



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12P 11/00 // (C12P 11/00, C12R 1:01, 1:05)</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 96/09403</b></p> <p>(43) Date de publication internationale: 28 mars 1996 (28.03.96)</p>						
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01196</p> <p>(22) Date de dépôt international: 19 septembre 1995 (19.09.95)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité:</p> <table border="0"> <tr> <td>94/11301</td> <td>22 septembre 1994 (22.09.94)</td> <td>FR</td> </tr> <tr> <td>95/02615</td> <td>7 mars 1995 (07.03.95)</td> <td>FR</td> </tr> </table> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE [FR/FR]; 42, avenue Aristide-Briand, F-92160 Antony (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): FAVRE-BULLE, Olivier [FR/FR]; 22, rue du Père-Chevier, F-69007 Lyon (FR). BONTOUX, Marie-Claude [FR/FR]; "Le Village", F-38200 Luzinay (FR). LARGEAU, Denis [FR/FR]; Résidence Les Coteaux, Route du Bâtard, F-69440 Taluyers (FR). ARIAGNO, André [FR/FR]; 11, allée des Jardins-des-Hespérides, F-69340 Francheville (FR).</p> <p>(74) Mandataire: LE PENNEC, Magali; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).</p>		94/11301	22 septembre 1994 (22.09.94)	FR	95/02615	7 mars 1995 (07.03.95)	FR	<p>(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG).</p> <p><b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>
94/11301	22 septembre 1994 (22.09.94)	FR						
95/02615	7 mars 1995 (07.03.95)	FR						
<p>(54) Title: ENZYMATIC HYDROLYSIS OF 4-METHYLTHIOBUTYRONITRILES</p> <p>(54) Titre: HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES 4-METHYLTHIOBUTYRONITRILE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A novel method for the enzymatic hydrolysis of 4-methylthiobutyronitriles into racemic 4-methylthiobutyric acid using a nitrilase of <i>Alcaligenes faecalis</i>, <i>Rhodococcus sp.</i> HT 29-7 or <i>Gordona terrae</i>.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne un nouveau procédé d'hydrolyse enzymatique des 4-méthylthiobutyronitrile en acide 4-méthylthiobutyrique racémique à l'aide d'une nitrilase d'<i>Alcaligenes faecalis</i>, <i>Rhodococcus sp.</i> HT 29-7 ou de <i>Gordona terrae</i>.</p>								

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

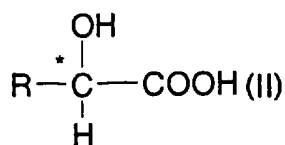
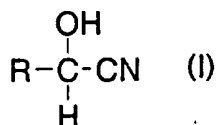
AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

## HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES 4-METHYLTHIOBUTYRONITRILE

La présente invention concerne l'utilisation d'une nitrilase comme catalyseur d'hydrolyse d'un groupe nitrile en groupe carboxylique. Elle concerne plus précisément l'utilisation de la nitrilase choisie parmi les nitrilases des micro-organismes du genre *Alcaligenes*, *Rhodococcus* ou *Gordona* et plus précisément d'*Alcaligenes faecalis* déposée sous le numéro ATCC 8750, de *Rhodococcus sp.* HT 29-7 déposée sous le numéro FERM BP-3857 ou de *Gordona terrae* MA-1 déposée sous le numéro FERM BP-4535.

10 La nitrilase d'*Alcaligenes faecalis* est décrite par exemple dans les brevets européens et japonais publiés sous les numéros respectifs EP 348 901 et JP 03 224 496, tous deux appartenant à la société ASAHI. Dans ces brevets, et particulièrement dans le brevet européen, la nitrilase est utilisée pour produire à partir de nitriles racémiques des acides optiquement  
15 actifs. Les nitriles préférés de départ sont  $\alpha$  substitués et comportent une chaîne alkyle contenant de préférence 1 à 3 atomes de carbone ou un radical aromatique. L'exemple 11 du brevet européen sus mentionné décrit l'hydrolyse du mandélonitrile racémique par *Alcaligenes faecalis*, l'acide mandélique R-(-) est obtenu avec un excès énantiomérique de 91 %. Le  
20 brevet européen 486 289 et son équivalent américain le brevet US 5 326 702 de la société NITTO CHEMICAL décrivent l'utilisation d'*Alcaligenes sp* BC35-2 (FERM No 11265 ou FERM-BP-3318) pour hydrolyser le mandélonitrile en présence d'un sulfite, l'acide mandélique est obtenu dans ce cas avec un excès énantiomérique d'environ 98%.

25 Le brevet JP 04 341 185 de la société ASAHI décrit encore la préparation et l'utilisation de la nitrilase d'*Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 pour résoudre les problèmes de préparation de composés optiquement purs à partir de leur nitrile racémique. La nitrilase énantiosélective décrite dans le brevet japonais ci-dessus référencé est capable plus préférentiellement  
30 d'hydrolyser les 2-hydroxynitrile de formule générale (I) suivante en acide 2-hydroxycarboxylique de formule (II) suivante :



dans lesquelles R représente un groupe aryle éventuellement substitué ou un  
groupe hétérocyclique éventuellement substitué. Il est indiqué dans ce brevet  
5 que l'hydrolyse du nitrile de l'acide mandélique par ladite nitrilase permet  
d'obtenir 100 % d'excès énantiomérique en acide R-(-) mandélique. Il est  
indiqué dans l'exemple 5 que ladite nitrilase peut être utilisée pour hydrolyser  
des nitriles aliphatiques comme le valéronitrile, l'acrylonitrile, les  
2-halogénopropionitriles, le chloroacétonitrile. Rien n'est précisé en ce qui  
10 concerne l'énantiosélectivité de cette hydrolyse sur les nitriles aliphatiques  
ayant un centre d'asymétrie.

Ce texte précise aussi que la nitrilase d'*Alcaligenes faecalis* présente  
un optimum d'activité à un pH compris entre 6.5 et 8.0, la température de  
mise en oeuvre de la dite enzyme doit toujours, selon cette référence, être  
15 située en-dessous de 45°C.

Il est apparu de façon tout à fait étonnante que ladite enzyme  
d'*Alcaligenes faecalis* ATCC 8750, lorsqu'elle était utilisée pour hydrolyser le  
4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile, réalisait cette hydrolyse sans aucune  
sélectivité du point de vue de la pureté optique. Cette enzyme hydrolyse ledit  
20 nitrile en produisant un mélange racémique des deux acides sans aucune  
prépondérance de l'un ou de l'autre des isomères.

La nitrilase de *Rhodococcus sp.* HT 29-7 déposée sous le numéro  
FERM BP-3857 est décrite par exemple dans les brevets européen et  
américain publiés sous les numéros respectifs EP 610 049 et US 5 296 373,  
25 tous deux appartenant à la société NITTO.

Dans ces brevets, et particulièrement dans le brevet américain, la  
nitrilase est utilisée pour produire à partir de nitriles racémiques porteur d'un  
groupe phényl des acides optiquement actifs. Les nitriles de départ

comportent tous un radical aromatique, il s'agit essentiellement de l'hydrolyse du mandélonitrile ou de ses dérivés substitués sur le noyau aromatique. L'exemple 1 du brevet américain sus mentionné décrit l'hydrolyse du mandélonitrile racémique par Rhodococcus sp. HT 29-7, l'acide mandélique  
5 R-(-) est obtenu avec un excès énantiomérique de 100 %. L'exemple 2 décrit l'hydrolyse des dérivés substitués du mandélonitrile sur le noyau, l'excès énantiomérique en dérivé de l'acide mandélique est aussi de 100 %, il en est de même lorsque l'hydrolyse est réalisée sur les nitriles du benzaldéhyde.

Le brevet européen 610 049 de la société NITTO CHEMICAL décrit  
10 l'utilisation de Rhodococcus sp. HT 29-7 (FERM BP-3857), d'Alcaligenes sp. BC35-2 (FERM BP-3318) ou de Brevibacterium acetylicum IAM 1790 pour hydrolyser des  $\alpha$  hydroxy nitriles substitués en position  $\gamma$  par un noyau aromatique en acide  $\alpha$  hydroxycarboxylique substitué par un groupe phényle optiquement actif. Les acides obtenus avec Rhodococcus sp.  
15 HT 29-7 présentent toujours un excès énantiomériques variable selon le nitrile de départ et selon la présence ou l'absence d'acide phosphorique (pH fixé aux environs de 8,2).

Il est apparu de façon tout à fait étonnante que ladite enzyme de  
Rhodococcus sp. HT 29-7 (FERM BP-3318), lorsqu'elle était utilisée pour  
20 hydrolyser le 4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile, réalisait cette hydrolyse sans aucune sélectivité du point de vue énantiomérique. Cette enzyme hydrolyse ledit nitrile en produisant un mélange racémique des deux acides sans aucune prépondérance de l'un ou de l'autre des isomères.

La nitrilase de Gordona terrae MA-1 déposée sous le numéro FERM  
25 BP-4535 est décrite dans le brevet européen 0 610 048 pour hydrolyser des nitriles porteurs en  $\gamma$  d'un groupe phényl et en  $\alpha$  d'un groupe hydroxy en acide correspondant optiquement actif. L'excès énantiomérique varie dans tous les exemples entre 92 et 100%.

Il est apparu de façon tout à fait étonnante que ladite enzyme de  
30 Gordona terrae MA-1 déposée sous le numéro FERM BP-4535, lorsqu'elle était utilisée pour hydrolyser le 4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile, réalisait cette hydrolyse sans aucune sélectivité du point de vue énantiomérique.

Cette enzyme hydrolyse ledit nitrile en produisant un mélange racémique des deux acides sans aucune prépondérance de l'un ou de l'autre des isomères.

La présente invention concerne donc un procédé de préparation d'acides 4-méthylthio butyrique  $\alpha$  substitués racémiques par hydrolyse des  
5 4-méthylthio butyronitrile  $\alpha$  substitués racémiques par la nitrilase d'un des microorganismes suivants: *Alcaligenes faecalis* déposé sous le numéro ATCC 8750, *Rhodococcus sp.* HT 29-7 déposée sous le numéro FERM BP-3857 ou de *Gordona terrae* MA-1 déposée sous le numéro FERM BP-4535.

10 Selon le procédé de l'invention, le micro-organisme peut être utilisé tel quel ou immobilisé sur des supports bien connus de l'homme de l'art.

Par ailleurs l'information génétique qui code pour l'enzyme peut être transférée du micro-organisme parental (tel que *A. faecalis* ATCC8750...) vers un micro-organisme tel que *Bacillus subtilis*.

15 Une variante du procédé de l'invention consiste à mettre en oeuvre en quantité correspondante, à la place d'un micro-organisme, son enzyme libre ou immobilisée, celle-ci étant totalement ou partiellement purifiée.

On préfère parmi les 4-méthylthio butyronitriles  $\alpha$  substitués utiliser le  
20 4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile qui permet de préparer l'hydroxyanalogue de la méthionine racémique. Cette technologie de préparation des dérivés de la méthionine permet d'éviter la formation de produits secondaires minéraux en quantités importantes dont les rejets posent de plus en plus de problèmes à cause des contraintes en ce qui concerne la protection de l'environnement.

25 Ces enzymes présentent dans le cadre de la présente invention une activité nitrilase dans une zone de pH comprise entre 4 et 11 et un optimum d'activité à un pH compris entre 5 et 9. Leur température optimale de mise en oeuvre est comprise entre 30 et 60°C, on préfère néanmoins les utiliser entre 30 et 50°C.

30 On préfère travailler avec une concentration en nitrile dans la solution de départ comprise entre 10 mmoles et 400 mmoles par litre et de

préférence entre 50 et 200 mmoles par litre. La concentration en sel d'ammonium de l'acide obtenu a peu d'influence sur l'activité de l'enzyme lorsqu'elle est inférieure à 2 moles par litre et elle est de préférence comprise entre 0,1 et 1,5 mole par litre.

- 5 L'invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples suivants qui ne doivent pas être considérés comme limitatifs de l'invention.

## EXEMPLE 1

Le micro-organisme *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 est cultivé dans le milieu suivant :

	Acétate d'ammonium	10 g/l
5	Extrait de levure	5 g/l
	Peptone	5 g/l
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g/l
	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2 g/l
	FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	30 mg/l
10	NaCl	1 g/l
	Benzonitrile	0,5 g/l
	pH 7,2	

La culture est réalisée à 30°C dans des fioles d'Erlenmeyer de 2 litres contenant 600 ml de milieu. Le tout est agité à 150 tours par minute durant 30 heures. Le culot cellulaire est récupéré, lavé avec une solution de NaCl à 9g/l puis congelé.

Conditions opératoires pour l'hydrolyse du butyronitrile :

	4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile	50 mM
	Cellules	5 mg/ml
20	Tampon phosphate	200 mM
	Température	30°C
	Durée	4 heures

L'étude cinétique d'hydrolyse du 4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile montre une production linéaire de 2,8 µmoles d'hydroxy analogue de la méthionine par heure et par mg de cellules sèches. L'excès énantiomérique de l'acide formé a été mesuré par chromatographie liquide, il est égal à 0 % pour un rendement en acide de 80 %.

## EXEMPLE 2

On a évalué la stabilité de l'enzyme en suivant la cinétique de production de l'hydroxy analogue de la méthionine pendant 180 heures avec des cellules libres.

Les conditions opératoires sont les suivantes :

	4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile	100 mM
	Cellules	10 mg/ml
	Tampon phosphate 300 mM	5 ml
5	Température	25°C

Le nitrile est ajouté séquentiellement par ajout de 100mmoles de nitrile après épuisement. La formation de l'acide correspondant est indiqué dans le tableau I :

TEMPS	Acide Formé (mmoles/litre)	Activité ( $\mu$ moles/h. mg de cell. s.)
0	0	0
2 h	39	1,7
17 h	230	1,3
24 h	312	1,7
47 h	466	1,2
70 h	556	0,4
172 h	860	0,6
180 h	940	0,6

10 L'activité initiale est de 2  $\mu$ moles/h.mg de cellules sèches. Cet exemple prouve la stabilité de l'enzyme malgré la présence de fortes concentrations en acide (0,9 mole d'hydroxy analogue de la méthionine)

### EXEMPLE 3

La stabilité de l'enzyme en fonction de la quantité de substrat et de la quantité d'acide formé a aussi été mesurée dans les conditions suivantes :

15	<b>Stabilité de l'enzyme en fonction de la quantité de substrat</b>	
	Nitrile	cf Tableau résultats
	Cellules	10 mg/ ml
	Tampon phosphate 300 mM pH 7,0	5 ml
	Température	25°C
20	Durée	1 heure

Concentration en nitrile (mM)	Activité ( $\mu$ moles/ h. mg de cell. s.)
50	2
100	2
150	2
200	2
500	0

#### Stabilité de l'enzyme en fonction de la quantité d'acide formé

Conditions opératoires:

	Nitrile	50 mM
	Cellules	2,5 mg/ ml
5	Tampon phosphate 100 mM pH 7,0	1 ml
	Température	30°C
	Durée	2 heures

Concentration en acide (mM)	Activité ( $\mu$ moles/ h. mg de cell. s.)
0	3,2
100	4,5
200	3,8
300	4,1
400	4
500	4
600	3,4
700	2,8

#### EXEMPLE 4

Purification de la nitrilase

- 10 Les cellules d'*Alcaligenes faecalis* sont cultivées 24 heures à 30°C dans le milieu décrit à l'exemple 1.

Après centrifugation de la culture, le culot est repris dans le tampon pH 7,5 (25mM trisHCl, 10 % (p/v) glycérol). La suspension cellulaire est

traitée aux ultrasons puis centrifugée afin d'obtenir l'extrait brut. L'extrait brut est ensuite traité avec du sulfate d'ammonium jusqu'à 30 % de la saturation. Le précipité obtenu est resuspendu dans le tampon pH 7,5 puis dialysé contre 2 litres du même tampon durant une nuit.

5 La solution obtenue est ensuite déposée sur une colonne échangeuse d'anions Q Sepharose Fast Flow HR 26/10® préalablement équilibrée avec le tampon pH 7,5. L'activité est ensuite éluée avec un gradient de 0 à 1 M de NaCl.

10 Les fractions actives sont ensuite déposées sur une colonne échangeuse d'anions Mono Q HR 5/5® préalablement équilibrée avec du tampon pH 7,5. La nitrilase est éluée à l'aide d'un gradient de 0 à 1 M de NaCl.

15 Pour finir, les fractions contenant l'activité sont réunies, puis est ajouté 1 M de sulfate d'ammonium. Cette solution est déposée sur une colonne d'interactions hydrophobes Phényl sepharose HR 5/5® préalablement équilibrée avec le tampon pH 7,5 additioné de 1 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . L'activité est ensuite éluée avec un gradient de 1 à 0 M en sulfate d'ammonium.

20 Le poids moléculaire de la protéine est déterminé par gel filtration. Il est d'environ 260 kDa. Sur gel de SDS-PAGE, on observe une unique bande de 43 kDa (pureté de 95 %).

La cinétique d'hydrolyse du 4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile en hydroxy analogue de la méthionine par la nitrilase d'*A. faecalis* est linéaire

Temps (Heure)	Activité ( $\mu$ moles/ h. mg de prot.)	RR (%)
0	0	1
0,5	150	3
1	171	5
21,5	150	68
24,8	150	77
29	150	87

## EXEMPLE 5 Influence du pH

Conditions opératoires :

	nitrile	50 mM
	protéine	50 $\mu$ g/ml
5	tampon acétate 100 mM de pH 4 à 5	
	tampon phosphate 100 mM de pH 6 à 7	1 ml
	tampon TRIS-HCl 100 mM de pH 8 à 9	
	tampon borate 100 mM de pH 10 à 11	
	température	30°C
10	Durée	1 à 2 heures

pH	Activité ( $\mu$ moles/ h. mg de prot.)
4	0
5	42
6	232
7	272
8	405
9	412
10	158
11	0

## EXEMPLE 6 Influence de la température

Conditions opératoires

nitrile 50 mM

protéine 50 µg/ml  
 tampon phosphate 100 mM de pH 7,0  
 températures variables de 4°C à 60°C  
 durée 1 heure

5 La température optimale de fonctionnement de l'enzyme est de 50°C.

Température en °C	Activité (µmoles/ h. mg de prot.)
4	45
10	67
20	140
30	272
40	419
50	570
60	333

#### EXEMPLE COMPARATIF AVEC LE MANDELONITRILE

Conditions opératoires:

Mandélonitrile 7 mM  
 Protéine 5 µg/ ml  
 10 Tampon phosphate 100 mM pH 7,0 1 ml  
 Température 30°C

Temps (minute)	Activité (µmoles/ h. mg de prot.)	ee
15	1000	1
60	1030	1

La nitrilase purifiée est donc énantiosélective sur le mandélonitrile mais pas sur le 4-méthylthio 2-hydroxybutyronitrile.

## EXEMPLE 7

Hydrolyse du 4-méthyl thio 2-hydroxy butyronitrile par *Rhodococcus* HT 29-7 FERM BP-3857

5 Le micro-organisme *Rhodococcus* sp. HT 29-7 FERM BP-3857 est cultivé dans le milieu suivant:

	Glycérol	20 g/ l
	Extrait de levure (DIFCO)	3 g/ l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/ l
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	4,4 g/ l
10	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,8 g/ l
	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,85 g/ l
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05 g/ l
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,033 g/ l
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,013 g/ l
15	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,005 g/ l
	Benzonitrile	0,5 g/ l
	pH 7,5	

20 La culture est réalisée à 30°C dans des fioles d'Erlenmeyer de 2 litres contenant 600 ml de milieu. Le tout est agité à 150 tours par minute durant 140 heures. Le culot cellulaire est récupéré, lavé avec une solution NaCl à 9 g/ l puis congelé.

Influence du pH pour l'hydrolyse :

Conditions opératoires:

	4-méthyl thio 2-hydroxy butyronitrile	100 mM
25	Densité Optique à 660nm	15
	Tampon acétate 100 mM de pH 4 à 5	
	Tampon phosphate 100 mM de pH 6,0 à 7,0	1 ml
	Tampon TRIS-HCl 100 mM de pH 8,0 à 9,0	
	Tampon Borate 100 mM de pH 10,0 à 11,0	
30	Température	30°C
	Durée	10 heures

pH	Rendement en acide
4	0%
5	100%
6	100%
7	100%
8	100%
9	100%
10	20%
11	0%

EXEMPLE 8 : Influence de la concentration en substrat.

La stabilité de l'enzyme en fonction de la quantité de substrat a aussi été mesurée dans les conditions suivantes:

5	4-méthyl thio 2-hydroxy butyronitrile	cf Tableau résultats
	Densité Optique à 660nm	20
	Tampon phosphate 300 mM pH 7,0	5 ml
	Température	30°C
	Durée	2 heures

Concentration en nitrile (mM)	Rendement en acide
50	90%
100	44%
200	22%
300	10 %
400	0%
500	0%

**EXEMPLE 9** Stabilité de l'enzyme en fonction de la quantité d'acide formé

Conditions opératoires:

	4-méthyl thio 2-hydroxy butyronitrile	100 mM
	Densité Optique à 660nm	15
5	Tampon phosphate 100 mM pH 7,0	1 ml
	Température	30°C
	Durée	6 heures

Concentration en acide (mM)	rendement en acide
0	100%
200	100%
400	100%
600	100%
800	100%
1000	100%

**EXEMPLE 10**

Excès énantiomérique.

10	4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile	140 mM
	Densité Optique à 660nm	14
	Tampon phosphate 100 mM pH 7,0	1 ml
	Température	20°C

Temps d'incubation	Rendement en acide	Pureté optique
2 h	15%	0
6 h	50%	0
24 h	100%	0

15 L'étude cinétique d'hydrolyse du 4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile montre une production linéaire d'hydroxy analogue de la méthionine par

heure par mg de cellules sèches. L'excès énantiomérique de l'acide formé a été mesuré par chromatographie liquide, il est égal à 0% pour un rendement en acide variant de 15% à 100%.

EXEMPLE 11 Influence de la température.

5 Conditions opératoires:

4-méthyl thio 2-hydroxy butyronitrile 100 mM  
 Densité Optique à 660nm 15  
 Tampon phosphate 100 mM pH 7,0 1 ml  
 Température voir tableau  
 Durée 6 heures

10

T (°C)	rendement en acide
10	70%
20	100%
30	100%
40	100%
50	31%
60	15%

EXEMPLE 12 Hydrolyse du 4 méthylthio 2-aminobutyronitrile.

Conditions opératoires:

4-méthyl thio 2-hydroxy butyronitrile 23 mM  
 Densité Optique à 660nm 15  
 Tampon phosphate 100 mM pH 7,0 1 ml  
 Température 30°C

15

Temps (heure)	rendement en acide	excès énantiomérique de l'acide
0,5	40%	n.d.
1	51%	0,12
2	62%	n. d.
5	78%	0,15

## EXEMPLE 13

Les conditions de cultures utilisées pour *Gordona terrae* MA-1 (FERM BP-4535) sont les suivantes :

	Glycérol	10 g/ l
5	Extrait de levure	0,4 g/ l
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,8 g/ l
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	7,1 g/ l
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,8 g/ l
	MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,4 g/ l
10	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	40 mg/ l
	MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	4 mg/ ml
	FeCl <sub>3</sub>	0,6 mg/ l
	ZnSO <sub>4</sub>	0,3 mg/ l
	Benzonitrile	0,5 g/ l
15	pH 7,2	

## Activité de l'enzyme

Les cellules cultivées sont ensuite lavées puis mises en présence de l'hydroxy méthylthio butyronitrile pour le dosage de l'activité

## Conditions opératoires :

20	[nitrile] = 23 mM;
	[cellules] = 6,8 g/ l;
	tampon phosphate 100 mM
	pH 7,0; 35°C

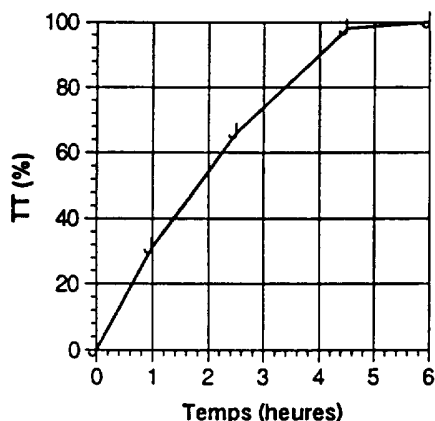


Figure 3: Hydrolyse de la cyanhydrine de l'AMTP par *Gordona terrae* MA-1.

La cinétique d'hydrolyse de l'hydroxy méthylthio butyro nitrile est linéaire. La vitesse initiale est estimée à 13 mmol/ h. g CS .

EXEMPLE 14 Influence de la concentration en cyanhydrine de l'AMTP sur l'activité nitrilase.

- 5 L'influence de la concentration initiale en hydroxy méthylthio butyronitrile sur l'activité nitrilase a été déterminée, les résultats sont indiqués dans le tableau suivant.

Conditions opératoires:

[cellules]=5,1 g/ l;

10 Tampon phosphate 100 mM

pH 7,0; 35°C.

La cinétique est réalisée sur 0,5, 1, 2 et 3 heures.

Concentration en nitrile (mM)	Activité (mmol/ h. g CS)
50	14
100	13
200	15
300	0
400	0

Jusqu'à 200 mM, l'activité varie peu avec la concentration en substrat.

EXEMPLE 15 Influence de la concentration en hydroxy analogue de la méthionine sur l'activité nitrilase.

Dans cet essai, nous avons étudié l'influence de la concentration en hydroxy-4 méthylthio-2 butanoate d'ammonium sur l'activité nitrilase.

5 Condition opératoire:

[cellules] = 5 g/ l;

[nitrile] = 100 mM;

tampon phosphate 100 mM pH 7,0;

35°C.

10 La concentration en carboxylate d'ammonium varie entre 0 et 1,5 M.

Concentration en acide (mole/ l)	Activité ( $\mu$ mol/ h. mg de CS)
0	9,4
0,5	14
1	19
1,5	15

La concentration en hydroxy-4 méthylthio-2 butanoate d'ammonium ne modifie en rien l'activité initiale de la souche *Gordona terrae* HT29-7.

EXEMPLE 16 Influence du pH et de la température.

Conditions opératoires:

15 [nitrile]=100 mM;

[cellules]=7,5 g/ l;

Tampon acétate 100 mM pH 4 à 5;

tampon phosphate 100 mM pH 6 à 7;

tampon Tris-HCl 100 mM pH 8 à 9

20 tampon Borate 100 mM pH 10 à 11; 3  
30°C; cinétique sur 1, 2, 4 et 6 heures.

pH	Activité (mmol/ h. g CS)
4	0,6
5	2,5
6	7,8
7	9,6
8	15,3
9	18
10	5,7
11	11

Le pH optimum se situe aux alentours de 8-9 dans nos conditions opératoires.

Influence de la température sur l'activité nitrilase de *Gordona terrae* MA-1.

Conditions opératoires:

- 5 [nitrile]=100 mM;  
 [cellules]=7,5 g/ l;  
 Tampon phosphate 100 mM pH 7,0;  
 cinétique sur 1 heure.

T (°C)	Activité (mmol/ h. g CS)
10	0,6
20	2,3
30	3,2
40	3,4
50	3,5
60	1,9

La température optimale se situe vers 40-50°C.

## REVENDEICATIONS

- 5 - 1 - Procédé de préparation d'acides 4-méthylthio butyrique  $\alpha$  substitués racémiques caractérisé en ce qu'on hydrolyse les 4-méthylthio butyronitrile  $\alpha$  substitués racémiques par une nitrilase choisie parmi celles d'*Alcaligenes faecalis*, *Rhodococcus sp.* HT 29-7 ou de *Gordona terrae*.
- 2 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le 4-méthylthio butyronitrile  $\alpha$  substitués racémiques est le 4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile
- 10 - 3 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le pH du milieu est compris entre 4 et 11 et de préférence entre 5 et 9.
- 4 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la température d'hydrolyse est comprise entre 30 et 60°C et de préférence 30 et 50°C.
- 15 - 5 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la concentration en 4-méthylthio butyronitrile  $\alpha$  substitué dans la solution de départ est comprise entre 10 et 400 mmoles et de préférence entre 50 et 200 mmoles par litre.
- 20 - 6 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la concentration en acide 4 méthylthio butyrique  $\alpha$  substitué dans la solution est comprise entre 10 et 2000 mmoles par litre et de préférence entre 100 et 1500 mmoles par litre.
- 7 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'on utilise une nitrilase appartenant à un micro-organisme du genre *Alcaligenes*.
- 25 - 8 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'on utilise une nitrilase appartenant à un micro-organisme du genre *Rhodococcus*.
- 9 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'on utilise une nitrilase appartenant à un micro-organisme du genre *Gordona*.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 95/01196

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12P11/00 //(C12P11/00, C12R1:01, C12R1:05)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 116, no. 25, 22 June 1992 Columbus, Ohio, US; abstract no. 254075, ENDO, RYUICHI ET AL 'Fermentative manufacture of alpha.-hydroxy-4- methylthiobutyric acid' see abstract & JP,A,04 040 898 (NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD., JAPAN) --- -/--	1-5,7,8

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 January 1996

Date of mailing of the international search report

24.01.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Delanghe, L

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 95/01196

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 117, no. 5, 3 August 1992 Columbus, Ohio, US; abstract no. 46744, ENDO, RYUICHI ET AL 'Fermentative manufacture of.alpha.-hydroxy-4-methylthiobutylamide' see abstract & JP,A,04 040 899 (NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD., JAPAN) ---	1
A	EP,A,0 348 901 (ASHI KASEI KOGYO KABUSHIKI) 3 January 1990 cited in the application see claims ---	1,7,8
A	EP,A,0 444 640 (HIDEAKI YAMADA ;NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO LTD (JP)) 4 September 1991 see claims ---	1,8
A	EP,A,0 610 048 (NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO LTD) 10 August 1994 cited in the application see claims ---	1,9
A	EP,A,0 610 049 (NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO LTD) 10 August 1994 cited in the application see claims -----	1,7,8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/FR 95/01196

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-348901	03-01-90	JP-A- 2084198 US-A- 5283193	26-03-90 01-02-94
EP-A-0444640	04-09-91	JP-A- 3251192 CN-A- 1055954 US-A- 5135858	08-11-91 06-11-91 04-08-92
EP-A-0610048	10-08-94	JP-A- 6237789	30-08-94
EP-A-0610049	10-08-94	JP-A- 6284899	11-10-94

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No  
PCT/FR 95/01196

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12P11/00 //(C12P11/00,C12R1:01,C12R1:05)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 116, no. 25, 22 Juin 1992 Columbus, Ohio, US; abstract no. 254075, ENDO, RYUICHI ET AL 'Fermentative manufacture of alpha.-hydroxy-4- methylthiobutyric acid' voir abrégé & JP,A,04 040 898 (NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD., JAPAN) --- -/--	1-5,7,8

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 Janvier 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

24.01.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Delanghe, L

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 117, no. 5, 3 Août 1992 Columbus, Ohio, US; abstract no. 46744, ENDO, RYUICHI ET AL 'Fermentative manufacture of.alpha.-hydroxy-4-methylthiobutylamide' voir abrégé & JP,A,04 040 899 (NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD., JAPAN) ---	1
A	EP,A,0 348 901 (ASHI KASEI KOGYO KABUSHIKI) 3 Janvier 1990 cité dans la demande voir revendications ---	1,7,8
A	EP,A,0 444 640 (HIDEAKI YAMADA ;NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO LTD (JP)) 4 Septembre 1991 voir revendications ---	1,8
A	EP,A,0 610 048 (NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO LTD) 10 Août 1994 cité dans la demande voir revendications ---	1,9
A	EP,A,0 610 049 (NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO LTD) 10 Août 1994 cité dans la demande voir revendications -----	1,7,8

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Requête Internationale No

PCT/FR 95/01196

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-348901	03-01-90	JP-A- 2084198	26-03-90
		US-A- 5283193	01-02-94
-----			
EP-A-0444640	04-09-91	JP-A- 3251192	08-11-91
		CN-A- 1055954	06-11-91
		US-A- 5135858	04-08-92
-----			
EP-A-0610048	10-08-94	JP-A- 6237789	30-08-94
-----			
EP-A-0610049	10-08-94	JP-A- 6284899	11-10-94
-----			