

Комбинативен подход за ефективна и селективна итеративна процедура за ензимо-химична защита на алфа-аминогрупата на функционални аминокиселини, използвайки ензима липаза. Хомогенен и хетерогенен синтез.

Станислав Байрямов

A combinative approach for effective and selective iterative procedure for enzyme-chemical protection of alfa amino group of the functional amino acids, using lipase as enzyme. Homogeneous and heterogeneous synthesis. The successful effective and selective enzyme-chemical amino group protection was carried out at mild conditions, using lipase as catalyst and allowing to the easy and pure preparation of N-protected amino acids derivatives for conventional peptide synthesis and appropriate various using. During the solubility-controlled enzyme peptide synthesis, the product precipitates from the solution to keep its concentration below the equilibrium. The methodology allows the iterative and efficacy, using the lipase without its regeneration and step isolation from the reaction mixture. The method allows the carrying out of the homogeneous and heterogeneous synthesis.

Keywords: *iterative procedure, enzyme-chemical synthesis, lipase, solubility-controlled synthesis, ornithine, NMR, activated esters, Boc-protection group, Fmoc-protection group, Z-group, Bz(NO₂)-group.*

ВЪВЕДЕНИЕ

Съвременният органичен и в частност пептиден синтез е немислим без използването на защитни групи. Използването като N-защитни групи (защитни групи за аминокиселините) на 9-флуоренилметил оксикарбонилната защитна група (**Fmoc**) в твърдофазния пептиден синтез [1], на бензилхлорформатната (бензилоксикарбонилната) защита (**Z**) при осъществяването на пептидният синтез в разтвор [2, 3, 4], както и на перманентната p-нитробензоилна защитна група (**Bz(NO₂)**) за увеличаване чувствителността в УВ-областта при анализа на пептидите [3], за синтез на моделни съединения [5, 6], както и за защита и за увеличаване чувствителността в нуклеозидния, нуклеотидния и олигонуклеотиден синтез [7], налагат използването на защитени производни на биомономерите и в частност на аминокиселините.

Обикновено ацилните компоненти са активирани под формата на хлориди, анхидриди, активирани естери. Хлоридите, както и анхидридите, които се използват за вмъкване на познатите ацилни защитни групи са нестабилни, трудно се получават и имат ниски добиви. Освен това селективността на реагентите е ниска и съответно ниска е и чистотата на получените продукти. Ацилхлоридите и анхидридите са силно реакционноспособни, което води до нежелани странични реакции, особено при наличие на други нуклеофилни центрове (функционални групи: OH, COOH и др.), докато активираните естери са стабилни, лесно се получават, защитните групи под формата на активирани естери се вмъкват в по-меки условия, в сравнение с методите на ацилхлоридите и анхидридите, много са селективни и водят до високи добиви и чистота на получените продукти. Използването само на активирани естери в базични условия и без ензим е трудно и понякога нежелателно – изисква се доста време, а и реактивоспособността е малка, както и добивите, изискват се нередко посурови условия в сравнение с ензимния метод (понякога и нагряване). С настоящата работа се предлага елегантен, мек, удобен и селективен метод за защита на алфа-аминогрупата на функционални аминокиселини с най-често използваните групи в пептидният синтез, посредством активирани естери на аминокиселините и итеративното използване на липазата като катализатор.

ИЗЛОЖЕНИЕ

При провеждане на ензимен пептиден синтез се наблюдава контролирано утаяване на продукта в зависимост от неговата разтворимост, което позволява запазването на неговата концентрация под равновесните стойности [8]. Обикновено утаяният продукт се събира чрез филтруване на реакционната смес, съдържаща както освен продукта и ензима, така и нереагираният излишък на единия от компонентите, който обикновено се изхвърля [9]. Това означава, че ензимния синтез не може да бъде проведен при наличие на ниска нуклеофилна или електрофилна специфичност, което би изисквало наличие на голям излишък от единия или от другия компонент (нуклеофилен или електрофилен компонент), които след това остават неизползваеми. Рециклирането на ензима и възстановяването на неговата активност обаче, е един от основните проблеми, които все още остават не напълно решени. Алтернативното прилагане на имобилизиран ензим във водно-органични среди е усложнено, поради трудното и продължително отделяне на имобилизирания ензим от останалите компоненти в сместа [10], също така и поради бавната дифузия на реагентите, и както и поради ниската ензимна активност – изисква няколко пъти по-дълго реакционно време [10, 11]. Използването на итеративната процедура за ензимен синтез позволява частичното, а в някои случаи и пълното решаване на този проблем, което се заключава в повтарящото се (итеративното) добавяне на еквивалентни количества от ацилния и аминния компоненти към разтвора ("електрофилния басейн" или "нуклеофилния басейн"), съдържащ ензим и излишък на електрофилния или нуклеофилния компоненти в зависимост от методиката (Фиг.1). Затова проблемът се решава чрез многократното използване на ензима с прилагането на итеративната процедура („iteration” - повтаряне) (Фиг.1).

Като катализатор в синтезната процедура селекцията ни насочи към използването на свинска панкреатична липаза. От своя страна липазата е една хидролаза (ЕС 3. 1. 1. 3), която катализира хидролизни реакции в природата. Ензимните реакции в доста от случаите са равновесни, което важи и за хидролазите. Освен хидролизна реакция в присъствие на вода, възможна е и друга нуклеофилизна (алкохолизна, аминокислотна) реакция при наличие в реакционната смес на по-силен от водата нуклеофил. Освен това от закона за действие на масите е ясно, че в присъствието на многократен излишък от нуклеофил, различен от водата реакцията тече в посока на нуклеофилизата (алкохолиза, аминокислотна). Ако k_n и k_w са стойностите на скоростните константи на хидролизната и аминокислотната паралелни реакции, препаративният добив ще бъде изчислен (описан), използвайки следното равенство (1)):

$$Y = \frac{100 k_n (N)}{k_n (N) + k_w (W)} \% \quad 1)$$

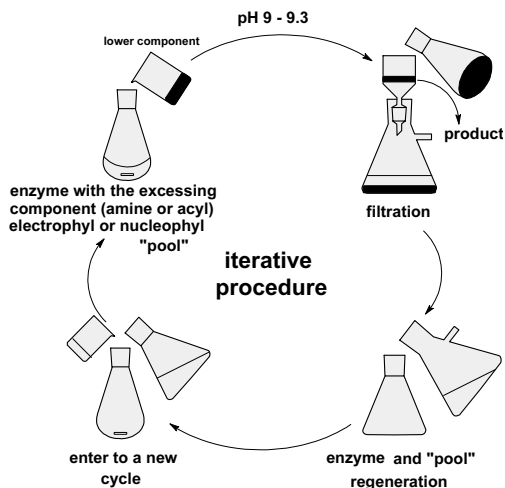
следователно необходимият добив Y_p , може да бъде получен използвайки нуклеофилната концентрация (2)):

$$(N) = \frac{55 Y_p}{(100 - Y_p) (k_n / k_w)} \% \quad 2)$$

т.е. зависи от отношението на константите на аминокислотната спрямо хидролизната реакции k_n / k_w . В зависимост от ензимната нуклеофилна специфичност това отношение варира в различна степен и приема различни стойности [12]. От равенството 2) следва, че при ниска нуклеофилна специфичност (ниска стойност на отношението k_n / k_w), високи препаративни добиви могат да

бъдат получени, използвайки висока нуклеофилна концентрация. По аналогичен начин и при висока нуклеофилна специфичност на ензима, могат да бъдат постигнати високи добиви на целевия краен продукт, използвайки висока електрофилна концентрация и ниска нуклеофилна. При провеждане на реакцията в среда с използване на т. нар. „електрофилен или нуклеофилен басейн“ с едно филтруване на крайния продукт или единия от реагентите, съответно с добавяне на еквивалентни количества от съответните компоненти на втория, както и на следващия цикъл може да се постигне многократен синтез чрез итеративната процедура и с многократно регениране (рециклиране) и използване на ензима (липаза).

Единият от компонентите (електрофилът или нуклеофилът) в зависимост от нуклеофилната специфичност трябва да бъде 8-10 еквивалента спрямо другия компонент.

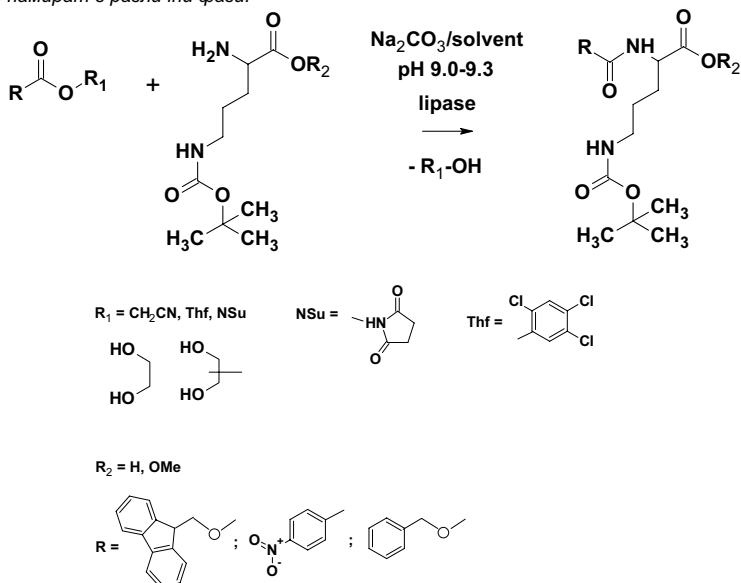


Фиг. 1. Обща схема на итеративната процедура за ензимохимичен семисинтез (N-функционално групова защита на аминокиселините).

Най-успешната комбинация от разтворители зависи от процедурата за защита (синтез), която от своя страна се определя от нуклеофилната специфичност и съответно от вида „басейн“ в зависимост от компонентния излишък. Най-честите комбинации от разтворители, които бяха използвани са комбинация от полярни разтворители с воден разтвор на натриев бикарбонат (pH 9-9.3): DMSO/Na₂CO₃, acetone/Na₂CO₃, CH₃CN/Na₂CO₃, DMF/Na₂CO₃, MeOH/Na₂CO₃, ethylene glycol/Na₂CO₃, propylene glycol/Na₂CO₃, isopropylene glycol/Na₂CO₃ – еднофазова система (когато ензимът е разтворен) [13], както и комбинация от неполярни разтворители с воден разтвор на натриев хидрогенкарбонат (pH 9-9.3): CHCl₃/Na₂CO₃ и CH₂Cl₂/Na₂CO₃ – двуфазова система, или еднофазова: CHCl₃ или CH₂Cl₂ и триетиламин като база (при наличие на имобилизирана липаза) [13]. Вследствие на различните нуклеофилни и електрофилни компоненти се избира и подходът, което следва от различната нуклеофилна специфичност, от което следва изводът, че се използва излишък от нуклеофил („нуклеофилен басейн“) или електрофил („електрофилен басейн“) (Фиг. 2). След протичане на синтеза, в зависимост от използвания ензим (свободна или имобилизирана липаза) се филтруват различни компоненти – в единия случай, при ниска нуклеофилна специфичност и при наличие на карбоксиметиллов естер на аминокиселината (нуклеофила) или на свободна

аминокиселина ($R_2 = \text{Me}, \text{H}$) се филтрува продуктът, докато в разтвора остават ензимът и единият от реагентите, който е в излишък (характеризира и изгражда басейна).

В другия случай при наличие на висока нуклеофилна специфичност и използване на имобилизирана върху силикагелови мъниста липаза - продуктът и ензимът се утаяват и филтруват, а единият от реагентите, който е в излишък и характеризира басейна остава в разтвора. След това следва второ филтруване за отделяне на продукта от ензима и преципитация на продукта из разтвора, а след промиване и регенериране на имобилизираната липаза, тя отново попада в басейна и се включва в следващ цикъл заедно с останалите компоненти. В зависимост от това се избира различна среда (разтворител) и това определя подборянето на комбинативния подход - комбинации както от различни разтворители и излишък от даден компонент, така и различен тип липаза (в разтвор или имобилизирана). Състоянието на липазата характеризира и типа синтез. При използването на разтворена липаза се провежда хомогенен синтез, поради наличието на всичките компоненти на сместа в една фаза. Когато се използва имобилизирана липаза, синтезът вече е хетерогенен, тъй като ензимът и останалите компоненти се намират в различни фази.



Фиг. 2. Схема на синтез на N-защитени производни на аминокиселини. Като аминокиселинна компонента е използван в случая δ -Вос-защитен орнитин: H-Orn(Boc)-OR_2 .

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

Всички реактиви и разтворители са закупени и използвани без последващо допълнително пречистване. Обърнато-фазовите HPLC-анализи са извършени на течен хроматограф "Waters", снабден с абсорбционен детектор модел 441 при дължина на вълната 280 nm и колона Nucleosil 100-5C₁₈ (12.5 cm x 4.6 mm) за аналитични цели. ^1H и ^{13}C NMR спектрите са снети и обработени на Bruker Avance II+ 600MHz spectrometer, използвайки BBO или TBI сондиране и изследване. Химичните отмествания са изразени в единици ppm и константите на спин-спиново взаимодействие са обозначени в Hz. Прецизните определяния на ^1H и ^{13}C NMR спектрите са извършени чрез изчисляване на 2D хомоядрената корелация (COSY), DEPT-135 и 2D обрънатите (противоположните) детектирани хетероядрени (C-H) корелации (HSQC and HMBC). Химичните отмествания са представени в δ (ppm).

Анализът на мултиплетите от първи порядък в ^1H NMR спектрите е ускорен, използвайки програмата FAFOMA [14].

Обща процедура за синтез на N-защитените орнитинови производни.

Към разтвор на 8-10 мола от едната компонента (амино- или ацилна-, в зависимост от нуклеофилната специфичност) и ензима (свободна или имобилизирана липаза*) в подходящия разтворител (карбонатен буфер/органичен разтворител, pH 9.0-9.3) се добавя разтвор на 1 мол от другата (амино- или ацилна-) компонента. Реакцията протича при стайна температура за около 1-12 часа в зависимост от субстрата и ензима, както и нуклеофилната и електрофилна специфичност и условията на протичане на реакцията. След приключване на реакцията (TLC, HPLC) разтворът се филтрува от образувалата се утайка[#] от продукта, която се промива и матерната луга директно се включва в следващия цикъл на процеса, с добавянето на по 1 мол от всеки от реагентите. При използването на имобилизирана липаза (ако се използват CHCl_3 или CH_2Cl_2 като среди и $R_2 = \text{H}$), образувалата се утайка от продукта се филтрува заедно с имобилизираната липаза, след което се промива с CHCl_3 или CH_2Cl_2 , а след това с полярен разтворител или вода. Във водния разтвор (полярния разтворител) попада продуктът, който след подкисляване преципитира и се филтрува, а имобилизираният ензим се включва в нов цикъл, заедно с компонентът от матерната луга и добавячните количества за всеки нов цикъл.

При използването на имобилизирана липаза и среда от полярен разтворител/ Na_2CO_3 , процедурата е същата, но промивките са в обратен ред. При използването на двуфазова система с имобилизирана или свободна липаза (когато $R_2 = \text{H}$, CH_3), в голяма част от случаите не се налага филтруване, а директно промиване на водната фаза и включването ѝ в нов цикъл. Филтруване се изисква само в случай на използване на имобилизирана липаза.

* (При използване на имобилизирана липаза имаме ензимна суспензия).

[#] (Когато $R_2 = \text{H}$, разтворът се подкислява преди да се филтрува).

Fmoc-Orn(Boc)-OH

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , 25°C): δ = 1.369(s, 9H, CH_3), 1.40-1.47(m, 2H, 4- CH_2), 1.52-1.58(m, 1H) and 1.66-1.72(m, 1H, 3- CH_2), 2.906(q, $J=6.5$ Hz, 2H, 5- CH_2), 3.907(ddd, $J=4.6$, 8.0, 13.0 Hz, 1H, 2-CH), 4.21-4.23(m, 1H, 9-CH), 4.25-4.30(m, 2H, OCH_2), 6.816(t, $J=5.5$ Hz, 1H, 5- CH_2NH), 7.329(t, $J=7.4$ Hz, 2H, 2-CH and 7-CH), 7.416(t, $J=7.4$ Hz, 2H, 3-CH and 6-CH), 7.643(d, $J=8.0$ Hz, 1H, 2-CHNH), 7.724(d, $J=7.5$ Hz, 2H, 1-CH and 8-CH), 7.894(d, $J=7.6$ Hz, 2H, 4-CH and 5-CH), 12.578(bs, 1H, COOH).

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6 , 25°C): δ = 26.20(4- CH_2), 28.08(3- CH_2), 28.21(CH_3), 39.97(5- CH_2), 46.57(9-CH), 53.60(2-CH), 65.54(OCH_2), 77.34(C), 120.06 and 120.08(4-CH and 5-CH), 125.23 and 125.25(1-CH and 8-CH), 127.02(2-CH and 7-CH), 127.58(3-CH and 6-CH), 140.64 and 140.66(4a-C and 4b-C), 143.74 and 143.79(8a-C and 9a-C), 155.53 and 156.07(NHCOO), 173.82(COOH). Rf-0.352 (CH_2Cl_2 : CH_3OH -9:1), Rf-0.320 (CH_2Cl_2 : CH_3OH -9.5:0.5). M.p. 113-115°C.

Fmoc-Orn(Boc)-OCH₃

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , 25°C): δ = 1.369(s, 9H, CH_3), 1.39-1.47(m, 2H, 4- CH_2), 1.54-1.60(m, 1H) and 1.65-1.71(m, 2H, 3- CH_2), 2.88-2.93(m, 2H, 5- CH_2), 3.616(s, 3H, OCH_3), 4.009(ddd, $J=4.9$ Hz, $J=7.9$ Hz, $J=9.4$ Hz, 1H, 2-CH), 4.224(t, $J=7.1$ Hz, 1H, 9-CH), 4.295(d, $J=7.1$ Hz, 2H, OCH_2), 6.810(t, $J=5.7$ Hz, 1H, 5- CH_2NH), 7.333(dt, $J=7.4$ Hz, $J=0.9$ Hz, 2H, 2-CH and 7-CH), 7.418(t, $J=7.4$ Hz, 2H, 3-CH and 6-CH), 7.714(dd, $J=7.4$ Hz, $J=2.8$ Hz, 2H, 1-CH and 8-CH), 7.790(d, $J=7.8$ Hz, 1H, 2-CHNH), 7.895(d, $J=7.6$ Hz, 2H, 4-CH and 5-CH).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 25.98(4-CH₂), 27.91(3-CH₂), 28.19(CH₃), 39.97(5-CH₂), 46.56(9-CH), 51.78(OCH₃), 53.56(2-CH), 65.55(OCH₂), 77.37(C), 120.08(4-CH and 5-CH), 125.18(1-CH and 8-CH), 127.01(2-CH and 7-CH), 127.58(3-CH and 6-CH), 140.67(4a-C and 4b-C), 143.69 and 143.74(8a-C and 9a-C), 155.53 and 156.03(NHCOO), 172.82(COOH). Rf=0.878 (CH₂Cl₂:CH₃OH-9:1). Rf=0.652 (CH₂Cl₂:CH₃OH-9.5:0.5). M.p. 119-120°C.

Bz(NO₂)-Orn(Boc)-OH

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 1.362(s, 9H, CH₃), 1.43-1.53(m, 2H, 4-CH₂), 1.69-1.86(m, 2H, 3-CH₂), 2.92-2.96(m, 2H, 5-CH₂), 4.34-4.38(m, 1H, 2-CH), 6.830(t, J=5.8 Hz, 1H, 5-CH₂NH), 8.105(d, J=8.8 Hz, 2H, 3-CH and 5-CH), 8.334(d, J=8.8 Hz, 2H, 2-CH and 6-CH), 8.972(d, J=7.3 Hz, 1H, 2-CH₂NH), 12.71(bs, 1H, COOH).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 26.37(4-CH₂), 27.83(3-CH₂), 28.20(CH₃), 39.35(5-CH₂), 52.68(2-CH), 77.37(C), 123.48(3-CH and 5-CH), 128.92(2-CH and 6-CH), 139.54(1-C), 149.05(4-C), 155.54(NHCOO), 164.90(NHCO), 173.31(COOH). Rf=0.320 (CH₂Cl₂:CH₃OH-9:1). M.p. 97.5 °C.

Bz(NO₂)-Orn(Boc)-OCH₃

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 1.362(s, 9H, CH₃), 1.43-1.53(m, 2H, 4-CH₂), 1.72-1.78(m, 2H, 3-CH₂), 2.92-2.96(m, 2H, 5-CH₂), 3.651(s, 3H, CH₃), 4.42-4.86(m, 1H, 2-CH), 6.829(t, J=5.6 Hz, 1H, 5-CH₂NH), 8.106(d, J=8.8 Hz, 2H, 3-CH and 5-CH), 8.337(d, J=8.8 Hz, 2H, 2-CH and 6-CH), 9.105(d, J=7.3 Hz, 1H, 2-CH₂NH).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 26.14(4-CH₂), 27.67(3-CH₂), 28.19(CH₃), 39.23(5-CH₂), 51.92(OCH₃), 52.68(2-CH), 77.39(C), 123.51(2-CH and 6-CH), 128.96(3-CH and 5-CH), 139.24(1-C), 149.13(4-C), 155.54(NHCOO), 165.00(NHCO), 172.31(COOH). Rf=0.523 (CH₂Cl₂:CH₃OH-9:1). M.p. 88-89°C.

Z-Orn(Boc)-OH

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 1.361(s, 9H, CH₃), 1.45-1.54(m, 2H, 4-CH₂), 1.67-1.81(m, 2H, 3-CH₂), 2.90-2.94(m, 2H, 5-CH₂), 4.11-4.19(m, 2H, OCH₂), 4.33-4.37(m, 1H, 2-CH), 6.832(t, J=5.8 Hz, 1H, 5-CH₂NH), 7.036(t, J=7.5Hz, 1H, 4-CH), 7.691(d, J=8.1 Hz, 2H, 3-CH and 5-CH), 8.229(d, J=7.8 Hz, 2H, 2-CH and 6-CH), 8.971(d, J=7.3 Hz, 1H, 2-CH₂NH), 12.73(bs, 1H, COOH).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 26.33(4-CH₂), 27.81(3-CH₂), 28.21(CH₃), 39.34(5-CH₂), 52.67(2-CH), 77.38(C), 123.47(3-CH and 5-CH), 128.91(2-CH and 6-CH), 139.53(1-C), 149.05(4-C), 155.55(NHCOO), 164.91(NHCO), 173.32(COOH). Rf=0.310 (CH₂Cl₂:CH₃OH-9:1). M.p. 82.5 °C.

Z-Orn(Boc)-OCH₃

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 1.361(s, 9H, CH₃), 1.40-1.49(m, 2H, 4-CH₂), 1.72-1.76(m, 2H, 3-CH₂), 2.91-2.95(m, 2H, 5-CH₂), 3.652(s, 3H, CH₃), 4.396(d, J=7.4Hz, 2H, OCH₂), 4.41-4.87(m, 1H, 2-CH), 6.828(t, J=5.6 Hz, 1H, 5-CH₂NH), 7.132(t, J=7.9Hz, 1H, 4-CH), 7.809(d, J=7.8 Hz, 2H, 3-CH and 5-CH), 8.233(d, J=8.1 Hz, 2H, 2-CH and 6-CH), 9.109(d, J=7.3 Hz, 1H, 2-CH₂NH).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 26.13(4-CH₂), 27.66(3-CH₂), 28.18(CH₃), 39.21(5-CH₂), 51.93(OCH₃), 52.67(2-CH), 77.38(C), 123.53(2-CH and 6-CH), 128.95(3-CH and 5-CH), 139.23(1-C), 149.13(4-C), 155.56(NHCOO), 165.01(NHCO), 172.32(COOH). Rf=0.543 (CH₂Cl₂:CH₃OH-9:1). M.p. 78-79°C.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успешно е приложен комбинативния подход за ефективна и селективна итеративна процедура за ензимо-химична защита на алфа-амино групата на функционални аминокиселини. Като катализатор беше използван ензимът липаза в среда от различни разтворители и наличие на "нуклеофилен басейн" или "електрофилен басейн" в зависимост от нуклеофилната и електрофилна специфичност на ензима спрямо реагентите. При използването на разтворима липаза беше приложен т. нар. хомогенен синтез, докато хетерогенният синтез беше осъществен с помощта на липаза, имобилизирана върху силикагелни частици. Методът позволява както многократно използване на ензима, без допълнително регенериране, така и изключително меки условия на провеждане на реакцията, високи добиви (100%) и чистота на получените продукти, така и висока селективност и специфичност на протичащата реакция. По този начин се благоприятства рутинното получаване на N-защитени аминокиселинни производни нужни за пептидният синтез.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Stewart, J.M., Young, J.D., In: Solid phase peptide synthesis, Second edition, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, USA, 1984.
- [2] Bodanszky, M., Bodanszky, A. In: The Practice of Peptide Synthesis, Akademie-Verlag: Berlin, 1985.
- [3] Gross, E., Meienhofer, J., Johnes, G., Bodanszky, M., Reach, D., Singh, J., Kemp, In: The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol.1: Major Methods of Peptide Bond Formation, Academic press, New York, 1979.
- [4] Jones, J., In: The chemical synthesis of peptides, Clarendon press, Walton street, Oxford, 1991.
- [5] Bayryamov, S.G., Rangelov, M.A., Mladjova, A.P., Yomtova, V.M., Petkov, D.D. J. Am. Chem. Soc., 2007, 129 (18), 5790-5791.
- [6] Bayryamov, S.G., Vassilev, N.G., Rangelov, M.A., Mladjova A.P. and Petkov, D. D., Protein and Peptide Letters, 2009, 16 (4), 392-401.
- [7] Gait, M.J. Oligonucleotide synthesis. A practical approach. IRL Press, Oxford, Washington DC, 1983.
- [8] Glass, D., J. Enzyme Microb. Technol., 1981, 3, 4-6.
- [9] Kullmann, W., J. Biol. Chem., 1980, 255, 8234-8238.
- [10] Kuhl, P., Konnecke, A., Doring, G., Daumer, H. And Jakubke, H.D., Tetrahedron Lett., 1981, 21, 524-527.
- [11] Oyama, K., Nishimura, S., Nonaka, Y., Kihara, K. and Hashimoto, T., J. Org. Chem., 1981, 46, 5242-5244.
- [12] Petkov, D.D. and Stoineva, I.B., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984, 118, 317-323.
- [13] Drescher, M., Li, Y. F., Hammerschmidt, F. Tetrahedron., 1995, 51 (17), 4933-4946.
- [14] Vassilev, N.G., Bulg. Chem. Commun., 2005, 37 (4), 256-259.

За контакти:

Асистент д-р Станислав Георгиев Байрямов, катедра "Ремонт, надеждност и химични технологии", Аграрно-Индустириален Факултет, Русенски университет "Ангел Кънчев", Тел.: 082/ 888 581, 888 766, e-mail: sbayryamov@ru.acad.bg.

Докладът е рецензиран.



РУСЕНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „АНГЕЛ КЪНЧЕВ”
UNIVERSITY OF RUSE „ANGEL KANCHEV“

ДИПЛОМА

**Програмният комитет на
Научната конференция RU&SU'09
награждава с КРИСТАЛЕН ПРИЗ
“THE BEST PAPER”**

д-р СТАНИСЛАВ БАЙРЯМОВ
автор на доклада

**Комбинативен подход за ефективна и селективна итеративна
процедура за ензимо-химична защита на алфа аминокгрупата на
функционални аминокиселини, използвайки ензима
липаза. Хомогенен и хетерогенен синтез**

DIPLOMA

**The Programme Committee of
the Scientific Conference RU&SU'09
Awards the Crystal Prize
"THE BEST PAPER"**

to Dr. STANISLAV BAYRYAMOV
author of the paper

**A combinative approach for effective and selective iterative
procedure for enzyme-chemical protection of alfa amino
group of the functional aminoacids, using lipase as
enzyme. Homogeneous and heterogeneous synthesis"**

РЕКТОР
RECTOR

проф. д.т.н. Христо Белоев
Prof. DSc Hristo Beloev

30.10.2009