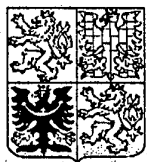


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **298-92**

(22) Přihlášeno: 03. 02. 92

(30) Právo přednosti:
04. 02. 91 CH 91/0330

(40) Zveřejněno: 16. 09. 92

(47) Uděleno: 01. 03. 95

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17. 05. 95

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 P 17/10

C 12 P 17/12

C 12 N 1/20

// (C 12 P 17/12, C 12 R 1:05)

(73) Majitel patentu:

LONZA A.G.

Gampel/Wallis (Dir.: Basel)

CH

(72) Původce vynálezu:

Kiener Andreas dr., Visp, CH;

Glöckler Rainer dipl. biol., Visperterminen,

CH;

Heinzmann Klaus, Visperterminen, CH;

(54) Název vynálezu:

**Způsob mikrobiologické výroby kyseliny
6-hydroxypikolinové**

(57) Anotace:

Mikrobiologický způsob výroby kyseliny 6-hydroxypikolinové z kyseliny pikolinové a/nebo jejích solí. Volí se taková koncentrace kyseliny pikolinové a/nebo jejích solí, aby se kyselina 6-hydroxypikolinová dále nemetabolizovala. Tento způsob se provádí pomocí mikroorganismů rodu *Alcaligenes*, které rostou s kyselinou pikolinovou jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie. Dále je popsán mikroorganismus *Alcaligenes faecalis* DSM 6269.

Způsob mikrobiologické výroby kyseliny 6-hydroxypikolinové

Oblast techniky

Vynález se týká nového mikrobiologického způsobu výroby kyseliny 6-hydroxypikolinové. Výchozí látkou je kyselina pikolinová a/nebo její soli.

Kyseliny 6-hydroxypikolinová se například používá k výrobě 2-oxypyrimidinu (Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 1912, 45, str. 2456 až 2467), který je zase důležitým meziproduktem pro výrobu léčiv.

Dosavadní stav techniky

Je známo několik způsobů výroby kyseliny 6-hydroxypikolinové pomocí organických syntéz. Z kyseliny pikolinové lze například získat kyselinu 6-hydroxypikolinovou reakcí s hydroxidem draselným (Tetrahedron Letters, sv. 29, str. 4389 až 4392, 1988). Nevýhoda tohoto způsobu však spočívá v tom, že se kyselina 6-hydroxypikolinová získá v měřitelném výtěžku, který činí jen 51 %.

Je také známo, že mikroorganismy rodu Bacillus hydroxylují kyselinu pikolinovou za vzniku kyseliny 6-hydroxypikolinové (O. Shukla a S. M. Kaul, Indian J. of Biochemistry and Biophysics, sv. 10, str. 176 až 178, 1973, O. Shukla a spol., Indian J. of Biochemistry and Biophysics, sv. 14, str. 292 až 295, 1977). Veliká nevýhoda tohoto způsobu však spočívá v tom, že další metabolický proces kyseliny 6-hydroxypikolinové lze zamezit pouze pomocí inhibitoru arsenitanu sodného, čímž se také brzdí růst mikroorganismů. Dalším nedostatkem je, že se netvoří pouze kyselina 6-hydroxypikolinová, ale směs kyseliny 3,6-dihydroxypikolinové a kyseliny 6-hydroxypikolinové.

R. L. Tate a J. C. Ensign, Can. J. Microbiol. sv. 20, str. 695 až 702, 1974 popsali hydroxylaci kyseliny pikolinové pomocí mikroorganismů rodu Arthrobacter. Nevýhoda tohoto způsobu spočívá v tom, že mikroorganismy nemohou využívat kyselinu pikolinovou výlučně jako zdroj uhlíku, dusíku a energie. Při hydroxylaci musí být totiž přítomen extrakt kvasnic, což může vést k nežádoucímu znečištění produktu. Dalším nedostatkem je, že se kyselina 6-hydroxypikolinová tvoří jen při nízkém obsahu kyslíku, takže mikroorganismy nejsou v růstové fázi, a tím se tvoří malé množství produktu.

Podstata vynálezu

Pojem kyselina pikolinová zahrnuje také její soli, jako například její ve vodě rozpustné soli alkalických kovů, amonné soli nebo také například směs kyseliny pikolinové a jejích ve vodě rozpustných solí alkalických kovů.

Úloha předloženého vynálezu spočívá v odstranění jmenovaných nedostatků a v uskutečnění hospodárného mikrobiologického způsobu výroby kyseliny 6-hydroxypikolinové, přičemž se získá produkt ve vysoké čistotě a ve vysokém výtěžku.

Úloha je řešena způsobem podle patentového nároku 1. Při způsobu výroby kyseliny 6-hydroxypikolinové podle vynálezu se postupuje tak, že se hydroxyluje kyselina pikolinová pomocí mikroorganismu rodu Alcaligenes, který roste s kyselinou pikolinovou jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie. Volí se taková koncentrace kyseliny pikolinové, aby kyselina 6-hydroxypikolinová nebyla dále metabolizována. Koncentrace kyseliny pikolinové se zvolí tak, že nepřesáhne 10 % hmot.

Mikroorganismy, které rostou s kyselinou pikolinovou jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie, lze izolovat metodami běžnými v oboru, například z čisticích zařízení nebo z půdy.

Účelně se pro výrobu kyseliny 6-hydroxypikolinové používá mikroorganismus Alcaligenes faecalis, který byl 7. 12. 1990 uložen u Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur GmbH, Mascherodeweg 1b, D-3300 Braunschweig, pod číslem 6269. Tento mikroorganismus nebyl dosud známý.

Vlastnosti kmene Alcaligenes faecalis DSM č. 6269:

buněčná forma	tyčinky	VP	-
šířka μm	0,5 až 0,8		
délka μm	1,2 až 2,0	ODC	-
pohyblivost	+	NO_2 z NO_3	-
mrskání	peritrich	denitrifikace	-
gram-reakce	-	fenylalaninindesamináza	-
lyze 3 % KOH	+		
aminopeptidáza (Cerny)	+	levan ze sacharózy	-
spóry	-	lecitináza	-
oxidáza	+	ureáza	-
kataláza	+	hydrolýza	
růst		škrobu	-
anaerobní	-	želatiny	-
37/40 °C	+/-	kaseinu	-
pH 5,6	+	DNA	-
Mac-Conkey-agar	+	tweenu 8	-
pigmenty	-	esculinu	-
nedifundující	-	odbourání tyrosinu	-
difundující	-		
fluoreskující	-	potřeba růstové látky	-
pyocyanin	-		
		využití substrátu	
kyselina z (OF-test)		acetát	+
glukózy aerobně	-	adipát	-
glukózy anaerobně	-	kaprát	+
xylózy aerobně	-	citrát	+
		glykolát	+
		L-laktát	+
plyn z glukózy	-	levulinát	-
		malát	+
kyselina z (ASS)		malonát	+
glukózy	-	fenylacetát	+
fruktózy	-	propionát	+
xylózy	-	suberát	-
		L-arabinóza	-

ONPG	-	fruktóza	-
		glukóza	-
ADH	-	mannóza	-
		maltóza	-
LDC	-	xylóza	-
		ribóza	-
VP	-	mannit	-
		glukonát	-
indol	-	2-ketoglukonát	-
		N-acetylglukosamin	-
		L-histidin	-
		L-methionin	+
		hydroxybutyrát	+

Pro provedení hydroxylace kyseliny pikolinové je žádoucí, aby kyselina 6-hydroxypikolinová nebyla dále metabolizována.

Z důvodu hospodárnosti musí být splněny následující parametry při hydroxylaci kyseliny pikolinové:

- Buňky by měly produkovat kyselinu 6-hydroxypikolinovou již během růstové fáze.
- Hydroxyláza kyseliny pikolinové má zůstat aktivní po skončení růstu.
- Odbourání kyseliny pikolinové by mělo být zbrzděno na stupni kyseliny 6-hydroxypikolinové.
- Produkt (kyselina 6-hydroxypikolinová) má být obohacen v růstovém médiu.

S překvapením se zjistilo, že jsou tyto parametry současně splněny tehdy, když se během růstu mikroorganismů nebo také po růstové fázi mikroorganismů přidá takové množství kyseliny pikolinové, aby se kyselina 6-hydroxypikolinová dále nemetabolizovala.

Jak již bylo uvedeno, roste kmen s kyselinou pikolinovou jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie. Napěstování tohoto kmene lze uskutečnit kyselinou pikolinovou o koncentraci 0,05 až 2,0 % hmot. přičemž je kyselina pikolinová zcela metabolizována.

Jestliže se zvýší koncentrace kyseliny pikolinové, potom se brzdí růst buněk. Při koncentraci kyseliny pikolinové nad 0,5 % hmot. nelze již pozorovat žádný růst. Avšak aktivita hydroxylázy kyseliny pikolinové zůstává v buňkách nezměněna.

Účelně se po napěstování mikroorganismů přidá kyselina pikolinová jako hmot. 10% až nasycený roztok takovou rychlostí, že nepřesáhne koncentrace kyseliny pikolinové ve fermentoru 10 % hmot. S výhodou nepřesáhne koncentrace kyseliny pikolinové ve fermentoru 1 % hmot.

Účelně slouží roztok kyseliny pikolinové spolu s roztokem hydroxidu alkalického kovu k regulaci hodnoty pH kultivačního média. Jako hydroxid alkalického kovu lze například použít hydroxid sodný nebo hydroxid draselný. Jako kultivační médium se mohou

použít v oboru běžně používaná média, výhodně se používá médium s minerálními solemi, jehož složení je uvedeno v tabulce 2.

Účelně je obsah kyslíku v kultivačním médiu během hydroxylace až do 90 % maximálního sycení, výhodně je obsah kyslíku v rozmezí od 0,1 do 50 % maximálního sycení.

Hydroxylace kyseliny pikolinové se uskutečňuje během růstové fáze nebo po ní.

Hodnota pH je účelně během růstové fáze nebo po ní mezi pH 4 a 10, výhodně mezi 5 a 9.

Hydroxylace se uskutečňuje účelně při teplotě od 10 do 60 °C, výhodně od 15 do 40 °C.

K dodatečnému zvýšení koncentrace produktu se podle výhodného provedení vynálezu přivádí alkalická sůl kyseliny pikolinové, přičemž je přívod alkalické soli kyseliny pikolinové řízen regulací parciálního tlaku kyslíku ve fermentoru.

Sůl alkalického kovu kyseliny pikolinové se účelně přidává takovou rychlostí, aby koncentrace soli kyseliny pikolinové ve fermentoru nepřesáhla 10 % hmot., výhodně aby nepřesáhla 1 % hmot.

Po oddělení buněk z kultivačního média, například centrifugací nebo mikrofiltrací, se čirý roztok okyselí, přičemž se vysráží kyselina 6-hydroxypikolinová. Aby se dosáhlo optimální krystalizace, roztok se výhodně okyseluje při 60 °C. Čirý roztok lze však použít pro další reakce i bez zpracování.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Izolace mikroorganismu Alcaligenes faecalis (DSM 6269)

Mikroorganismy aerobně metabolizující kyselinu pikolinovou se obohacují v A+N médiu (tabulka 1) s přidavkem 0,1 % (hmot./objem) kyseliny pikolinové jako jediným zdrojem uhlíku a energie. Obecné metody pro izolaci mikroorganismů jsou popsány například v "G. Drews, Mikrobiologisches Praktikum, 4. vydání, nakladatelství Springer, 1983, str. 1 až 84". Jako inokulum se používají vzorky půdy nebo vzorky z čistících zařízení. Obohacené vzorky se kultivují v třepacích baňkách při 30 °C. Po trojnásobném přeočkování do čerstvého média se obohacené vzorky rozetrou na stejné médium s přidavkem 16 g agarů na litr a inkubují se při 30 °C. Po několikanásobném rozetření na agarové médium se mohou izolovat čisté kultury.

Příklad 2

Hydroxylace v růstové fázi

Alcaligenes faecalis (DSM 6269) se kultivuje aerobně v médiu obsahujícím minerální soli (tabulka 2) s kyselinou pikolinovou

jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie při pH 7 a při teplotě 30 °C. K napěstování slouží 20ti litrový fermentor s pracovním objemem cca 15 l. Pro regulaci pH se přidává 4,06 mol/l (50 % hmot./objem, cca 2 l) roztoku kyseliny pikolinové a 3 mol/l (12 % hmot./objem, méně než 20 ml) roztoku hydroxidu sodného v průběhu 27 hodin. Potom se prokázalo ve fermentačním roztoku 0,14 mol/l (2 % hmot./objem) kyseliny 6-hydroxypikolinové a 16 mmol/l (0,18 % hmot./objem) kyseliny pikolinové. K tomuto časovému bodu tvoří obsah kyslíku 1 % syčení při prosycení vzduchem 30 l/min. a při rychlosti míchání 750 otáček/min.

Hydroxylace po růstové fázi

Po růstové fázi se přidává do fermentoru 2,7 mol/l (47 % hmot./objem, ca 2,5 l) roztoku pikolinátu sodného (pH 7) v průběhu 15 hodin. Rychlost dávkování roztoku pikolinátu sodného je řízena regulací parciálního tlaku kyslíku fermentoru tak, aby obsah kyslíku nepřekročil 20 % nasycení, přičemž koncentrace pikolinátu je ca. 20 mmol/l (0,22 % hmot./objem). Při koncentraci 0,7 mol/l (9,8 % hmot./objem) kyseliny 6-hydroxypikolinové a celkové době fermentace 42 hodin se přidávání přeruší. Pro celou náplň se dohromady použije 17,8 mol (2 190 g) kyseliny pikolinové ve formě volné kyseliny a sodné soli. Z kyseliny pikolinové, popřípadě její sodné soli se po okyselení bezbuněčného roztoku izoluje 13,3 mol (1 850 g) kyseliny 6-hydroxypikolinové v krystalické formě. To odpovídá výtěžku 74 %, vztaženo na vnesenou kyselinu pikolinovou. Z výsledků HPLC-analýzy vyplývá 95% čistota kyseliny 6-hydroxypikolinové. V čirém filtrátu je možné prokázat 0,13 mol (18,5 g) kyseliny 6-hydroxypikolinové, což odpovídá 0,75 % vnesené kyseliny pikolinové a 0,3 mol (37 g) kyseliny pikolinové, což odpovídá 1,7 % vnesené kyseliny pikolinové.

Tabulka 1: A+N médium

Složení:	Koncentrace (mg/l)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 000
Na_2HPO_4	2 000
KH_2PO_2	1 000
NaCl	3 000
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	400
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	14.5
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.8
pyridoxalhydrochlorid	$10 \cdot 10^{-3}$
riboflavin	$5 \cdot 10^{-3}$
amid kyseliny nikotinové	$5 \cdot 10^{-3}$
thiaminhydrochlorid	$2 \cdot 10^{-3}$
biotin	$2 \cdot 10^{-3}$
kyselina pantotenová	$5 \cdot 10^{-3}$

Tabulka 1: A+N médium
(pokračování)

Složení:	Koncentrace (mg/l)
p-aminobenzoát	$5 \cdot 10^{-3}$
kyselina listová	$2 \cdot 10^{-3}$
vitamín B12	$5 \cdot 10^{-3}$
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	$100 \cdot 10^{-3}$
MnCl ₂ ·4H ₂ O	$90 \cdot 10^{-3}$
H ₃ BO ₃	$300 \cdot 10^{-3}$
CoCl ₂ ·6H ₂ O	$200 \cdot 10^{-3}$
CuCl ₂ ·2H ₂ O	$10 \cdot 10^{-3}$
NiCl ₂ ·6H ₂ O	$20 \cdot 10^{-3}$
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	$30 \cdot 10^{-3}$
EDTANa ₂ ·2H ₂ O	$5 \cdot 10^{-3}$
FeSO ₄ ·7H ₂ O	$2 \cdot 10^{-3}$

(pH roztoku se po přidání kyseliny pikolinové upraví na hodnotu 7,0)

Tabulka 2

Složení média obsahující minerální soli:

- kyselina pikolinová	2	g/l
- MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,8	g/l
- CaCl ₂	0,16	g/l
- Na ₂ SO ₄	0,25	g/l
- KH ₂ SO ₄	0,4	g/l
- Na ₂ HPO ₄	0,9	g/l
- stopové prvky	1	ml/l

Složení roztoku stopových prvků:

- kyselina pikolinová	200	g/l
- NaOH	65	g/l
- ZnSO ₄ · 7H ₂ O	9	g/l
- MnCl ₂ · 4H ₂ O	4	g/l
- H ₃ BO ₃	2,7	g/l
- CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,8	g/l
- CuCl ₂ · 2H ₂ O	1,5	g/l
- NiCl ₂ · 6H ₂ O	0,18	g/l
- Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,2	g/l
- FeSO ₄ · 7H ₂ O	30	g/l

(pH roztoku se upraví na hodnotu 7,0)

Průmyslová využitelnost

Kyselina 6-hydroxypikolinová se například používá k výrobě 2-oxypyrimidinu. 2-oxypyrimidin je zase důležitým meziproduktem pro výrobu léčiv.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob mikrobiologické výroby kyseliny 6-hydroxypikolinové, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se kyselina pikolinová a/nebo její soli hydroxylují pomocí mikroorganismu rodu Alcaligenes, který roste s kyselinou pikolinovou jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie, přičemž se koncentrace kyseliny pikolinové a/nebo jejích solí zvolí tak, že nepřesáhne 10 % hmot.
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se hydroxylace provádí s mikroorganismem Alcaligenes faecalis uloženým u DSM č. 6269 a/nebo s jeho spontánními mutanty.
3. Způsob podle nároků 1 a 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se hydroxylace provádí při teplotě od 10 do 60 °C a při pH od 4 do 10.
4. Mikroorganismus Alcaligenes faecalis uložený u DSM č. 6269, který je schopný hydroxylovat kyselinu pikolinovou a/nebo její soli.

Konec dokumentu
