



УДК 547.466'571.057

© 1993 Ю. Н. Белоконь, К. А. Кочетков,
Н. В. Филева, Н. С. Иконников, С. А. Орлова,
З. Б. Бакасова

ОСНОВАНИЯ ШИФФА ЭФИРОВ α -АМИНОКИСЛОТ — СУБСТРАТЫ ДЛЯ ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО ПОЛУЧЕНИЯ *L*-АМИНОКИСЛОТ

Институт элементоорганических соединений РАН, Москва

Эфиры *N*-ациламино кислот относятся к наиболее распространенным субстратам ферментативного гидролиза α -химотрипсином с целью получения *L*-аминокислот [1], однако они требуют специальных методов получения. Несколько меньшая скорость гидролиза и почти такая же энантиоселективность наблюдалась при использовании в качестве субстратов эфиров свободных α -аминокислот [2]. К сожалению, эти соединения малоустойчивы, димеризуются в дикетопиперазины [3]; легкая конденсация эфиров используется и в пластеиновой реакции [4]. В то же время основания Шиффа эфиров аминокислот с бензальдегидом доступны и устойчивы в чистом виде в течение нескольких месяцев [5].

Ранее нами разработан новый метод химико-ферментативного получения оптически чистого фенилаланина и его фторированных аналогов, замещенных в ароматическом кольце из соответствующих оснований Шиффа [6]. Основания Шиффа эфира фенилаланина и его *F*-производных получали алкилированием галоидными алкилами продуктов взаимодействия эфира глицина с бензальдегидом и далее гидролизовали в водно-органических средах в присутствии α -химотрипсина до свободных *L*-аминокислот.

Продолжая исследование оснований Шиффа эфиров аминокислот, пригодных в качестве новых субстратов для ферментативного гидролиза, мы в данной работе сообщаем о распространении предложенного метода на основания Шиффа ряда других α -аминокислот следующей общей формулы: $\text{PhCH}=\text{N}-\text{CH}(\text{R})\text{COOEt}$, где *R* = Me (I), *n*-Bu (II), $-\text{CH}_2$ - β -индолил (III), Ph (IV) и CH_2 - α -нафтил (V).

Эти соединения могут быть получены прямым путем в одну стадию из эфиров соответствующих α -аминокислот взаимодействием с бензальдегидом в присутствии водоотнимающих средств [5], в то время как взаимодействие оснований Шиффа, образованного эфиром глицина и бензальдегидом, с соответствующими галоидными алкилами обычно сопровождается появлением продуктов бисалкилирования, затрудняющих разделение продуктов реакции [7].

α -Химотрипсин гидролизует метиловые эфиры альдиминов (I—V) в среде $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (17,5 : 1) при pH 7 с образованием *L*-аминокислот (таблица). Поскольку превращение соединений (I—V) в соответствующие аминокислоты не сопровождается изменением pH раствора, ферментативный гидролиз был успешно осуществлен и без добавления в раствор буферных компонентов, необходимых для поддержания pH 7 [8]. При этом растворимость субстратов в органических растворителях позволила провести ферментативный гидролиз в смешанной водно-органической среде. В этих условиях образующаяся *L*-аминокислота выпадает в осадок и после окончания ферментативного гидролиза фильтрованием отделяется

Энантиомерный анализ продуктов ферментативного гидролиза субстратов формулы PhCH=NCH(R)COOEt-химотрипсином в среде MeCN/H₂O (17,5 : 1 по объему) при 25° С*

Номер соединения	R	Аминокислота	Время ч	L-АК		о.ч. оставшейся в смеси АК (избыток D-энантиомера, %)
				Выход, %	о.ч., %	
(I)	CH ₃	Ala	110	37	84	36
(II)	CH ₃ (CH ₂) ₂	Nva	210	33	93	40
(III)	CH ₂ -β-индолил	Trp	110	40	79	**
(IV)	Ph	(Ph)Gly	240	29	88	6
(V)	CH ₂ -α-нафтил	(нафтил)Ala	75	8	99	**
(VI)	CH ₂ Ph	Phe [6]	24	38	99	95
(VII)	2-F-C ₆ H ₄ CH ₂	(2F)Phe [6]	20	21	98	50
(VIII)	CH(OH)Ph	(Ph)Ser	120	0	—	0***

* Концентрация субстрата — 0,12 М, α-химотрипсина — 4,3 · 10⁻⁵ М.

** Не анализировали.

*** Ферментативный гидролиз не идет.

от раствора, содержащего непрореагировавший субстрат, обогащенный D-энантиомером, и бензальдегид. При этом благодаря низкой концентрации аминокислоты со свободной NH₂-группой в растворе уменьшается возможность образования побочных продуктов взаимодействия по карбонильной группе эфира, подобно тому как это наблюдалось в работе [9].

После осаждения фермента трихлоруксусной кислотой и химического гидролиза непрореагировавшего субстрата с бн. HCl аминокислота, обогащенная D-энантиомером, также может быть выделена (таблица). Химические выходы аминокислот определяли методом ГЖХ с использованием внутреннего стандарта L-лейцина. Энантиомерный анализ аминокислот проводили методом ГЖХ с использованием неподвижной высокотемпературной хиральной полисилоксановой диамидной фазы типа Chirasil-Val [10].

Специальными опытами с использованием в качестве субстрата соединения (VI) была показана высокая стабильность α-химотрипсина в данной водно-органической среде. Активность α-химотрипсина за 96 ч снижалась лишь на 40%. Следует отметить, что ранее не был обнаружен гидролиз L-энантиомера (III) α-химотрипсина в фосфатном буфере при pH 8—10, а наблюдался лишь медленный гидролиз D-энантиомера [8]. В наших нейтральных условиях реакции то же соединение (III) гидролизует до L-триптофана (таблица), что мы связываем с его промежуточным неферментативным гидролизом до эфира аминокислоты со свободной NH₂-группой и бензальдегида, который завершается ферментативным гидролизом эфира. Возможность же медленного ферментативного гидролиза D-энантиомера (III), обнаруженная в работе [8], вероятно, несколько снижает наблюдаемую нами оптическую чистоту (о.ч.) выделяющейся из реакционной смеси L-аминокислоты. Наличие такого обратимого химического гидролиза для основания Шиффа (VI) в системе MeCN/H₂O (17,5 : 1) нами было показано ранее. Факт снижения энантиоселективности и скорости ферментативного гидролиза при переходе от эфиров N-ацетиламино кислот к эфирам свободных аминокислот отмечен в работе [2], причем особенно существенным он был, как и в нашем случае, для неспецифических для α-химотрипсина аминокислот. Таким образом, совокупность имеющихся данных согласуется с предположением о предварительном неферментативном обратимом расщеплении альдиминной связи в условиях реакции, в результате чего энантиоселективному гидролизу по хорошо изученному механизму [2,9] подвергается уже эфир со свободной NH₂-группой.

Как видно из данных таблицы, несмотря на длительное время гидролиза

новых неспецифических для α -химотрипсина субстратов, с удовлетворительными выходами может быть получен ряд *L*-аминокислот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Верховская М. А., Ямсков И. А.//Успехи химии. 1991. Т. 60. № 10. С. 2250—2280.
2. Ямсков И. А., Тихонова Т. В., Даванков В. А.//Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 1. С. 113—118.
3. Гринштейн Дж., Виноц М.//Химия аминокислот и пептидов: Пер. с англ. М.: Мир, 1965. С. 291.
4. Беликов В. М., Гололобов М. Ю.//Успехи химии. 1979. Т. 48. № 9. С. 1684—1710.
5. Ghosez L., Antoine J. P., Deffense E., Navarro M., Libert V., O'Donnell M. J., Bruder W. A.//Tetrahedron Lett. 1982. V. 23. № 41. P. 4255—4258.
6. Белоконов Ю. Н., Кочетков К. А., Тараров В. И., Савельева Т. Ф., Филева Н. В., Гарбалинская Н. С., Сапоровская М. Б., Бакасова З. Б.//Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 6. С. 773—778.
7. O'Donnell M. J., Bennet W. D., Bruder W. A., Jacobsen W. N., Knuth K., LeClef B., Polt R. L., Bordwell F. G., Mrozack S. R., Cripe T. A.//J. Amer. Chem. Soc. 1988. V. 110. № 25. P. 8520—8525.
8. Шведас В. К., Галаев И. Ю., Иванов А. Е., Березин И. В.//Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 10. С. 1554—1558.
9. Carbas C. F., Matos J. R., West J. B., Wong C. H.//J. Amer. Chem. Soc. 1988. V. 110. № 15. P. 5162—5166.
10. Сапоровская М. Б., Волкова Л. М., Павлов В. А.//Журн. аналит. химии. 1989. Т. 44. № 3. С. 525—528.

Поступило в редакцию
24.VI.1992
После доработки
26.VIII.1992

Yu. N. BELOKON', K. A. KOCHETKOV, N. V. FILEVA, N. S. IKONNIKOV,
S. A. ORLOVA, Z. B. BACASOVA

SCHIFF BASES OF AMINO ACIDS ESTERS AS SUBSTRATES FOR ENZYMATIC RESOLUTION OF *L*-AMINO ACIDS

A. N. Nesmeyanov Institute of Elementoorganic Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow

Schiff bases of the type: PhCII-NCH(R)COOEt, where R=Me, *n*-Bu, Ph, β -indolyl, α -naphthyl, were used as new substrates for enzymatic hydrolysis. These compounds, derived from ethyl esters of some *D*, *L*-amino acids and benzaldehyde, after hydrolysis with α -chymotrypsin in the aqueous-organic medium without any buffer components were shown to yield *L*-amino acids (Ala, Nva, (Ph)Gly, Trp and naphthylalanine) which precipitated from the solution. Their enantiomeric purities were in the range of 79—99%.