Ala	2	—	—	—

* Продукт — *DL*-аланин (из-за присутствия аланин-рацемазы в неочищенном экстракте).

pH-Оптимум гидролиза гидантоинового производного — 9,7; обратная реакция протекает при pH, более близких к нейтральным значениям (7–8); pH-оптимум действия *L*-КГ — 8,0; оптимальная температура для очищенных ферментов — 40°С; данные по субстратной специфичности *L*-КГ приведены в табл. 18.

В работе [94] проведено исследование другого штамма — *Arthrobacter sp. (DSM 3747)*, способного катализировать гидролиз *DL*-5-индолилме-

Таблица 17

Субстратная специфичность фермента гидантоин-гидролазы штамма AJ-3940

Субстрат — гидантоиновое производное АК	<i>V</i> отн. %
<i>L</i> -Trp	100
5-гидрокси- <i>L</i> -Trp	12
<i>L</i> -Phe	108
<i>L</i> -Tyr	71
<i>L</i> -3,4-ДОФА	105
<i>DL</i> -3,4-метилендиокси-Phe	112
<i>DL</i> -3,4-диметокси-Phe	4
<i>L</i> -Met	2
Gly, <i>L</i> -Ala, <i>L</i> -Ile, <i>L</i> -Asp, <i>L</i> -Glu	0

Таблица 18

Субстратная специфичность гидролазы N-карбамоил-*L*-аминокислот

Субстрат — N-карбамоил-АК	<i>V</i> отн. %
<i>DL</i> -3,4-метилендиокси-Phe	100
<i>L</i> -Phe	82
<i>L</i> -Tyr	59
<i>L</i> -Trp	55
<i>DL</i> -3,4-диметокси-Phe	24
<i>L</i> -Met	24
Gly	5
<i>L</i> -Ile	2

тилгидантоина до *L*-триптофана, которое показало, что превращение идет по схеме, аналогичной ранее предложенной [93], но рацемизация 5-индолилметилгидантоида в присутствии и в отсутствие клеток *Arthrobacter* sp. протекает по-разному (рис. 2). Это дало основание предположить, что в процессе участвует третий фермент — гидантоин-рацемаза, который был выделен в ходе дальнейшей работы [95].

б) *DL*-2-Оксо-оксазолидин-4-карбоновая кислота

Известен метод количественного получения *L*-цистеина из *DL*-2-амино-тиазолин-4-карбоновой кислоты (АТК) — промежуточного продукта в химическом синтезе *DL*-цистеина — в результате сопряженного ферментативного процесса гидролиза *L*-АТК и рацемизации *D*-АТК под действием клеток *Pseudomonas thiazolinophilum* AJ-3854 [96, 97]. Он нашел промышленное применение, и впоследствии была предпринята попытка разработать аналогичный процесс получения *L*-серина из *DL*-2-оксо-оксазолидин-4-карбоновой кислоты (ООК) — промежуточного продукта в химическом синтезе *DL*-серина [98]. Для полной конверсии рацемического производного в оптически активную аминокислоту необходимо осуществить две реакции: гидролиз *L*-ООК до *L*-серина и рацемизацию *D*-ООК. Было исследовано 849 штаммов, 12 из них оказались способными катализировать первую реакцию, 8 — вторую. Наилучшим источником гидролизной активности был штамм *Pseudomonas testosteroni* AJ-2770, а рацемазной — штамм *Bacillus subtilis* AJ-1996. В результате сопряженного процесса с участием клеток *Ps. testosteroni* и *B. subtilis* *L*-Ser был получен из *D*-ООК с выходом 30%, при использовании *L*-ООК в качестве субстрата реакция протекала

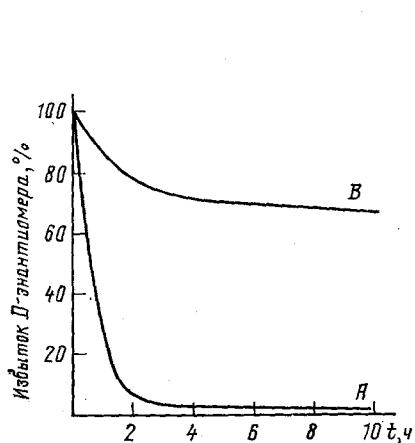


Рис. 2

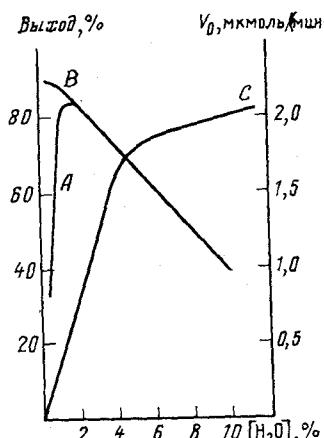
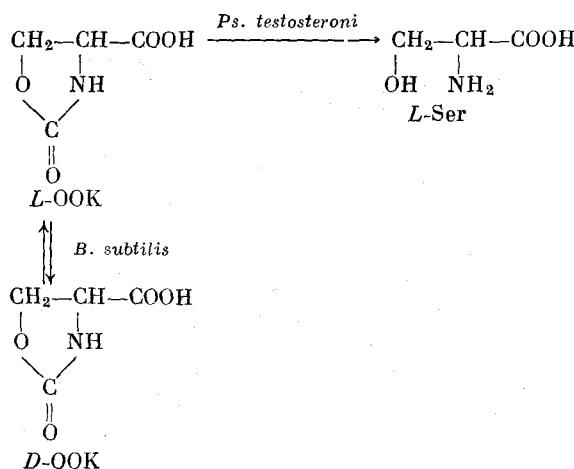


Рис. 3

Рис. 2. Рацемизация *D*-индолилметил-гидантонина в присутствии (A) и в отсутствие (B) клеток *Arthrobacter sp.*

Рис. 3. Влияние содержания воды на выход этилового эфира *N*-ацетил-*L*-триптофана (A – время реакции 24 ч; B – при малых концентрациях H_2O время реакции увеличено до 15 сут) и на скорость реакции (C); N-Ac-L-Trp – 0,05 г (0,2 ммоль), α -химотрипсин – 0,01 г; 0,1 М фосфатный буфер рН 6,8; 30° С

аналогично. Это позволило сделать вывод, что рацемизация не является стадией, лимитирующей скорость. В отсутствие клеток одного из штаммов *L*-Ser из *D*-OOC не был получен. Сопряженный процесс протекает по схеме:



III. ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНАЯ ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Реакции, катализируемые ферментами, как правило, обратимы. Однако создавая определенные условия (например, варьируя концентрации реагентов, выводя один из продуктов из сферы реакции) можно добиться сдвига равновесия в необходимом направлении. На практике это достигается проведением реакции в средах, содержащих значительные количества органических растворителей: водно-органических средах (в том числе

Таблица 19

Влияние концентрации EtOH на выход продукта

[EtOH] в CHCl_3 , М	Выход этилового эфира N-Ac-L-Trp, %
1	83 *
3	86 *
5	77 **
8,6 (50 об. %)	79 **
17,1	78 **

* Двухфазная система, ** однофазная система.

Таблица 20

Влияние концентрации субстрата

N-Ac-L-Trp, г	Время реакции, ч	Выход этилового эфира N-Ac-L-Trp, %	
		EtOH	CHCl_3 (1 M EtOH)
0,05	24	81	78
0,10	24	86	78
0,15	24	75	78
0,20	24	70	78
0,20	48	85	78
0,20	72	83	78
0,20	96	85	4,4
0,25	96	58	3,0

спирт — вода), в двухфазных системах «вода — не смешивающийся с водой органический растворитель», в системах обращенных мицелл, также в двухфазных водных полимерных системах. Ферментативный синтез производных аминокислот находится в состоянии развития; наибольшее число работ в этой области посвящено синтезу сложных эфиров α -аминокислот.

1. Синтез сложных эфиров аминокислот

Одно из первых сообщений о способности ферментов катализировать синтез эфиров аминокислот было сделано еще в 1965 г. [99]. Скорость ферментативной реакции и выход продукта зависят от многих факторов, среди которых решающую роль играют такие, как состояние фермента, свойства носителя (в том числе удельная поверхность) в случае использования иммобилизованного катализатора, состав и pH водной фазы, концентрация аминокислоты и спирта, состав органической фазы, соотношение объемов органической и водной фаз и др. В работе [100] оптимизирован по этим параметрам процесс синтеза этилового эфира N-ацетил-L-тирофина под действием иммобилизованного α -химотрипсина в двухфазной системе (выход продукта составил 85—90%). В аналогичных условиях (двуухфазная система вода — хлороформ, время — 2—8 ч) был получен этиловый эфир N-ацетил-L-триптофана с выходом 86—95% [101], что позволило использовать процесс для расщепления рацемата N-ацетилтриптофана (время — 48 ч, выход L-энантиомера — 45%) [102]. В работах [103, 104] исследована этерификация ацильных производных ароматических аминокислот в двухфазных системах и водно-органических средах. Значительное влияние на степень конверсии оказывало соотношение водной и органической фаз: при его изменении от 1:10 до 1:80 выход увеличивался от ~38 до ~92%. В системе вода — хлороформ при постоянном отношении $V_{\text{воды}}:V_{\text{орг}}$ (1:40) концентрация этанола на выход эфира влия-

ла довольно слабо (табл. 19). Выход продукта в этаноле достаточно высок; реакционная система представляет собой суспензию гидратированного α -химотрипсина, который может быть легко отделен фильтрацией. Другим важным достоинством однофазной системы авторы считают значительно менее заметное ингибирование субстратом, что приводит к высоким выходам продукта и при больших концентрациях субстрата (табл. 20).

Зависимость выхода эфира от содержания воды в системе при проведении этерификации в течение 24 ч имеет максимум в области 2–4% H_2O (рис. 3, кривая A), однако вид кривой изменяется при увеличении времени синтеза (при этих и более низких концентрациях H_2O) до 15 сут (рис. 3, кривая B). Это, видимо, связано со значительным уменьшением скорости реакции (рис. 3, кривая C) из-за снижения степени гидратации α -химотрипсина. Возможно, негативный эффект можно уменьшить, используя модифицированный фермент — гексилхимотрипсин — для синтеза эфиров [105]; значение V_{max} для такого фермента возрастает.

Другим возможным методом повышения скорости реакции при низких концентрациях H_2O является иммобилизация фермента — например адсорбция α -химотрипсина на хитине [106]. При проведении этерификации в этаноле с содержанием воды 3,4% выход этилового эфира N-ацетил-L-триптофана составил в случае свободного фермента 28% (время реакции — 24 ч), в случае α -химотрипсина, адсорбированного на хитине — 85% (время реакции — 12 ч). Использование других полисахаридов — микрокристаллической целлюлозы и аминоэтилцеллюлозы — привело к более низким выходам (20 и 23% соответственно за 24 ч), чем в случае свободного фермента. Известно, что α -химотрипсии в растворах, содержащих гидрофильные растворители в высоких концентрациях, теряет в значительной мере каталитическую активность из-за частичного разворачивания полипептидной цепи; вероятно, фермент, связанный с хитином, сохраняет нативную конформацию и при концентрациях H_2O менее 5%; возможно, значительная часть воды в таких растворах также адсорбируется на хитине, что вносит свой вклад в стабилизацию нативной конформации.

Исследование этерификации при различных температурах показало, что в интервале температур 10–35° С выход практически не меняется, при более высоких значениях температур — резко падает [104]. В описанных выше условиях осуществили этерификацию N-ацетил-L-ароматических аминокислот (триптофана, тирозина и фенилаланина), аналогичные производные L-аланина и L-лейцина в реакцию не вступали; выходы этилового эфира N-ацетил-D-триптофана (фенилаланина) были крайне незначительны. Это свидетельствует о сохранении в данных условиях субстратной специфичности и энантиоселективности. Однако специфичность по отношению к спиртовой компоненте реакции иная, чем в случае гидролиза: метанол и 2-метил-2-пропанол (трет-бутанол) не вступают в реакцию, другие исследованные первичные и даже вторичные спирты дают продукт с высоким выходом (табл. 21).

Были осуществлены попытки провести синтез и в других гидрофильных растворителях, содержащих 1,7 М этанола (табл. 22) [167]. В диметилформамиде, диметилацетамиде и диметилсульфоксиде этерификация N-ацетил-L-триптофана не происходит.

Также было проведено исследование влияния состава водной фазы, концентрации буфера и величины pH (табл. 23), которое показало, что в чистой H_2O выход крайне незначителен (5%), оптимальная концентрация при использовании фосфатного буфера — 0,1 М; при более высоких его концентрациях уменьшается активность фермента; это может быть связано с уменьшением количества воды, способной стабилизировать фермент, из-за увеличения ее количества, связанного с фосфатом. Интересно, что другие буфера в той же мольной концентрации при иных значениях pH

Таблица 21

Влияние структуры спиртовой компоненты реакции на синтез этилового эфира N-ацетил-L-триптофана

Спирт	Выход за 24 ч, %	Спирт	Выход за 24 ч, %
Метанол	0	1-Бутанол	83
Этанол	81	2-Бутанол	65
1-Пропанол	83	2-Метил-1-пропанол	80
2-Пропанол	78	2-Метил-2-пропанол	0

Таблица 22

Начальная скорость этерификации (V_0) и выход эфира ацетиламинокислоты

Растворитель	N-Ac-L-TrpOEt		N-Ac-L-TyrOEt	
	$V_0 \cdot 10^2$, мкмоль/мин·г	выход, % (24 ч)	$V_0 \cdot 10^2$, мкмоль/мин·г	выход, % (24 ч)
Ацетон	6,1	71	18	74
Нитрометан	4,3	60	31	89
Ацетонитрил	2,3	56	13	80
Пропиленкарбонат	1,1	45	6,8	66
Тетрагидрофуран	0,88	30	4,5	44
1,4-Диоксан	«<0,5	12	6,5	46
Этанол	12	81	15	82

Таблица 23

Влияние буфера на синтез этилового эфира N-ацетил-L-тирофина

Буфер	pH	M	$V_0 \cdot 10^2$, мкмоль/мин·г	Выход, % (24 ч)
Фосфатный	6,8	0,05	4,1	78
	6,8	0,1	4,9	78
	6,8	0,2	2,4	49
	6,8	0,5	2,3	24
Ацетатный	5,0	0,1	4,4	70
Боратный	9,0	0,1	4,7	74
H_2O	—	—	См. *	5

* Не определяли.

(5,0 и 9,0) дали результаты (70 и 74%), аналогичные полученным при использовании фосфатного буфера (pH 6,8); минимальное влияние pH можно объяснить, исходя из того, что после смешивания раствора α -химотрипсина с большим избытком органического растворителя неорганические соли могут играть роль адсорбентов фермента.

Другим ферментом, широко используемым для получения оптически активных эфиров, аминокислот, является папаин [108–113]. Так была предпринята попытка разделения энантиомеров N-тетр-бутилоксикарбониламинокислот путем ферментативного синтеза сложных эфиров. В качестве водной фазы использован 1 М цитратно-фосфатный буфер (pH 4,2), в качестве органической фазы — хлористый метилен. Варьируя соотношение буфер : хлористый метилен : спирт, были получены эфиры для большинства аминокислот с высокими выходами (табл. 24); в случае стерически затрудненных (валин, изолейцин, треонин), а также основных аминокислот (лизин, аргинин, гистидин) выходы были невысокими.

Как видно из табл. 24 оптимальное соотношение органической и водной фазы $\beta = V_{\text{орг}}/V_{\text{вод}}$ изменяется от $\beta = 17$ для гидрофильных аминокислот

Таблица 24

Этерификация *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-*L*-аминокислот под действием папаина (37° С; 8 ч)

Субстрат — <i>N</i> -Бос-АК	Соотношение объемов буфер : CH_2Cl_2 : спирт	Выход, %	Субстрат — <i>N</i> -Бос-АК	Соотношение объемов буфер : CH_2Cl_2 : спирт	Выход, %
Leu	3 : 1 : 1	75	Tyr	3 : 5 : 1	90
Phe	3 : 1 : 1	76	Ser	3 : 5 : 1	75
Trp	3 : 1 : 1	78	Thr	3 : 5 : 1	40
Met	3 : 1 : 1	76	Glu	3 : 50 : 1,5	90
Cys(Bzl)	3 : 1 : 1	74	Glu *	3 : 50 : 1,5	78
Val	3 : 0,5 : 1	27	Gln	1,5 : 50 : 1,5	85
Ile	3 : 0,5 : 1	22	Asp	3 : 50 : 1,5	83
Gly	3 : 5 : 1	82	Asp *	3 : 50 : 1,5	70
Ala	3 : 5 : 1	88	Asn	1,5 : 50 : 1,5	82

* В качестве спиртовой компоненты реакции использован бензиловый спирт.

(аспартиновой и глутаминовой кислот) до $\beta=0,3$ в случае гидрофобных фенилаланина, лейцина, триптофана и метионина. Этерификация дикарбоновых кислот приводила к моноэфирам по α -карбоксильной группе. Возможность применения ферментативного синтеза для расщепления рацематов аминокислот была продемонстрирована на примере синтеза бензилового эфира *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-*L*-аспартиновой кислоты из рацемической *N*-замещенной аминокислоты и бензилового спирта; *D*-эфир в продукте обнаружен не был, также было показано, что *D*-энантиомер не этерифицируется под действием папаина. В дальнейших исследованиях авторы показали возможность получать эфиры из аналогичного *N*-производного аланина и алифатических спиртов $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{OH}$ ($n=2, 4, 6$) и диолов $\text{OH}(\text{CH}_2)_{2m}\text{OH}$ ($1 \leq m \leq 5$) [109]. Иммобилизация же папаина на ХАД-7 (нейтральном спиртом полиметилакрилате) или сефарозе позволяет проводить реакцию и в случае $n=8, 10, 12, 16, m=6$. При использовании иммобилизованного фермента в 5 раз снижается количество спирта, энантиоселективность действия папаина по отношению к α -аминокислотам сохраняется; процесс можно использовать для расщепления рацемических *N*-*трет*-бутилоксикарбониламинокислот (аланина и аспартиновой кислоты) [110]. Как и в случае α -химотрипсина ферментативный синтез под действием папаина можно проводить в водно-спиртовой среде [111–113]. Так, этерификация *N*-бензилоксикарбониламинокислот, катализируемая папаином, была проведена в системе спирт – вода с минимальным количеством воды (4–5 экв. H_2O /экв. АК), в качестве спиртовой компоненты реакции использованы этиловый, метиловый, *n*-пропиловый и *n*-бутиловый спирты (табл. 25) [112].

В работе [113] для этерификации использован иммобилизованный папаин. Из 8 исследованных носителей лучшим оказался Sephadex G-50 (выходы эфиров *N*-*трет*-бензилоксикарбониламинокислот — 40–93%). Исследование влияния объема, концентрации и pH водной фазы показало, что максимальный выход достигается при содержании воды около 5%; зависимость выхода от pH имеет острый максимум при pH 4,2, а при увеличении концентрации цитратного буфера от 0 до 3 М выход увеличивается от 0 до 93%.

В последние годы появился ряд работ, демонстрирующих возможность проведения ферментативных реакций в безводных органических растворителях [114–116]. В работе [117] показано, что α -химотрипсин, осажденный из *n*-пропанола, способен катализировать синтез этилового эфира

Таблица 2

Синтез эфиров N-замещенных аминокислот

N-замещенная <i>DL</i> -АК	Продукт — N-Z-L-АК-OR		N-замещенная <i>DL</i> -АК	Продукт — N-Z-L-АК-OR	
	R	Выход, %		R	Выход, %
Ala	Et	48,5	Ser	Et	26,5
Ala	Me	42,5	Met	Et	47,5
Ala	н-Pr	37,5	Asp	Et	31,5
Ala	н-Bu	40,0	Gln	Et	44,5
Ala *	Et	36,5	Trp	Et	46,0
Ala **	Et	17,5	Phe	Et	43,5
NorVal	Et	49,0	Tyr	Et	47,5
NorLeu	Et	48,5	4-F-Phe	Et	41,0
Val	Et	19,0	4-NO ₂ -Phe	Et	37,5
Leu	Et	45,0	3,4-Cl ₂ -Phe	Et	45,5

Примечание. Условия реакции на примере 1: 50° С; 10,7 г Z-*DL*-Ala в 80 мл абс. EtOH, содержащего 2 мл цитратного буфера (pH 4,5), время — 24 ч; выход Z-*D*-Ala — 42,5% (энантиомерный избыток >95%).

* N-Boc-*L*-Ala-OEt; ** N-Fmoc-*L*-Ala-OEt.

Таблица 26

Ферментативный аминолиз метилового эфира аланина 3-аминоцентаном

Субстрат	Растворитель	Выход, %
D-Ala-OMe	н-Бутилацетат	98
DL-Ala-OMe	н-Бутилацетат	48
L-Ala-OMe	н-Бутилацетат	0
D-Ala-OMe	Бензол	98
D-Ala-OMe	1,1,1-Трихлорэтантолуол	91
D-Ala-OMe	Толуол	67

N-ацетилтриптофана в циклогексане с высокой энантиоселективностью, которую можно регулировать, варьируя условия осаждения: при осаждении в присутствии N-ацетил-*D*-триптофана отношение начальных скоростей ферментативных реакций $V_0^L/V_0^D = 70$; ($V_0^L = 0,5$ мкмоль/мг·ч; $D_0^L = 7,1$ нмоль/мг·ч) при осаждении в присутствии N=Ac=L=Trp величина энантиоселективности сильно возрастает ($V_0^L = 2,7$ мкмоль/мг·ч; синтез D-эфира не наблюдался в течение 120 ч).

2. Синтез амидов аминокислот

Найдено, что D-энантиоселективная аминопептидаза из *Ochrobactrum anthropi*, способная осуществлять гидролиз амидов D-аминокислот, а также пара-нитроанилидов и эфиров аминокислот и некоторых пептидов, при определенных условиях катализирует аминолиз эфиров D-аминокислот [118, 119]. Так, D-аланин-3-пентиламид был синтезирован количественно в течение 1 ч из метилового эфира D-аланина и 3-аминоцентана в различных органических растворителях, насыщенных водой (табл. 26).

При использовании *DL*-субстрата продукт не содержал амид L-аминокислоты. Фермент обладает широкой специфичностью по отношению к акцептору ацильной группы, аналогичным образом были синтезированы продукты с высокими выходами из D-аланина и н-бутиламина, бензиламина и неопентиламина; в то же время специфичность фермента по отношению к ацильной группе оказалась существенно уже: только эфиры D-аланина, глицина и D- α -аминомасляной кислоты давали продукт с высоким выходом (98, 80 и 40% соответственно); метиловые эфиры 19 других

D- α -аминокислот, β -аланина и различных карбоновых кислот не являются субстратами этой ферментативной реакции. В воде аминолиз метилового эфира *D*-аланина протекает с выходом — 78% за 7,5 мин с последующим полным гидролизом до *D*-аланина в течение 30 мин.

Приведенные в обзоре сведения о ферментативных методах расщепления рацемических аминокислот и их производных демонстрируют интенсивное развитие этой сферы научной и производственной деятельности. Широкое использование энантиоселективных ферментативных процессов наряду с процессами ферментативного синтеза аминокислот из ахиральных субстратов позволит в значительной степени удовлетворить потребности в оптически активных аминокислотах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anderson D. M. // Biotec. 1987. V. 1. (Microb. Eng. Enzyme Technol). P. 41.
2. Швядас В. К., Галаев И. Ю. // Успехи химии. 1983. Т. 52. С. 2039.
3. Warburg O. // Ber. 1905. B. 38. S. 187.
4. Пат. 273679 Европа // С. А. 1989. V. 110. 194300.
5. Пат. № 3622662 ФРГ // С. А. 1989. V. 110. 22337.
6. Glaenzer B. I., Faber K., Griengl H. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. P. 4293.
7. Glaenzer B. I., Faber K., Griengl H. // Tetrahedron. 1987. V. 43. P. 771.
8. Fadnavis N. W., Reddy N. P., Bhalerao U. T. // J. Org. Chem. 1989. V. 54. P. 3218.
9. Miyazawa T., Takitani T., Ueji S. et al. // J. Chem. Soc. Chem. Communns. 1988. V. 17. P. 1214.
10. Miyazawa T., Iwanaga H., Ueji S. et al. // Chem. Lett. 1989. V. 12. P. 2219.
11. Kezdy F. I., Jindal S. D., Bender M. L. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. P. 746.
12. Пат. 3438189 ФРГ // С. А. 1986. V. 105. 189452.
13. Scheper T., Halwachs W., Schuegerl K. // Chem.-Ing.-Tech. 1982. B. 54. S. 697.
14. Пат. 89866 Европа // С. А. 1984. V. 100. 7155.
15. Plaschel E., Grelier S., Renken A. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1988. V. 542. (Enzyme Eng. 9). P. 219.
16. Mirviss S. B., Dahod S. K., Empie M. W. // Ind. Eng. Chem. Res. 1990. V. 29. P. 651.
17. Sheardy R., Liotta L., Steinhart E. // J. Chem. Educ. 1986. V. 63. P. 646.
18. Anantharamaiah G. M., Roeske R. W. // Tetrahedron Lett. 1982. V. 23. P. 3335.
19. Almond H. R., Manning D. T., Niemann C. // Biochemistry. 1962. V. 1. P. 243.
20. Chen S. T., Wang K. T., Wong C. H. // J. Chem. Soc. Chem. Communns. 1986. V. 20. P. 1514.
21. Wong C. H., Chen S. T., Hennen W. J. et al. // J. Amer. Chem. Soc. 1990. V. 112. P. 945.
22. Yamskov I. A., Tichonova T. V., Davankov V. A. // Enzyme Microb. Technol. 1986. V. 8. P. 241.
23. Пат. 3629242 ФРГ // С. А. 1988. V. 108. 36328.
24. Пат. 327156 Европа // С. А. 1990. V. 113. 22201.
25. Пат. 6036446 // С. А. 1986. V. 104. 166901.
26. Пат. 334358 // С. А. 1990. V. 112. 177039.
27. Пат. 6387998 Япония // С. А. 1989. V. 110. 93556.
28. Asano Y., Mori T., Hanamoto S. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989. V. 162. P. 470.
29. Boesten W. H. J., Dassen B. H. N., Kerkhoffs P. L. et al. // NATO ASI Ser., Ser. C. 1986. V. 178. P. 355.
30. Пат. 181675 Европа // С. А. 1986. V. 105. 96058.
31. Пат. 199407 Европа // С. А. 1987. V. 107. 40327.
32. PCT Int. Appl. WO 8901525 // С. А. 1990. V. 112. 6077.
33. Kruijning W. H., Bolster J., Kellogg A. M. et al. // J. Org. Chem. 1988. V. 53. P. 1826.
34. Jallageas J.-C., Arnaud A., Galzy P. // Adv. Biochem. Eng. 1980. V. 14. P. 1.
35. Sun W., Yin G. // Weishengwuxue Tongbao. 1989. V. 16. P. 168; С. А. 1990. V. 112. 34322.
36. Arnaud A., Galzy P., Jallageas J.-C. // Bull. Soc. chim. France. 1980. V. 2. P. 87.
37. Пат. 0231694 Япония // С. А. 1990. V. 113. 57479.
38. PCT Int. Appl. WO 8607386 // С. А. 1990. V. 113. 57454.
39. PCT Int. Appl. WO 8910969 // С. А. 1987. V. 107. 216168.
40. Chibata I., Tosa T. // Proc. JUPAC Congr. XXIX 1983. P. 343.
41. Leuchtenberger W., Ploecker U. // Chem.-Ing.-Tech. 1988. B. 60. С. 16.
42. Жуков С. А., Галаев Ю. В. // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1989. Т. 25. С. 126.
43. Галаев И. Ю. Автореф. дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ, 1979. 24 с.

44. Пат. 547913 Испания // С. А. 1987. В. 107, 183632.
45. Пат. 62248499 Япония // С. А. 1988. В. 108, 110859.
46. Пат. 63148990 Япония // С. А. 1989. В. 111, 22195.
47. Пат. 6062991 Япония // С. А. 1985. В. 103, 121716.
48. Пат. 216918 ГДР // С. А. 1985. В. 103, 86513.
49. Пат. 60172297 Япония // С. А. 1986. В. 104, 33045.
50. Пат. 3334846 ФРГ // С. А. 1985. В. 103, 2918.
51. Пат. 3603986 ФРГ // С. А. 1988. В. 108, 130047.
52. Пат. 182517 Европа // С. А. 1987. В. 106, 17122.
53. Пат. 304021 Европа // С. А. 1990. В. 112, 51273.
54. *Tosa T., Mori T., Fuse N. et al.* // Agric. Biol. Chem. 1969. V. 33. P. 1047.
55. Курганова Л. Ф., Неклюдов А. Д., Бартошевич Ю. Э. // Антибиотики и мед. биотехнол. 1986. Т. 31. С. 385.
56. *Kang S., Minematsu Y., Shimohigashi Y. et al.* // Mem. Fac. Sci., Kyushu Univ. Ser. C. 1987. V. 16. P. 61.
57. *Blasko A.* // Rev. Chem. 1987. V. 38. P. 879.
58. *Blasko A.* // Ibid. 1987. V. 38. P. 994.
59. *Graeger U., Draus K., Klenk H.* // Angew. Chem. 1990. B. 102. S. 428.
60. *Cho H., Tanizawa K., Tanaka H. et al.* // Agric. Biol. Chem. 1987. V. 51. P. 2793.
61. *Cho H., Tanizawa K., Tanaka H. et al.* // J. Biochem. (Tokyo). 1988. V. 103. P. 622.
62. *Kimura Y., Yasuda N.* // Agric. Biol. Chem. 1989. V. 53. P. 497.
63. *Kameda Y., Toyoura E., Yamazoe H. et al.* // Nature. 1952. V. 170. P. 888.
64. *Kubo K., Ishijura T., Fukagawa Y.* // J. Antibiot. 1980. V. 33. P. 556.
65. *Sugie M., Suzuki H.* // Agric. Biol. Chem. 1980. V. 44. P. 1089.
66. Пат. 6339598 Япония // С. А. 1989. В. 110, 93554.
67. *Tsai Y.-C., Tseng C.-P.* // Appl. Environ. Microbiol. 1988. V. 54. P. 984.
68. *Chenault H. K., Dahmer S., Whitesides G. M.* // J. Amer. Chem. Soc. 1989. V. 111. P. 6354.
69. *Kearney P. C., Kaufman D. D.* // Science. 1965. V. 147. P. 740.
70. *Effenberger F., Draus K.* // Chem. Ber. 1981. B. 114. S. 173.
71. *Sambale C., Kula M.-R.* // Biotechnol. Appl. Biochem. 1987. V. 9. P. 251.
72. *Lewke E., Sambale C., Kula M.-R.* // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1988. V. 542. (Enzyme Eng. 9). P. 343.
73. Пат. 3606401 ФРГ // С. А. 1988. В. 108, 185294.
74. *Sambale C., Kula M.-R.* // J. Biotechnol. 1988. V. 7. P. 49.
75. *Halvarson H.* // Can. J. Microbiol. 1972. V. 18. P. 1647.
76. Пат. 63207399 Япония // С. А. 1989. В. 110, 22331.
77. Пат. 6356278 Япония // С. А. 1989. В. 110, 113231.
78. Пат. 6034191 Япония // С. А. 1985. В. 103, 140289.
79. Пат. 152977 Европа // С. А. 1985. В. 103, 176979.
80. *Olivieri R., Fascetti E., Angelini L. et al.* // Biotechnol. Bioeng. 1984. V. 23. P. 2173.
81. Пат. 6200271 Япония // С. А. 1987. В. 107, 5729.
82. Пат. 159866 Европа // С. А. 1986. В. 104, 67504.
83. Пат. 3712539 ФРГ // С. А. 1988. В. 109, 127326.
84. Пат. 6324895 Япония // С. А. 1988. В. 108, 220380.
85. *Ware E.* // Chem. Rev. 1950. V. 46. P. 403.
86. *Yamada H., Shimizu S.* // Stud. Org. Chem. 1985. V. 22. (Biocatal. Org. Synth.). P. 19.
87. *Yokozeki K., Nakamori S., Yamanaka S. et al.* // Agric. Biol. Chem. 1987. V. 51. P. 715.
88. *Yokozeki K., Kubota K.* // Ibid. 1987. V. 51. P. 721.
89. *Syldatk C., Cotoras D., Dombach G. et al.* // Biotechnol. Lett. 1987. V. 9. P. 25.
90. *Syldatk C., Dombach G., Gross C. et al.* // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1988. V. 542 (Enzyme Eng. 9). P. 323.
91. *Yokozeki K., Sano K., Eguchi C. et al.* // Agric. Biol. Chem. 1987. V. 51. P. 363.
92. *Yokozeki K., Sano K., Eguchi C. et al.* // Ibid. 1987. V. 51. P. 729.
93. *Yokozeki K., Hirose Y., Kubota K.* // Ibid. 1987. V. 51. P. 737.
94. *Gross C., Syldatk C., Mackowiak V. et al.* // J. Biotechnol. 1990. V. 14. P. 363.
95. *Syldatk C., Wagner F.* // Food Biotechnol. 1990. V. 4. P. 87.
96. *Sano K., Eguchi C., Yasuda N. et al.* // Agric. Biol. Chem. 1979. V. 43. P. 2373.
97. *Sano K., Yamamoto T., Kusumoto I. et al.* // J. Agric. Chem. Soc. Japan. 1985. V. 59. P. 823.
98. *Yokozeki K., Yamamoto T., Kusumoto I. et al.* // Agric. Biol. Chem. 1987. V. 51. P. 963.
99. *Whitaker J. R., Bender M. L.* // J. Amer. Chem. Soc. 1965. V. 85. P. 2728.
100. *Vidaluc J. L., Baboulene M., Speziale V. et al.* // Tetrahedron. 1983. V. 39. P. 269.
101. Пат. 214984 Чехословакия // С. А. 1985. В. 102, 127909.
102. Пат. 236166 Чехословакия // С. А. 1988. В. 108, 148898.
103. *Kise H., Shirato H.* // Tetrahedron Lett. 1985. V. 26. P. 6081.
104. *Kise H., Shirato H.* // Bull. Chem. Soc. Japan. 1987. V. 60. P. 3613.
105. *Remy M. H., Bacou P., Bourdillon C. et al.* // Biochim. Biophys. acta. 1987. V. 911. P. 252.

106. *Kise H., Hayakawa A., Noritoni H.* // Biotechnol. Lett. 1987. V. 9. P. 543.
107. *Kise H., Shirato H.* // Enzyme Microb. Technol. 1988. V. 10. P. 582.
108. *Cantacuzene D., Pascal F., Guerreiro C.* // Tetrahedron. 1987. V. 43. P. 1823.
109. *Cantacuzene D., Guerreiro C.* // Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. P. 5153.
110. *Cantacuzene D., Guerreiro C.* // Tetrahedron. 1989. V. 45. P. 741.
111. *Morinier J. L., Danree B., Guy A.* // Eur. J. Med. Chem. 1987. V. 22. P. 347.
112. *Morinier J. L., Danree B., Lemoire J. et al.* // Synth. Commun. 1988. V. 18. P. 441.
113. *Tai D.-F., Fu S.-L., Chuang S.-F. et al.* // Biotechnol. Lett. 1989. V. 11. P. 173.
114. *Margolin A. L., Tai D.-F., Klibanov A. M.* // J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 109. P. 7885.
115. *Russel A. J., Klibanov A. M.* // J. Biol. Chem. 1988. V. 262. P. 11624.
116. *Zaks A., Russel A. J.* // Biotechnol. 1988. V. 8. P. 259.
117. *Stahl M., Mansson M.-O., Mosbach K.* // Biotechnol. Lett. 1990. V. 12. P. 161.
118. *Asano Y., Nakazawa A., Kato Y. et al.* // Angew. Chem. 1989. B. 101. S. 511.
119. *Kato Y., Asano Y., Nakazawa A. et al.* // Tetrahedron. 1989. V. 45. P. 5743.

Институт пищевых веществ АН СССР, Москва