



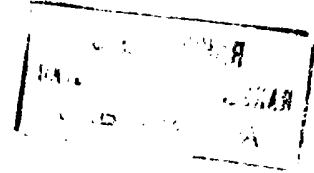
СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1530101** **A3**

(51) 4 С 12 Р 13/02 // С 12 Р 1/04

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГИИТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ



1
(21) 3764662/28-13
(22) 11.06.84
(31) 125588/1983
(32) 12.07.83
(33) JP
(46) 15.12.89. Бюл. № 46
(71) Нитто Кагаку Когио Кабусики Кайся
и Мицубиси Рэйон КО, Лтд (JP)
(72) Ёсиаки Сатох, Ясутака Накасима,
Конехико Еномото, Ацуси Фудзивара
и Тосиаки Дой (JP)
(53) 66.095.115 (088.8)
(56) Патент Японии № 17918/81,
кл. С 12 Р 13/02, 1981.
Патент Японии № 38118/81,
кл. С 12 Р 13/02, 1981.
(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АМИДА
(57) Изобретение относится к биотех-
нологии и может быть использовано в

2
производстве амида микробиологическим
способом. Цель изобретения - ускоре-
ние способа. Амид получают путем гид-
ратации нитрильного соединения с по-
мощью суспензии грамположительных
микроорганизмов при 0-20°C и pH среды
6-9, при этом суспензию предвари-
тельно облучают светом либо процесс гид-
ратации ведут при освещении, либо
осуществляют предварительную обработ-
ку светом суспензии и производят та-
ковую по ходу реакции. Для этого ис-
пользуют световую энергию в количест-
ве не менее 1×10^{-2} мкЕ/г·клеток в 1 с
с длиной волны 200-800 нм. Реакцию
гидратации проводят в сосуде, состоя-
щем по меньшей мере частично из мате-
риала, не пропускающего свет. 3 з.п.
ф-лы, 6 табл.

Изобретение относится к области
биотехнологии и может быть использо-
вано в производстве амида микробиоло-
гическим способом.

Цель изобретения - ускорение спо-
соба.

Пр и м е р 1. Промытые бактериаль-
ные клетки штамма N-774 (*Streptobacte-
rium*) получают аэробным культивиро-
ванием штамма в среде (pH 7,2), сос-
тоящей из глюкозы 1%, пептона 0,5%,
дрожжевого экстракта 0,3%, экстракта
сусла 0,3% и сульфата железа (III) $\times$
 $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,05%, и промывкой полученных
клеток фосфатным буфером 0,05 М. Клет-
ки диспергируют в фосфатном буфере
(0,05 М) pH 7,7 в темном месте с по-
лучением дисперсии клеток, имеющих

концентрацию 3,5 г высушенных клеток/
л. Полученную суспензию клеток делят
на две части. Одну из них оставляют
при 0°C в течение 4 ч при облучении
световой энергией $1,5 \times 10^{-1}$ мкЕ/г кл.
в с, используя два комплекта люминес-
центных ламп дневного света длиной
волны 400-800 нм мощностью по 4 Вт,
и этот образец обозначен в дальнейшем
как "выдержка на свету". Другую часть
оставляют при 0°C в темном месте в
течение 4 ч, и этот образец в даль-
нейшем именуют как "выдержка в тем-
ноте".

При использовании каждой из кле-
точной суспензии из акрилонитрила по-
лучают акриламид и изучают скорость

(19) **SU** (11) **1530101** **A3**

реакции с точки зрения количества получаемого таким путем акриламида.

В случае бактерий, выдерживаемых на свету, смесь 0,088 ч. клеток (здесь и ниже количество представляется массой сухих клеток), 1 ч. акрилонитрила и 98,912 ч. 0,05 М фосфатного буфера (pH 7,7) подвергают реагированию при 10°C в реакторе на 50 мл в течение 20 мин при перемешивании при описанных условиях, в дальнейшем эта реакция именуется "реакция в условиях облучения". В случае бактерий, выдерживаемых в темноте, эту реакцию повторяют, но не обеспечивают освещения, и в дальнейшем эта реакция именуется "реакцией в условиях темноты". После завершения реакции акриламид, содержащийся в каждом реакционном растворе, реакция в котором прекратилась, подвергают количественному анализу с помощью газовой хроматографии. В результате количество акриламида (АА) на единицу количества бактериальных клеток составило 41,1 мкмоль АА/мг кл. мин в реакции в условиях облучения и бактерий, выдерживаемых на свету, и 0,34 мкмоль АА/мг кл. мин в реакции в условиях темноты и бактерий, выдерживаемых в темноте. Отношение между этими показателями (т.е. реакция в условиях облучения и бактерий, выдерживаемых на свету / реакция в условиях темноты и бактерий, выдерживаемых в темноте) 121.

В примерах значение 41,4 мкмоль/мг кл. мин, полученное для реакции в условиях облучения и бактерий, выдерживаемых на свету, согласно примеру 1 указано относительным показателем 100 U. Таким образом, полученное в примере 1 значение для реакции в условиях темноты и бактерий, выдерживаемых в темноте, 0,83 U.

Примеры 2-13. Реакционный раствор, имеющий состав, представленный в табл.1, получают с использованием бактериальных клеток, выдерживаемых на свету и отдельно - выдерживаемых в темноте, полученных в примере 1. Реакционный раствор подвергают реагированию по методике примера 1. Соответствующие амидные соединения, содержащиеся в растворе после завершения реакции, подвергают количественному анализу с помощью газовой хроматографии с получением результатов, приведенных в табл.2.

Примеры 14-18. Промытые бактериальные клетки получают приготавлением по методике примера 1 штаммов следующих родов: *Bacillus* (CBS-494) в примере 14, *Bacteridium* (CBS-496) в примере 15, *Micrococcus* (CBS-497) в примере 16, *Brevibacterium* (CBS-717) в примере 17 и *Nocardia* (N-775) в примере 18. Промытые клетки обрабатывают по методике примера 1 с получением клеток, выдерживаемых на свету и соответственно в темноте. При использовании клеток в следующем составе акриламид получают из акрилонитрила и скорость реакции изучают с точки зрения количества получаемого таким путем акриламида.

В случае штаммов, выдерживаемых на свету, смесь 0,088 ч. клеток, 1 ч. акрилонитрила и 98,912 ч. 0,05 М фосфатного буфера (pH 7,7) подвергают реагированию в течение 20 мин при 10°C в условиях перемешивания (реакция в условиях облучения). В случае штаммов, выдерживаемых в темноте, реакцию повторяют с тем отличием, что не производится освещения (реакция в темноте). Акриламид, содержащийся в каждом растворе после завершения реакции, подвергают количественному анализу с помощью газовой хроматографии с получением результатов, приведенных в табл.3 (сравнительные данные по влиянию освещения на получение амидов).

Примеры 19-21 и сравнительные примеры 1 и 2. Промытые бактериальные клетки штамма N-774 получают аэробным культивированием штамма в среде (pH 7,2), содержащей глюкозу 1%, пептон 0,5%, дрожжевой экстракт 0,3%, солодовый экстракт 0,3% и сульфат железа (III) 7 H₂O 0,05%, и промыванием полученных клеток 0,05 М фосфатным буфером. Клетки диспергируют в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7,7) в темном месте с получением бактериального раствора концентрацией 22,72 мг/мл.

По 1 мл каждой клеточной суспензии загружают в стальные реакторы на 50 мл и добавляют 24 мл 0,05 М фосфатного буфера (pH 7,7). Результирующую клеточную суспензию облучают источником света, использованным в примере 1 при 0°C в течение 1 или 20 ч, причем количество поступающей световой энергии регулируют показанным в

табл.4 образом с помощью фильтрата, имеющего разные оптические участки и помещенного в верхней части реактора.

К каждой клеточной суспензии, облученной светом, добавляют 25 мл 5% раствора акрилонитрила (в 0,05 М растворе фосфатного буфера, pH 7,7). Смесь подвергают реагированию в течение 20 мин при тех же условиях светового облучения. Для сравнения реакции проводят тем же путем, но с использованием клеточной суспензии без светового облучения или при облучении световой энергией, меньшей 1×10^{-2} мкЕ/г кл. с.

Количество акрилаида, содержащееся в этих реакционных растворах, подвергают количественному анализу с помощью газовой хроматографии для определения скорости реакции. Результаты приведены в табл.4. (Влияния облучения на скорость реакции гидратации).

Пример 22. Промытые бактериальные клетки штамма N-774 получают аэробным культивированием штамма в среде (pH 7,2), содержащей глюкозу 1%, пептон 0,5%, дрожжевой экстракт 0,3%, солодовый экстракт 0,3% и сульфат железа (III) $7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,05%, и промывкой полученных клеток 0,05 М фосфатным буфером. Затем 40 ч. полученных клеток (содержание воды 75%), 4,5 ч. акрилаида, 0,5 ч. N,N-метиленбисакрилаида и 40 ч. 0,05 М фосфатного буфера (pH 7,7) смешивают с образованием однородной суспензии. К ней добавляют 5 ч. 5%-ного водного раствора диметиламинопропионитрила и 10 ч. 2,5%-ного водного раствора персульфата калия. Смесь подвергают полимеризации при 10°C в течение 30 мин. Результирующий кусковой гель, содержащий бактериальные клетки, дробят на мелкие частицы и частицы полностью промывают 0,05 М фосфатным буфером (pH 7,7) с получением 100 ч. иммобилизованных бактериальных клеток. Иммобилизованные клетки обрабатывают 0,05 М фосфатным буфером (pH 7,7) с получением раствора концентрацией 3,5 г сухих клеток на литр. Раствор иммобилизованных клеток делят на две порции. Одну оставляют при 0°C в течение 4 ч при тех же условиях светового облучения, что и в примере 1 (выдержка на свету), а другую порцию

оставляют при 0°C в темном месте в течение 4 ч (выдержка в темноте).

При использовании иммобилизованных клеток в следующих составах из акрилонитрила получают соответственно акрилаид. Скорость реакции изучают с точки зрения количества получаемого таким путем акрилаида. В случае бактерий, выдерживавшихся на свету, смесь 0,5 ч. геля иммобилизованных клеток, 2,5 ч. акрилонитрила и 97 ч. 0,05 М фосфатного буфера (pH 7,7) облучают светом в указанных условиях и подвергают реагированию при 0°C в условиях перемешивания в течение 20 мин (реакция при освещении). В случае выдержки бактерий в темноте эту реакцию проводят с тем исключением, что не ведут облучения светом (реакция в темноте).

В каждом из растворов после завершения реакции акрилаид подвергают количественному анализу с помощью газовой хроматографии. В результате скорость реакции при освещении и выдержке на свету 20,0 U, а в случае реакции в темноте и выдержке в темноте 0,4 U, так что отношение этих показателей 50,0.

Примеры 23 и 24. Иммобилизованные клетки штамма N-774 при выдержке на свету получают на методике примера 22. 4 ч. результирующих иммобилизованных клеток, 2,5 ч. акрилонитрила и 98,5 ч. 0,05 М фосфатного буфера (pH 7,7) смешивают и помещают в кубический сосуд из нержавеющей стали объемом 2,5 л, верхняя часть которого открыта. Смесь облучают в сосуде через открытую верхнюю поверхность (144 см^2) с помощью того же источника света с длиной волны 400-800 нм, что и в примере 1, при световой энергии $2,48 \times 10^{-2}$ мкЕ/г кл. с или лампы холодного свечения мощностью 100 Вт при световой энергии $1,86 \times 10$ мкЕ/г кл. с и подвергают реагированию при 0°C и перемешивании в течение 20 мин соответственно. Сохраняющийся в каждом из растворов по завершении реакции акрилаид подвергают количественному анализу с помощью газовой хроматографии. Результаты приведены в табл.5. (влияние интенсивности светового облучения на скорость реакции гидратации).

Пример 25 и сравнительный пример 3. Иммобилизованные клетки

штамма N-774 получают по методике 22. 0,4 ч. полученных иммобилизованных клеток, 84,6 ч. 0,0025 М водного раствора сульфата натрия и 1,8 ч. акрилонитрила смешивают и помещают в разъемную стеклянную колбу на 1 л, имеющую часть, выполненную светонепроницаемой. Смесь в колбе облучают лампой типа Cool light с длиной волны 400-800 нм и мощностью 150 Вт с расстояния 20 см от реакционного раствора (световая энергия около 7×10^2 мкЕ/г кл. с) при одновременном регулировании pH равным 8,5 добавлением 0,056 раствора гидроокиси натрия и подвергают реагированию при регулировании концентрации акрилонитрила в реакционной системе на уровне 2% постепенным добавлением 17,2 ч. акрилонитрила. Таким путем получают 10 ч. раствора по завершении реакции, который содержит 20% акриламида. Количество непрореагировавшего акрилонитрила 100 млн^{-1} и менее спустя 25 ч после начала реакции.

При проведении сопоставительного примера реакцию повторяют при тех же условиях, но не используют облучения светом. Реакционный раствор содержит не более 1% акриламида спустя 25 ч после начала реакции.

Ссылочный пример 1. Штамм N-774 культивируют по методике примера 1. Полученные клетки N-774 разрушают при низкой температуре с помощью пресса Френча с получением клеточной суспензии. Суспензию подвергают обработке с целью удаления аминокислот и диализу для получения неочищенного ферментного раствора в виде фракции, насыщенной 50% сульфата аммония, которая содержит белок в концентрации 3,9 белка/мл. Раствор делят на 2 порции. Одну порцию выдерживают при 10°C в течение 4 ч в тех же условиях облучения светом, что и в примере 1 (выдержка на свету). Другую порцию выдерживают при 10°C в течение 4 ч в темном месте (выдержка в темноте). При использовании неочищенного ферментного раствора в следующих составах из акрилонитрила получают соответственно акриламид. Скорость реакции изучают с точки зрения количества получаемого таким путем акриламида.

В случае бактерий после выдержки на свету смесь 2,5 ч. неочищенного ферментного раствора, 2,5 ч. акрило-

нитрила и 95,0 ч. 0,05 М фосфатного буфера облучают светом в описанных условиях и подвергают реагированию при 10°C и перемешивании в течение 20 мин. В случае выдержки бактерий в темноте реакцию повторяют в тех же условиях, но с тем исключением, что освещение не используют. Содержащийся в каждом из растворов после завершения реакции акриламид подвергают количественному анализу с помощью газовой хроматографии. В результате количество акриламида (АА), полученного таким путем, составляет 103 мкмоль АА/мг белка мин, в случае выдержки на свету и реакции с облучением и 102 мкмоль АА/мг белка мин в случае выдержки в темноте и реакции без облучения. Отношение этих показателей 1.01. Таким образом, эффект светового облучения не наблюдается.

Ссылочный пример 2. Этот эксперимент показывает, что бактерии, не проявляющие нитрилазной активности, но обладающие другой ферментной активностью, не испытывают изменения ферментной активности под действием светового облучения.

Промытые клетки *Brevibacterium ammoniagenes* (IAM 1645) получают аэробным культивированием штамма в среде (pH 7,2), содержащей 2% глюкозы, 0,5% фумарата натрия, 0,2% мочевины, 0,2% двузамещеннокислого фосфата калия, 0,05% сульфата магния. $7 \text{ H}_2\text{O}$ и 1% раствора после замачивания кукурузы. Клетки диспергируют в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7,7) в темноте для получения суспензии клеток, имеющей концентрацию $30,0 \text{ OD}_{630}$ мкм. Бактериальный раствор делят на две порции. Одну оставляют при 30°C в течение 1 ч на расстоянии 20 см от лампы Cool Beam мощностью 150 Вт при световой энергии 7×10^2 мкЕ/г кл. с (выдержка на свету). Другую порцию оставляют при 30°C в течение 1 ч в темноте (выдержка в темноте). При использовании этих бактериальных растворов в следующих составах из фумаровой кислоты получают яблочную кислоту. Скорость реакции изучают в сопоставлении с количеством получаемой таким путем яблочной кислоты.

В случае бактериального раствора после выдержки на свету смесь 50 ч. полученного бактериального раствора,

8 ч. фумарата натрия и 42 ч. 0,05 М фосфатного буфера (рН 7,7) реагируют при 30°C и перемешивании в течение 1 ч в описанных условиях облучения. В случае бактериального раствора после выдержки в темноте реакцию проводят в тех же условиях, но при отсутствии освещения. Фумаровую кислоту осаждают добавлением 2N HCl и удаляют из раствора после завершения реакции, после чего содержание яблочной кислоты в каждом из растворов после завершения реакции определяют цветопроявительным методом с использованием 2,7-нафталиндиола. В результате количество яблочной кислоты 3,40 мкмоль/ОД ч в случае реакции и выдержки на свету, и 3,36 мкмоль/ОД в случае реакции и выдержки в темноте. Отношение показателей 0,95. Таким образом, эффект светового облучения не наблюдается.

Примеры 26-28. Осуществляют способ согласно примерам 2-13 за тем исключением, что применяют другой тип нитрилов и количество используемых нитрилов составляет 2,5 ч.

Полученные результаты показаны в табл.6 (получение амидов из нитрилов).

Использование способа позволяет интенсифицировать процесс гидратации при использовании его в промышленном масштабе.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

1. Способ получения амида путем гидратации исходного нитрильного соединения суспензией грамположительных микроорганизмов, обладающих нитрилазной активностью, при температуре 0-20°C и рН 6-9 с последующим выделением целевого продукта, отличающийся тем, что, с целью ускорения способа, суспензию микроорганизмов подвергают воздействию световой энергии в количестве не менее 1×10^{-2} мкЕ/г кл.с с длиной волны 200-800 нм до и/или после контактирования их с нитрильным соединением, при этом реакцию гидратации ведут в сосуде,

состоящем по меньшей мере частично из материала, не пропускающего свет.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что воздействуют световой энергией в количестве не менее 2×10^{-2} мкЕ/г кл. с.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что используют суспензию штамма N-774 рода *Corynebacterium*, штамма N-776 рода *Nocardia*, штамма CBS-494 рода *Bacillus*, штамма CBS-496 рода *Bacteridium*, штамма CBS-497 рода *Micrococcus* или штамма CBS-717 рода *Brevibacterium*.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве нитрильного соединения используют ацетонитрил, пропионитрил, н-бутиронитрил, п-бутиронитрил, н-валеронитрил, акрилонитрил, метакрилонитрил, бензонитрил, цианопиридин, малонитрил, сукционитрил, фуранонитрил, хлорацетонитрил, β -гидроксипропионитрил, аминокетонитрил или β -аминопропионитрил.

Т а б л и ц а 1

Пример №	Исходный нитрил, мас.ч.	0,05 М фосфатный буфер, мас.ч.
2	Ацетонитрил 1	98,912
3	Метакрилонитрил	98,912
4	Валеронитрил 0,25	99,662
5	Цианопиридин 1	98,912
6	Бензонитрил 0,125	99,787
7	Пропионитрил 1	98,912
8	н-Бутиронитрил 1	98,912
9	Малонитрил 1	98,912
10	Сукционитрил 1	98,912
11	Фумаронитрил 1	98,912
12	Хлорацетонитрил 1	98,912
13	β -Гидроксипропионитрил 1	98,912

Примечание. Количество бактериальных клеток 0,088 мас.ч. рН 7,7.

Т а б л и ц а 2

При- меры	Исходные нитрильное соединение	Получаемые амид- ные соединения	Выдержка на свету- реакция при облу- чении (U)	Выдержка в темно- те-реак- ция в темноте (U)	Отношение показате- лей для двух ре- жимов
2	Ацетонитрил	Ацетоамид	20,6	2,0	10,3
3	Метакрилонитрил	Метакриламид	82,2	1,8	45,7
4	Валеронитрил	Валерамид	14,2	0,7	20,2
5	Цианопиридин	Никотинамид	16,4	5,6	2,9
6	Бензонитрил	Бензамид	12,3	0,7	17,6
7	Пропионитрил	Пропиоамид	102,0	3,5	29,4
8	n-Бутиронитрил	n-Бутиламид	220,0	5,7	38,9
9	Малонитрил	Малонамид	119,0	4,1	29,0
10	Сукцинонитрил	Сукцинамид	343,0	10,2	33,6
11	Фумаронитрил	Фумарамид	61,1	1,5	40,7
12	β -Гидроксипропио- нитрил	-Гидроксипро- пиоамид	56,4	9,0	6,3
13	Хлорацетонитрил	Хлорацетамид	289,0	6,5	44,5

Т а б л и ц а 3

При- меры	Род используемых бактерий	Штаммы	Выдержка на свету - ре- акция при облучении (U)	Выдержка в темно- те - реак- ция в тем- ноте. (U)	Отношение показате- лей для двух ре- жимов
14	Bacillus	CBS-494	57,0	21,8	2,6
15	Bacteridium	CBS-496	108,4	59,6	1,8
16	Micrococcus	CBS-497	61,8	27,5	2,2
17	Brevibacterium	CBS-717	106,8	1,7	62,8
18	Nocardia	N-775	33,0	2,7	12,0

Т а б л и ц а 4

Примеры и срав- нительные при- меры	Подаваемая световая энергия, мкЕ/г кл. с	Скорость ре- акции после облучения в течение 1 ч (U)	Скорость ре- акции после облучения 20 ч (U)
19	1×10^{-2}	7,8	9,7
20	2×10^{-2}	13,4	17,0
21	1×10^{-1}	31,6	34,0
1	0	0,29	0,29
2	5×10^{-3}	2,4	3,6

Т а б л и ц а 5

При- меры	Подаваемая световая энергия, мкЕ/г кл. с	Скорость реакции (U)
23	$2,48 \times 10^{-2}$	6,7
24	$1,86 \times 10$	31,9

Т а б л и ц а 6

При- меры	Исходное нитрил- соединение	Полученные амид. соеди- нения	Реакции с облучени- ем светом	Реакции без света	Реакция с облучением светом/ ре- акция без света
26	Изобутиронитрил	Изобутир- амид	7,2	0	
27	Аминоацетонит- рил	Аминоацет- амид	185	7,2	25,7
28	β -Аминопропио- нитрил	β -Аминопро- пионамид	220	12,0	18,3

Редактор О.Спесивых Техред Л.Сердюкова Корректор М.Пожо

Заказ 7767/59 Тираж 501 Подписное
ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул.Гагарина, 101