

(11) Patent numeris: 3114

(51) Int.Cl.⁵: C12P 17/12,
C12N 9/02,
C07D 213/79

(21) Paraiškos numeris: IP377

(22) Paraiškos padavimo data: 1993 03 03

(41) Paraiškos paskelbimo data: 1994 06 15

(45) Patent paskelbimo data: 1994 12 25

(31,32,33) Prioritetas: 672/92, 1992 03 04, CH

(72) Išradėjas:

Andreas Kiener, CH
Andreas Tschech, CH
Andreas Tinschert, CH
Klaus Heinzmann, CH

(73) Patent savininkas:

LONZA AG, Gampel/Wallis, 4002 Basel, CH

(74) Patentinis patikėtinis:

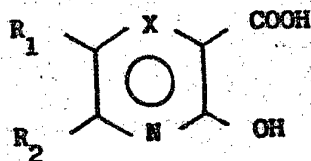
Liudmila Gerasimovič, 9, J.Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Azotą turinčių heterociklinių karboninių rūgščių mikrobiologinis hidroksilinimo būdas

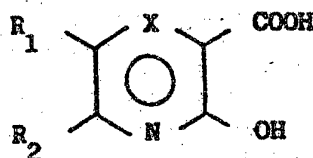
(57) Referatas:

Išradimas aprašo naują mikrobiologinį būdą, skirtą gaminti azotą turinčias hidroksi-heterociklines karbonines rūgštis arba jų tirpias druskas, kurių bendroji formulė yra



pradedant nuo atitinkamų azotą turinčių heterociklinių karboninių rūgščių, bei naujus šiam būdui tinkamus mikroorganizmus.

Išradime aprašomas naujas mikrobiologinis būdas, skirtas gaminti azotą turinčias hidroksiheterociklines karbonines rūgštis arba jų tirpias druskas, kurių bendroji formulė



I,

pradedant nuo atitinkamų azotą turinčių heterociklinių karboninių rūgščių, bei šiam būdai tinkami nauji mikroorganizmai.

Azoto turinčiomis heterociklinėmis karboninėmis rūgštimis, kurios gali būti hidroksilintos ar nehidroksilintos, taip pat laikomos ir jų tirpios druskos, pavyzdžiui, šarminės arba amonio druskos.

Azoto turinčios 2-hidroksi-heterociklinės karboninės rūgštys yra svarbūs biologiškai aktyvių medžiagų sintezės tarpiniai produktai. Pavyzdžiui, 2-hidroksinikotino rūgštis yra pradinė medžiaga 2-chlornikotino rūgšties (US-PS 4 081 451) gamybai, kuri yra svarbus tarpinis produktas, skirtas gaminti vaistus. (Ann. Pharm. Fr., 1980, 38(3), 243-252).

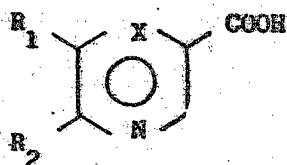
Ligšiol azotą turinčių hidroksi-heterociklinių karboninių rūgščių mikrobiologiniai gamybos būdai nežinomi.

Šio išradimo tikslas buvo sukurti paprastą ir ekologiškai švarų mikrobiologinį būdą cheminiu požiūriu sunkiai prieinamos azotą turinčios 2-hidroksiheterociklinės karboninės rūgšties gamybai.

Šis tikslas buvo pasiektas išradime aprašytu būdu pagal išradimo apibrėžties 1 punktą, naudojantis naujais mikroorganizmais pagal išradimo apibrėžties 6 punktą.

- 5 Pagal šį išradimą šio būdo esmė yra tai, kad azotą turinti heterociklinė karboninė rūgštis, formulės

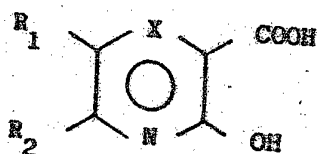
10



II,

- 15 kurioje R_1 ir R_2 yra tokie patys arba skirtingi ir reiškia vandenilio atomą, halogeno atomą arba C_1 - C_4 -alkilinę grupę, o X - azoto atomą arba CR_3 funkciją, kur R_3 reiškia vandenilio arba halogeno atomą, yra 6-metilnikotino rūgštį naudojančių mikroorganizmų, turinčių specifinę hidroksilazę, substratas, kuris
- 20 paverčiamas į azotą turinčią hidroksi-heterociklinę karboninę rūgštį, kurios bendra formulė yra

25



I,

kurioje R_1 , R_2 ir X turi minėtas reikšmes.

30

Sąvoka "6-metilnikotino rūgštį naudojančys mikroorganizmai, turintys specifinę hidroksilazę" reiškia:

35

jei pavyzdžiui, išvalytų nutekamųjų vandenų inokuliate su 6-metilnikotino rūgštimi auginti biomasę, tai gaunami 6-metilnikotino rūgštį naudojančys mikroorganizmai, kurie auga naudodami 6-metilnikotino rūgštį

5 kaip vienintelį anglies, azoto bei energijos šaltinį. Jei pagal įprastinius, specialistų taikomus metodus selekcionuoti mikroorganizmus, kurie 6-metilnikotino rūgštį per 2-hidroksi-6-metilnikotino visiškai suskaldo kaip tarpinį produktą, tai gaunami mikroorganizmai, turintys specifinę hidroksilazę, t.y., mikroorganizmai, kurie hidroksilina specifinį tarp rūgštinės funkcijos ir azoto atomo esantį vienintelį anglies atomą.

10 Iš esmės metodui tinka visi mikroorganizmai, kurie selekcionuojami pagal šį principą, pavyzdžiui, iš valytų nutekamųjų vandenų arba iš dirvožemio mėginių. Šie mikroorganizmai neaprašyti literatūroje ir yra šio išradimo sudėtinė dalis.

15 Šiam būdai tikslinga naudoti mikroorganizmus, žymimus Ki 101 (DSM 6920), taip pat jų palikuonis bei mutantus. Jie yra 1992. 03. 25 deponuoti firmoje Deutsche Sammlung fuer Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, 20 Mascheroderweg 1b, D-3300 Braunschweig.

Mokslinis Ki 101 (DSM 6920) aprašymas:

Ląstelių forma	mažytės lazdelės
Plotis milimikronais	0.4-0.5
Ilgis milimikronais	1.0-1.5
Judrumas	-
Ūseliai	-
Gram-reakcija	-
Lizavimas 3% KOH	+
Amino-peptidazė (Cerny)	+
Sporos	-
Oksidazė	+
Katalazė	+

25 Atliekant 16S rRNA sekos analizę, rūšis nebuvo nustatyta.

Šių mikroorganizmų selekcija ir auginimas, naudojant 6-metilnikotino rūgštį, atliekama pagal įprastus, specialistų taikomus metodus.

- 5 Selekcijos metu tikslingai vyksta mikroorganizmų skriningas aerobinėmis sąlygomis.

Pirmenybė teikiama mikroorganizmų auginimui skriningo metodu ramybės būsenoje (nepurtant).

10

Selekcijos ir auginimo metu naudojamos 6-metilnikotino rūgšties kiekis yra iki 1 svorio %, labiau tinka kiekis iki 0,5 svorio %.

15

Selekcija ir auginimas vyksta esant pH nuo 5 iki 9, ypač tinka reikšmės nuo 6 iki 8.

Selekcijos ir auginimo metu temperatūra turi būti tarp 15 ir 50°C, ypač tinka temperatūra tarp 25 ir 40°C.

20

Paprastai selekcija ir auginimas vyksta mineralinių druskų terpėje, labiau tinka tokia mineralinių druskų terpė, kurios sudėtis aprašyta lentelėje I.

25

Jei pasiektas tikslinis optinis tankis esant 650 nm (OD_{650}) nuo 0,5 iki 100, tai mikroorganizmai gali būti surinkti arba įprastiniais specialistų naudojamais metodais, arba substratas, azoto turinti heterociklinė karboninė rūgštis, tiesiogiai pridedama prie

30

mikroorganizmų, kad vyktų norima reakcija (biotransformacija).

Norima biotransformacija tada vyksta pagal įprastus, specialistų taikomus metodus su neaugančiomis

35

ląstelėmis.

Substratai, kurių bendroji formulė II, gali, pavyzdžiui, būti nikotino rūgštis, pirazinkarboninė rūgštis arba jų halogeniniai arba alkilinti C_1 - C_4 dariniai.

5

Halogenintų nikotino rūgšties arba pirazino karboninės rūgšties darinių tarpe ypač tinka hidroksilininiai 6-chlor-nikotino rūgštis, 5,6-dichlor-nikotino rūgštis ir 5-chlor-pirazinkarboninė rūgštis.

10

C_1 - C_4 Pirazinkarboninės rūgšties darinių tarpe ypač hidroksilininiai tinka 5-metilpirazinkarboninė rūgštis.

15

Substratas į biotransformacijos mišinį gali būti dedamas nuolatos arba vienu kartu. Tikslinga substratą dėti taip, kad jo koncentracija maitinamoje terpėje neviršytų 10 svorio %, o ypač 7 svorio %.

20

Biotransformacijai naudotinos įprastinės, specialistų naudojamos terpės. Ypač tinkamas biotransformacijai žemo molingumo fosfatinis buferis.

25

Paprastai biotransformacija atliekama naudojant mikroorganizmų suspensiją, kurios optinis tankis esant 650 nm (OD_{650}) yra nuo 0,5 iki 100, ypač tinka optinis tankis nuo 5 iki 50.

30

Biotransformacija vyksta esant temperatūrai nuo 15 iki 50°C, ypač tinka temperatūra nuo 25 iki 35°C, esant pH nuo 5 iki 9, ypač tinka pH nuo 6,5 iki 7,5.

35

Po įprastinės transformacijos trukmės nuo 5 valandų iki 3 dienų, hidroksilintas produktas, turintis formulę I, gali būti išskirtas taikant įprastinius specialistų naudojamus metodus, pavyzdžiui, parūgštinant steriliu supernatantu.

Pagal šį metodą pagamintos literatūroje neaprašytos azoto turinčios hidroksi-heterociklinės karboninės rūgštys, kurių bendra formulė yra



kurioje, tuo atveju, kai X yra azoto atomas, R₁ ir R₂ yra vienodi arba skirtingi ir gali būti vandenilis, halogenas arba C₁-C₄-alkilinė grupė, tačiau išimti sudaro tai, kad R₁ ir R₂ vienu metu negali būti vandenilis, taip pat jei X reiškia CH funkciją, R₁ ir R₂ reiškia halogeno atomą.

15 Ypač tinkami šių naujų junginių atstovai yra 5,6-dichlor-2-hidroksi-nikotino rūgštis, 3-hidroksi-5-metil-pirazinkarboninė rūgštis ir 3-hidroksi-5-chlor-pirazinkarboninė rūgštis.

20

Pavyzdys 1

Mikroorganizmų, naudojančių 6-metil-nikotino rūgštį, išskyrimas

25

300 ml talpos Erlenmejerio kolba buvo pripildyta 100 ml mineralinių druskų terpės su 1 mmol 6-metilnikotino rūgšties (1 lentelė) ir sumaišyta su 10 ml valytų nutekamųjų vandenų, paimtų iš firmos LONZA AG Vispe, Šveicarijoje, arba LONZA gamyklos grunto mėginiais, Vispe ir statiskai inkubuota esant 30°C temperatūrai. Po 10 dienų kai kuriuose mėginiuose spektrofotometrinio būdu buvo aptikta 2-hidroksi-6-metilnikotino rūgštis. Šios kultūros vėliau buvo keletą kartų persėtos į šviežią mineralinių druskų terpę. Po to 2-hidroksi-6-metilnikotino rūgštį gaminančių ląstelių suspensijos buvo persėtos į tą pačią terpę, turinčią 1,6 % (s/t)

agaro. Po to agaro lėkštelės esant 30°C buvo inkubuotos atmosferoje, turinčioje 4 % O₂ ir 96 % N₂. Tada pavienės kolonijos perkeltos į skystą terpę ir inkubuotos statiškoje būklėje. Bakterijų štamas, žymimas Kil01 (DSM 6920), augimo metu 6-metil-nikotino rūgštį pavertė 2-hidroksi-6-metil-nikotino rūgštimi.

Pavyzdys 2

10 Nikotino rūgšties mikrobinė oksidacija į 2-hidroksi-nikotino rūgštį

Mikroorganizmai, žymimi Kil01 (DSM 6920), buvo inkubuoti 800 ml mineralinių druskų terpėje (lentelė I), pridedant 8 mmol 6-metil-nikotino rūgšties 1 l talpos Fernbacho kolboje, esant 30°C temperatūrai, purtyklėje, esant 100 rpm. Inokuliatas sudarė 5% (t/t). Po 5 dienų OD₆₅₀ siekė apie 0,5. Po to lėstelės surinktos ir vieną kartą praplautos 50 molių fosfatinio buferio (pH 7.0).

Tada lėstelės buvo resuspenduotos 20 ml 50 mM fosfatinio buferio, esant pH 7.0, kuriame yra 200 mg (1.38 mmol) nikotino rūgšties natrio druskos. OD₆₅₀ buvo lygu 20. Po 6 val. trukusios inkubacijos purtyklėje prie 30°C, atlikus plonasluoksne chromatografiją, nikotino rūgšties nerasta. Po to biomasė nucentrifuguota ir supernatantas parūgštintas iki pH 2.5, siekiant išsodinti 2-hidroksi-nikotino rūgštį.

30 Atlikus ¹H-NMR (DMSO) analizę, išskirtame produkte nerasta priemaišų. Iš viso buvo išskirta 140 mg (1 mmol) 2-hidroksinikotino rūgšties, tai atitinka 72% išeigą, skaičiuojant pagal nikotino rūgštį.

35

Lentelė 1

Mineralinių druskų terpės tirpalai

Koncentruotas tirpalas I:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	156.0 g
NH_4Cl	10.0 g
K_2SO_4	1.2 g
pH (koreguojama KOH iki)	7.0
Dist. vanduo	500.0 ml

5

Koncentruotas tirpalas II:

p-amino benzoinė rūgštis	8.0 mg
D-biotinas	2.0 mg
Nikotino rūgštis	20.0 mg
Ca-D-pantotenas	10.0 mg
Piridoksalhidrochloridas	30.0 mg
Tiamindichloridas	20.0 mg
Ciankobalaminas	10.0 mg
Dist. vanduo	100.0 ml, steriliai filtruoti

Koncentruotas tirpalas III:

10

HCl (37%)	7.0 ml
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.5 g
ZnCl_2	0.07g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
H_3BO_3	0.006 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.19 g
$\text{CuCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.002 g
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.024 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.036 g
Dist. vanduo	1000.0 ml, autoklavuoti prie 121°C, 20 min.

Koncentruotas tirpalas IV:

NaOH	0.5 g
Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	0.003 g
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0.004 g
Dist. vanduo	1000.0 ml, autoklavuoti prie 121°C, 20 min.

Koncentruotas tirpalas V:

5

MgCl ₂ ·6H ₂ O	40.0 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	5.0 g
Dist. vanduo	200.0 ml, autoklavuoti prie 121°C, 20 min.

6-metil-nikotino rūgštis (500 mM)

6-metil-nikotino rūgšties Na druska	80.0 g
Dist. vanduo	1000.0 ml, autoklavuoti prie 121°C 20 min.

10 Augimo terpė 10 mM 6-metil-nikotino rūgšties

Tirpalas I	25.0 ml
6-metil-nikotino rūgštis	20.0 ml
Dist. vanduo	1000.0 ml, autoklavuoti prie 121°C 20 min.

Po sterilizacijos pridėdama

Tirpalas I	0.5 ml
Tirpalas III	1.0 ml
Tirpalas IV	1.0 ml
Tirpalas V	0.5 ml

Lentelė 2:Pavyzdžiai 3-7

5. Pavyzdžiai 3-7 atitinka aprašytąjį 2 pavyzdį. Apibendrinti rezultatai pateikti lentelėje 2.

Pvz.	Pradinė medžiaga	Konc.	OD ₆₅₀ nm	Laikas (h)	Produktas	Išeiga
3	6-chlor-nikotino rūgšties natrio druska	1%(s/t)	20	16	6-chlor-2-hidroksinikotino rūgštis	70% (gauta)
4	5,6-dichlor-nikotino rūgšties natrio druska	1%(s/t)	20	16	5,6-dichlor-2-hidroksinikotino rūgštis	20% (analit.)
5	Pirazinkarboninės rūgšties natrio druska	0,3% (s/t)	5	24	3-hidroksi-pirazinkarboninė rūgštis	70% (analit.)
6	5-metil-pirazinkarboninės rūgšties natrio druska	0,3% (s/t)	5	24	3-hidroksi-5-metil-pirazinkarboninė rūgštis	80% (analit.)
7	5-chlor-pirazinkarboninės rūgšties natrio druska	0,3% (s/t)	5	24	3-hidroksi-5-chlor-pirazinkarboninė rūgštis	50% (analit.)

Analitiniai duomenys pavyzdžiui 6:

(3-hidroksi-5-metil-pirazinkarboninė rūgštis)

5 $^1\text{H-NMR}$: (DMSO, 400 MHz) cheminiai poslinkiai (m.d.)

2.4, s; 2.6, s; 3.8, s; 7.8, s.

10 $^{13}\text{C-NMR}$: (DMSO, 100,5 MHz) cheminiai poslinkiai (m.d.)

20, t; 40, m; 130, s; 134, s; 155, s; 164, s; 170, s.

Analitiniai duomenys 7 pavyzdžiui:

15 (3-hidroksi-5-chlor-pirazinkarboninė rūgštis)

$^1\text{H-NMR}$: (D_2O ir dioksanas, 400 MHz) cheminiai poslinkiai (m.d.)

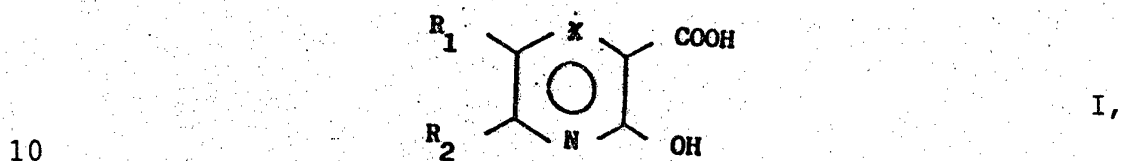
20 3.8, s; 4.7, s; 8.0, s.

$^{13}\text{C-NMR}$: (D_2O ir dioksanas, 100.5 MHz) cheminiai poslinkiai (m.d.)

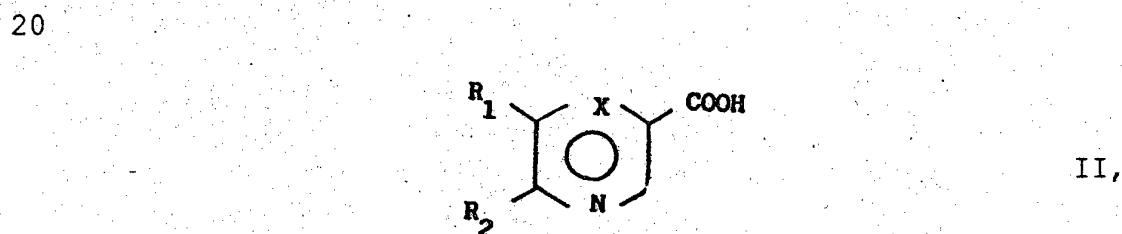
25 132, s; 133, s; 149, s; 164, s; 172, s.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Mikrobiologinis būdas, skirtas gaminti azotą turinčias hidroksi-heterociklines karbonines rūgštis ar jų tirpias druskas, kurių bendroji formulė



kurioje R_1 ir R_2 yra vienodi arba skirtingi ir reiškia vandenilio atomą, halogeno atomą arba C_1 - C_4 -alkilo grupę, o X - azoto atomą arba CR_3 funkciją, kur R_3 reiškia vandenilį arba halogeno atomą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad azotą turinti heterociklinė karboninė rūgštis ar jos tirpios druskos, kurių bendroji formulė yra

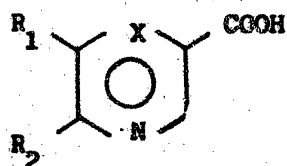


25

kurioje R_1 , R_2 ir X turi minėtas reikšmes, yra 6-metilnikotino rūgštį naudojančių mikroorganizmų, turinčių specifinę hidroksilazę, substratas, kuri paverčia į produktą, turintį formulę I.

35

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad substratu naudoja azotą turinčias heterociklines karbonines rūgštis, kurių bendroji formulė yra



II,

5

kurioje R_1 ir R_2 yra vienodi arba skirtingi ir reiškia vandenilio atomą, chloro atomą arba metilo grupę, o X reiškia azoto atomą arba CH.

10

3. Būdas pagal bent vieną iš 1 arba 2 punkto, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad transformacijai naudoja mikroorganizmus Ki 101 (DSM 6920) arba jų ipėdinius ar mutantus.

15

4. Būdas pagal bent vieną iš 1-3 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad transformaciją vykdo pridėdant substrato vieną kartą ar nuolatos taip, kad substrato koncentracija kultūrinėje terpėje neviršytų 10 svorio procentų.

20

5. Būdas pagal bent vieną iš 1-4 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad transformaciją vykdo esant temperatūrai nuo 15 iki 50 C, o pH - nuo 5 iki 9.

25

6. Mikroorganizmai, kurie yra taip atrinkti, kad jie kaip vieningą anglies, azoto ir energijos šaltinį naudoja 6-metilnikotino rūgštį, paversdami ją 2-hidroksi-6-metilnikotino rūgštimi.

30

7. Mikroorganizmai pagal 6 punktą, žymimi Ki101 (DSM 6920), taip pat jų ipėdiniai bei mutantai.

35

8. Azoto turinčios hidroksi-heterociklinės karboninės rūgštys, kurių bendroji formulė



I,

5

kurioje, tuo atveju, kai X yra azoto atomas, R_1 ir R_2 yra vienodi arba skirtingi ir gali būti vandenilis, halogenas arba C_1 - C_4 -alkilo grupė, tačiau išimti sudaro tai, kad R_1 ir R_2 vienu metu negali būti vandenilis, taip pat jei X reiškia CH funkciją, R_1 ir R_2 reiškia chloro atomą.

15 9. 5,6-Dichlor-2-hidroksi-nikotino rūgštis.

10. 3-Hidroksi-5-metil-pirazinkarboninė rūgštis.

11. 3-Hidroksi-5-chlor-pirazinkarboninė rūgštis.