



• Փորձարարական և տեսական հոդվածներ • Экспериментальные и теоретические статьи •
•Experimental and theoretical articles•

Биол. журн. Армении, 3 (64), 2012

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ L- И D-ВАЛИНА ИЗ D,L-ВАЛИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ L-АМИНОАЦИЛАЗЫ

Օ.Ա. ԱԳԱՆՅԱՆ, Ա.Վ. ՄՅԻՏԱՐՅԱՆ, Ա.Տ. ԴԱԴԱՅԱՆ, Ա.Օ. ԿՈԼՈՅԱՆ,
Ա.Տ. ՕՎՏՍԵՅԱՆ

НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА
hovtau@mail.ru

Разработан метод последовательного получения D- и L-валина из рацемата валина с использованием аминокацилазы, выделенной из бычьих почек. Использовано совмещение ферментативного (L-аминоацилаза) и кислотного гидролиза N-ацетил-D,L-аминокислоты. В результате очистки удельная активность фермента в препарате составила 13,8 Ед/мг. Разработанный метод позволяет из D,L валина получать как D-, так и L-валин с выходом более 80 %. Оптическая чистота полученного L-валина превышает 98 %, а D-валина –96 %.

N-ацетил-D,L-валин – D-валин – L-валин – L-аминоацилаза – ферментативное деацилирование – химический гидролиз

Մշակված է վալինի ոսկեմատից D- և L-վալինի հաջորդական ստացման մեթոդ, ցլի երկկամից անջատված ամինաացիլազի կիրառմամբ: Մեթոդում օգտագործվել է N-ացետիլ-D,L-ամինաթթվի ֆերմենտային (L-ամինաացիլազ) և թթվային հիդրոլիզի զուգորդումը: Մաքրման արդյունքում ֆերմենտային պատրաստուկի տեսակարար ակտիվությունը կազմել է 13,8 Մ/մգ: Մշակված մեթոդը թույլ է տալիս D,L վալինից ստանալ ավելի քան 80% ելքով D- և L- վալին: Ստացված L-վալինի օպտիկական մաքրությունը գերազանցում է 98 %, իսկ D-վալինինը 96%:

N-ացետիլ-D,L-վալին – D- վալին – L- վալին – L-ամինաացիլազ – ֆերմենտային ղեացիլացում – քիմիական հիդրոլիզ

The consecutive obtaining method of D- and L-valine from racemic D,L-valine is proposed, using the L-aminoacylase isolated from bovine kidney has been developed. Combination of enzymatic (L-aminoacylase) and acid hydrolysis of N-acetyl-DL-amino acid was used. As a result of purification the specific activity of enzyme in the preparation reached 13.8 U/mg. The developed method allows to obtain both D- and L-valine from racemic valine with the yield of more than 80 %. Optical purity of the obtained L-valine exceeded 98 %, and the purity of D-valine exceeded 96 %.

N-acetyl-DL-valine – D-valine – L-valine – L-aminoacylase – enzymatic deacylation – chemical hydrolysis

Энантиомерно чистые аминокислоты применяются как основные компоненты в фармацевтической, пищевой и косметической промышленности, сельском хозяйстве, а также в производстве кормов [5, 17]. Для получения таких аминокислот можно применять аминокацилазы [3, 4, 6, 7, 12]. Эти ферменты (N-ациламиногидролазы ЕС 3.5.1.14) обнаружены и описаны в ряде организмов. Чибата и др. исследовали субстратную специфичность бактериальных и дрожжевых ацилаз и показали возможности получения различных белковых L-аминокислот из D,L форм с использованием данных ферментов [6, 7]. Подобные исследования проводились так-

же на аминоксилазах млекопитающих [4]. Подробно описаны L-аминоксилазы, выделенные из различных объектов [8, 13]. Были получены соответствующие L-энантиомеры из D,L-аланина и D,L-лейцина [12]. Разработан метод последовательного получения D- и L-энантиомеров метионина из D,L метионина с выходом более 95 % [3].

При синтезе L-аминоксилот из рацематов был также использован фермент, выделенный из *Alcaligenes dinitrificans*, характеризующийся высокой стабильностью [19]. В последнее время широкое применение нашли аминоксилазы термофильных бактерий. Получены высокоактивные рекомбинантные штаммы-продуценты *E. coli*, несущие ген аминоксилазы термофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus* [15], *Thermococcus litoralis* [11], гипертермофильной археобактерии *Pyrococcus horikoshii* [16]. Японскими авторами клонирован ген, кодирующий бифункциональный фермент карбоксипептидазу/аминоксилазу *P. Horikoshii*, и показана схожесть этого фермента с карбоксипептидазой *Sulfolobus solfataricus* и аминоксилазой *Bacillus stearothermophilus* [15].

Интенсивно изучаются также D-аминоксилазы, встречающиеся у различных типов микроорганизмов. В частности, клонирован и исследован ген, кодирующий D-аминоксилазу *Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *Xylosoxydans* A-6 [21]. Из этого штамма в препаративных количествах получен фермент D-аминоксилазы, исследованы его свойства, а также возможности его применения для получения D-аминоксилот [20]. Разработаны технологии получения D-аминоксилот с применением D-аминоксилаз [18]. Была установлена кристаллическая структура D-аминоксилазы *Alcaligenes faecalis* DA1 [10].

Целью настоящей работы являлась разработка метода получения оптически активных D- и L-валина из D,L валина с использованием L-аминоксилазы, выделенной из почек быка. Предложенный метод в дальнейшем может служить основой для получения энантиомерно чистых аминоксилот с использованием рекомбинантных штаммов *E. coli*, несущих гены D- и L-аминоксилаз различных бактерий.

Материал и методика. В работе использован частично очищенный фермент L-аминоксилазы, выделенный из бычьих почек.

Гомогенизацию почек проводили следующим образом: 20 г препарата размельчали и гомогенизировали на гомогенизаторе "Тип 302" (Польша) в буферном растворе А (0,1 М Na-K- фосфатный буфер, pH 7,0; 0,1 мМ фенил метил сульфонил фторид (PMSF), мМ ZnCl₂ 0,001) при 4°C, 1500-2000 об/мин. Продолжительность гомогенизации – 15 мин. Остатки тканей удаляли центрифугированием (15000 g, 20 мин).

На первом этапе очистки к грубому экстракту фермента добавляли сульфат аммония до 50%-ного насыщения, и инкубировали при температуре 4°C в течение 20-30 мин. Белковый раствор центрифугировали при 15000-20000 g в течение 20 мин, а осадок ресуспендировали в минимальном объеме буферного раствора А.

Для проведения ионообменной хроматографии полученный на предыдущем этапе препарат обессоливали на колонке, содержащей сефадекс G25 С "Фармация" (Швеция) уравновешенной буферным раствором А, и пропускали через колонку 2,5x30 см, заполненную DEAE-Тоуоpearl "Тоёо-Сода" (Япония) и уравновешенную тем же буферным раствором. Элюцию белков проводили линейным градиентом NaCl в концентрации 0-0,4 М (V=500 мл). Активные фракции объединяли и концентрировали сульфатом аммония.

Активность фермента измеряли при температуре 37°C по модифицированному методу Геда и Брауна [8]. За единицу активности фермента принято количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль L-валина при температуре 37°C за 1 мин.

Концентрацию белка определяли по методу Гровса и Дейвиса [14].

Ацилирование D,L-валина проводили по описанному методу [1]. К 4 М аминоксилотной суспензии добавлялось удвоенное количество (в молярном соотношении) свежеперегнанного ангидрида уксусной кислоты. Реакцию проводили постоянным перемешиванием при температуре 70 °С. За ходом реакции следили определением количества D,L-валина методом тонко- слойной хроматографии [2].

Для проведения ферментативного гидролиза N-ацетил-D,L-валина 10 г N-ацетил-D,L-валина растворяли в 60 мл реакционной среды (62,8 ммоль) и добавляли раствор ZnCl₂ (конечная концентрация 0,001 мМ), затем нейтрализовали 10 М NaOH до установления pH 6,6-7,0 и при 37°C добавляли препарат аминоксилы.

Сорбцию и элюцию L- и D-валина проводили следующим образом: полученный раствор пропускали через колонку со смолой Ку 2-8 в H⁺ форме. Элюцию проводили 3,5-4,0 %-ным водным раствором аммиака. После элюции колонку промывали дистиллированной водой до установления pH 8-8,5.

Раствор N-ацетил-D-валина выпаривали под вакуумом (P=0,1 р.т. или 15-20 мм ртут. столба) при температуре 50°C. К полученной маслообразной жидкости трижды добавляли дистиллированную воду в количестве 1/10 от первоначального объема и при тех же условиях выпаривали под вакуумом для удаления остатков уксусной кислоты.

Химический гидролиз N-ацетил-D-валина проводили при кипячении в 6 М HCl в течение 1-2 ч. После гидролиза для удаления соляной кислоты смесь выпаривали и к полученной массе трижды добавляли 1/3 от первоначального объема дистиллированной воды и выпаривали под вакуумом.

Полученный раствор D,L-валина обесцвечивали добавлением активированного угля в количестве 5 % от объема и выдерживали 30 мин перемешиванием при температуре 50°C. Удаление отработанного угля проводили фильтрованием через бумажный фильтр под вакуумом. Затем обесцвеченный раствор D,L-валина подвергали микрофильтрации с использованием мембранных фильтров с диаметром пор 0,45 мкм.

Кристаллизацию аминокислоты проводили с добавлением этанола к полученной смеси в соотношении 1:1 при температуре 50°C. После охлаждения смесь выдерживали при температуре 5-10°C в течение 6-12 ч. Полученные взвеси кристаллов фильтровали под вакуумом и промывали холодным этанолом.

Оптическую чистоту полученных кристаллов L- и D-валина определяли поляриметрически на поляриметре Polamat A (Германия).

Использованные в работе вещества имели чистоту "ЧДА", "Research Grade" и выше.

Результаты и обсуждение. Результаты очистки аминоксилы, выделенной из бычьих почек, приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, в результате применения данной схемы очистки удельная активность бычьей аминоксилы повысилась в 55 раз, а выход по активности составил 21,5 %. Степень очистки фермента позволяет использовать его для получения L-валина из рацемата валина методом биотрансформации.

Таблица 1. Схема очистки аминоксилы

Этап очистки	Количество белка, мг	Активность, Ед	Удельная активность, Ед/мг	Выход, %
Грубый ферментный экстракт	2338	584,5	0,25	100,0
Сульфат аммония	588	376,0	0,64	63,3
DEAE-Toyopearl	9	125,6	13,80	21,5

Выход ацилирования D,L-валина составил более 96 %. Неацилированная аминокислота собиралась на ионообменной смоле и использовалась в последующей реакции. С учетом этого выход реакции превосходил 99 %.

Технология последовательного получения L- и D-валина из D,L-валина посредством L-аминоксилы приведена на рис 1. Особенность предлагаемой технологии заключается в следующем: после ферментативного гидролиза и последующей очистки L-валин получается в гомогенном состоянии, а при получении D-валина с использованием L-аминоксилы необходимо, чтобы N-ацетил-D-валин,

входящий в ТП-4, был максимально свободен от N-ацетил-L-валина. В предлагаемой технологической схеме это происходит при помощи повторения этапа ферментативного гидролиза N-ацетил-D,L-валина (см. ТП-1 – ТП-3).

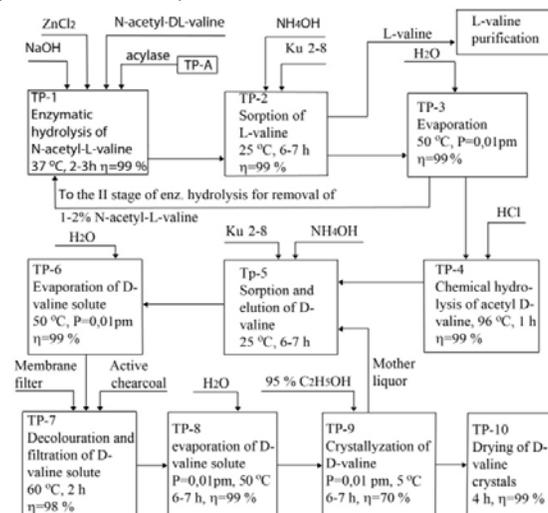


Рис 1. Технологическая схема последовательного получения L- и D-валина из D,L- валина методом биотрансформации с применением L-аминоацилазы.

ТП-1. Ферментативный гидролиз N-ацетил-D,L-валина. Ферментативный гидролиз 10 г N-ацетил-D,L-валина проводили при вышеуказанных условиях. За ходом реакции следили периодическим измерением концентрации полученного L-валина. Реакцию останавливали после гидролиза более 98 % N-ацетил-L-валина. С этой целью pH раствора понижали до 3,3-3,6 добавлением концентрированного HCl, а полученный раствор переводили на этап ТП-2.

ТП-2. Сорбция L-валина. Условия хроматографии описаны в разделе “Материал и методика”. Полученный раствор N-ацетил-D-валина, содержащий 6-8 % исходного количества N-ацетил-L-валина, далее подвергали выпарке. Выход N-ацетил-D-валина составил 99 %.

ТП-3. Выпаривание раствора. Полученный в результате перегонки концентрат N-ацетил-D-валина возвращали для повторного ферментативного гидролиза 6-8% N-ацетил-L-валина, оставшегося после первой ферментативной реакции. Затем полученный L-валин отделяли от N-ацетил-D-валина вышеуказанным способом (ТП-2, ТП-3). На данном этапе выход продукта составил 99 %, во втором цикле концентрат N-ацетил-D-валина (без следов L-изомера) подвергали химическому гидролизу (потери механические).

ТП-4. Химический гидролиз N-ацетил-D-валина. Выход D-валина после химического гидролиза составил 3,5 г, или 47,5 % от исходного количества N-ацетил-D,L-валина. Концентрат D-валина разбавляли дистиллированной водой до 60 мл и отправляли на этап ТП-5.

На каждом из этапов ТП-5 – ТП-10 выход конечного продукта составил 98-99% (потери механические).

Оптическую чистоту полученных L- и D-валина определяли поляриметрическим методом. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2. Схема очистки аминокислоты

Аминокислота	Удельное вращение, $[\alpha]_{D}^{23,46}$ ($c=3,4$; 6N HCl)
D,L-валин	0(0,7°)
D-валин	-26,8(0,7°)
L-валин	+27,3(0,8°)

Представленные в таблице данные об удельном вращении указывают на 98%-ную оптическую чистоту полученного препарата L-валина и 96%-ную для D-валина, что совпадает с литературными данными [16].

Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что разработан эффективный метод последовательного получения L- и D-валина высокой оптической чистоты из рацемата с использованием L-аминоацилазы млекопитающих.

Работа выполнена при поддержке государственного комитета по науке РА (тема 11-2i1-45/1).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гринштейн Дж., Виниц М.* Химия аминокислот и пептидов, М., "Мир", с. 340, 1965.
2. *Кирхнер Ю.* Тонкослойная хроматография, I, М., "Мир", с. 261, 1981.
3. *Мкртчян Г.М., Петросян С.Г., Дадаян С.А., Овсепян А.С., Амбарцумян А.А., Алебян Г.П., Сагиян А.С.* Получение D- и L-метионина из N-ацетил-D,L-метионина с применением бактериальной L-аминоацилазы. Биотехнология, 1, 37-41, 2005.
4. *Bell F.E. and Mounter L.A.* Studies of hog kidney acylase I. I. Comparison with hog kidney dialkylfluorophosphatase. J. Biol. Chem., 233, 4, p. 900-902, 1958.
5. *Bommarius, A.S., Schwarm, M., Drauz, K.* Biocatalysis to Amino Acid-based Chiral Pharmaceuticals - Examples and Perspectives J. Mol. Catal. B, 5, p. 1-11, 1998.
6. *Chibata I. and Ishikawa T.* Studies on amino acids: acylase activity in Yeast Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, 22, 4, p. 218-227, 1958.
7. *Chibata I., Kisumi M., Yamada Sh.* Studies on amino acids: acylase activity in Escherichiae. Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, 22, 1, p. 24-31, 1957.
8. *Gade W. and Braun J.L.* Purification, characterization and possible function of alpha-N-acylamino acid hydrolase from bovine liver. Biochem. et Biophys. Acta, 662, p. 86-93, 1981.
9. *Ishikawa K., Ishida H., Matsui I., Kawarabayasi Y., and Kikuchi H.* Novel bifunctional hyperthermostable carboxypeptidase/aminocyclase from Pyrococcus horikoshii OT3. Appl. and Environ. Microbiol., 67, 2, p. 673-679, 2001.
10. *Liaw S.H., Chen S.J., Ko T.P., Hsu C.S., Chen C.J., Wang A.H.J. and Tsai Y.C.* Crystal structure of D-Aminoacylase from Alcaligenes faecalis DA1. J. Biol. Chem. 278, p. 4957-4962, 2003.
11. *Littlechild J.A., Connelly S., Guy J.* Structural studies on novel thermophilic biocatalysts. International symposium on extremophiles and their applications, ISBM978-4-901833-01-1, 2005.
12. *Nakajima N., Esaki N., Soda K.* Enzymatic Conversion of Racemic Methionine to the L-Enantiomer. J. Chem. Soc., Chem. Commun., 13, p. 947-948, 1990.
13. *Orvos L., Moravcsik E. and Mady G.* Investigation on the mechanism of acylase-I-catalyzed acylamino acid hydrolysis. Biochem. and Biophys. Res. Commun. 44, 5, p. 1056-1064, 1971.
14. *Peterson G.* Determination of total protein. Meth. Enzymol., 91, 1, p. 95-119, 1983.

15. *Sakanyan V., Desmores L., Legrain C., Charlier D., Mett I., Kochikyan A., Savchenko A., Boyen A. et al.* Gene cloning, sequence analysis, purification and characterization of a thermostable aminoacylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 11, p. 3878-3888, 1993.
16. *Tanimoto K., Higashi N., Nishioka M., Ishikawa K., Taya M.* Characterization of thermostable aminoacylase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *FEBS Journal*, 275, p. 1140-1149, 2008.
17. *Taylor P.P., Pantaleone D.P., Senkpeil R.F., Fotheringham I.G.* Characterization of thermostable aminoacylase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *Trends Biotechnol.*, 16, p. 412-418, 1998.
18. *Tokuyama S., Matsuyama A.* Heat-stable D-aminoacylase. United States Patent 6,596, 528, July 22, 2003.
19. *Tsai Y.C., Hu H.L., Yang Y.B.* Process for making L-aminoacylase. United States Patent 5, 194, 383, March 16, 1993.
20. *Wakayama M., Hayashi S., Yatsuda Y., Katsuno Y., Sakai K., Moriguchi M.* Overproduction of D-aminoacylase from *Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans* A-6 in *Escherichia coli* and its purification. *Protein Expr. Purif.*, 7, 4, p. 395-399, 1996.
21. *Wakayama M., Katsuno Y., Hayashi S., Miyamoto Y., Sakai K., Moriguchi M.* Cloning and sequencing of a gene encoding D-aminoacylase from *Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans* A-6 and expression of the gene in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, p. 2115-2119, 1995.

Поступила 15.03.2012