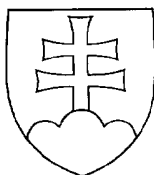


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

- (21) Číslo prihlášky: 3364-91
(22) Dátum podania: 07.11.91
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 03550/90-2
(32) Dátum priority: 08.11.90
(33) Krajina priority: CH
(40) Dátum zverejnenia: 13.05.92
(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: 09.07.97
(86) Číslo PCT:

(11) Číslo dokumentu:

278 491

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.⁶ :

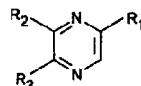
C 12P 17/12
C 12N 1/20
C 07D 241/18
C 07D 241/12//
(C 12N 1/20
C 12R 1:01)

- (73) Majiteľ patentu: Lonza A. G. (Dir.:Basel), Gampel/Wallis, CH;
(72) Pôvodca vynálezu: Kiener Andreas, Dr., Visp (Kanton Wallis), CH;
Heinzmann Klaus, Visperterminen (Kanton Wallis), CH;
Bokel Michael, Dr., Visp (Kanton Wallis), CH;

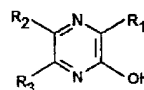
- (54) Názov vynálezu: **Mikroorganizmus Agrobacterium sp. a mikrobiologický spôsob výroby hydroxylovaných derivátov pyrazínu**

(57) Anotácia:

Sú opísané mikroorganizmy Agrobacterium sp. DSM 6136, ktoré sú schopné rásť s pyrazínom ako jediným zdrojom uhlíka, dusíka a energie. Ďalej sa opisuje spôsob výroby hydroxylovaných derivátov pyrazínu pomocou mikroorganizmov rodu Agrobacterium. Tieto mikroorganizmy hydroxylujú deriváty pyrazínu všeobecného vzorca (I) za vzniku hydroxylovaných derivátov pyrazínu všeobecného vzorca (II), význam substituentov je uvedený v opise. Vzniknuté produkty sa akumulujú v rastovom médiu. Ďalej je uvedený 6-etyl-2-hydroxy-pyrazín.



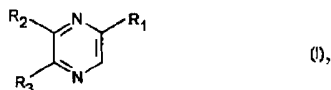
(I)



(II)

Oblasť techniky

Vynález sa týka nových mikroorganizmov, ktoré rastú s pyrazínom a hydroxylujú deriváty pyrazínu všeobecného vzorca (I)



kde R₁ znamená atóm vodíka alebo atóm halogénu a R₂ a R₃ sú rovnaké alebo rozdielne skupiny a znamenajú atóm vodíka alebo C₁-C₄-alkylovú skupinu, ale R₁, R₂ a R₃ neznamenajú súčasne atóm vodíka. Vynález sa ďalej týka spôsobu výroby hydroxylovaných derivátov pyrazínu.

Doterajší stav techniky

Hydroxylované deriváty pyrazínu sú napríklad dôležitými medziproduktmi pri výrobe metoxyalkylpyrazínov. Metoxyalkylpyrazíny sú základnou zložkou aromatických látok (Maga a Sizer, J. Agric. Food Chem., 21, 1973, str. 22-30).

Dosiaľ sú známe iba chemické spôsoby výroby hydroxylovaných pyrazínov, ako napríklad spôsob opísaný Karmasom a Spoerrim v J. Amer. Chem. Soc., 74, 1952, str. 1580-1584. Podľa tohto spôsobu sa syntetizuje napríklad 2-hydroxy-5-metylpyrazín, vychádza z metylglyoxalu a glycinamidhydrochloridu. Nevýhodou tohto spôsobu je však to, že produkt je silne znečistený.

Ďalej sú opísané výskumy, ktoré sa týkajú biologického odbúrania 2-hydroxypyrazínu v Matley a Harle, Biochem. Soc. Trans, 4, 1976, str. 492-493.

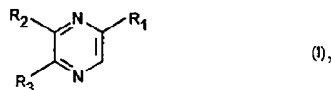
Nie je známy biotechnologický spôsob výroby polohovo špecificky hydroxylovaných derivátov pyrazínov, keď sa vychádza zo substituovaných derivátov pyrazínu a mikroorganizmov, ktoré rastú s pyrazínom.

Podstata vynálezu

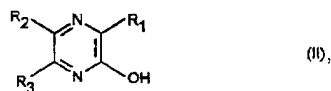
Úlohou predloženého vynálezu je nájsť nové mikroorganizmy, ktoré ekonomicky a jednoducho polohovo špecificky hydroxylujú deriváty pyrazínu biotechnologickým spôsobom, pričom deriváty pyrazínu sú predstavované všeobecným vzorcom I. Ďalšou úlohou vynálezu

je nájsť biotechnologický spôsob výroby hydroxylovaných derivátov pyrazínu.

Úloha je riešená pomocou mikroorganizmov podľa patentového nároku 1 a pomocou spôsobu výroby hydroxylovaných derivátov pyrazínu podľa patentového nároku 2. Tieto mikroorganizmy sú schopné rásť s pyrazínom ako jediným zdrojom uhlíka, dusíka a energie. Tieto mikroorganizmy premieňajú ako substrát deriváty pyrazínu všeobecného vzorca (I)



kde R₁ znamená atóm vodíka alebo atóm halogénu a R₂ a R₃ sú rovnaké alebo rozdielne skupiny a znamenajú atóm vodíka alebo C₁-C₄-alkylovú skupinu, ale R₁, R₂ a R₃ neznamenajú súčasne atóm vodíka, na hydroxylovaný derivát pyrazínu všeobecného vzorca II



kde R₁, R₂ a R₃ majú uvedený význam, pričom sa vzniknuté zlúčeniny akumulujú v rastovom médiu.

Podľa vynálezu prichádzajú do úvahy všetky mikroorganizmy, ktoré využívajú pyrazín ako jediný zdroj uhlíka, dusíka a energie a ktoré sa bežnými mikrobiologickými technikami oddeľujú napríklad z prsti, pôdných vzoriek, čistiacich zariadení, mravenísk a kompostov.

Je možné vhodne použiť všetky gram-pozitívne a gram-negatívne mikroorganizmy, ktoré odbúravajú pyrazín a ktoré hydroxylujú ako substrát derivát pyrazínu všeobecného vzorca (I) za vzniku hydroxylovaného derivátu pyrazínu všeobecného vzorca (II) a ten akumulujú v rastovom médiu.

Výhodným mikroorganizmom je Agrobacterium radiobacter DRS 3 s č. DSM 6136, ktorý je ďalej na základe podrobných identifikačných údajov označovaný ako mikroorganizmus Agrobacterium sp. č. DSM 6136. Tento mikroorganizmus bol uložený 7. 9. 1990 do Nemeckej zbierky mikroorganizmov (DSM) a bunkových kultúr GmbH, Mascherodeweg 1b, 3300 Braunschweig/NSR.

Vedecký opis Agrobacterium sp. (č. DSM 6136)

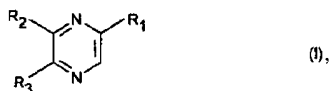
bunková forma	tyčinky	ADH	-
šírka µm	0,6-0,8		
dĺžka µm	1,5-3,0	LDC	-
pohyblivosť	+	ODC	-
gram-reakcie	-	ONPG	+
lýza 3 %-ným KOH	+		
aminopeptidáza (Cerny)	+	VP	-
spóry	-	indol	-
oxidáza	+	NO ₂ z NO ₃	+
kataláza	W	denitrifikácia	+
rast		fenylalaníndesamináza	-
anaerobný	-		
37/41 °C	-/-	lecitináza	-

Vedecký opis *Agrobacterium* sp. (č. DSM 6136)

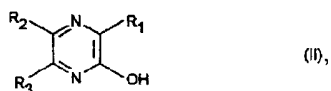
bunková forma	tyčinky	ADH	-
šírka μm	0,6-0,8		-
dĺžka μm	1,5-3,0	LDC	-
pohyblivosť	+	ODC	-
gram-reakcie	-	ONPG	+
lýza 3 %-ným KOH	+		
aminopeptidáza (Cerny)	+	VP	-
spóry	-	indol	-
oxidáza	+	NO_2 z NO_3	+
kataláza	W	denitrifikácia	+
rast		fenylalaníndesamináza	-
anaerobný	-		
37/41 °C	-/-	lecitináza	-
pH 5,6	-		
Mac-Conkey-agar	+	uréaza	+
SS-agar	-		
cetrimid-agar	-	Simmon-citrát	-
2 % NaCl	-		
		malonát	-
pigmenty	-		
nedifundujúce	-	ketolaktóza	-
difundujúce	-		
fluoreskujúce	-	hydrolyza	
pyokyanín	-	škrobu	-
		želatiny	-
kyselina z (OF-test)		kaseínu	-
glukózy aeróbne	-	DNA	-
glukózy anaeróbne	-	tween 80	-
		eskulínu	+
plyn z glukózy	-		
		odbúranie tyrozínu	-
kyselina z (ASS)			
glukózy	+	alkalizácia	
fruktózy	+	lakmusového mlieka	+
xylózy	+		
etanolu	+	potreba rastovej látky	-
m-erytritolu	+		
melicitózy	-	využitie substrátu	
arabínózy	+	acetát	+
sacharózy	+	adipát	-
celobiózy	+	kaprát	-
trehalózy	+	citrát	-
ramnózy	+	glykolát	+
dulcitu	-	laktát	+
sorbitu	+	levulinát	-
glycerolu	+	malát	+
malonátu	-		
fenylacetátu	-		
suberátu	-		
sebakínátu	-		
m-tartrátu	-		
L-arabínózy	+		
fruktózy	+		
glukózy	+		
manózy	+		
maltózy	+		
xylózy	+		
fukózy	-		
mannitu	+		
2-ketoglukonátu	-		
N-acetylglukozaminu	+		
L-asparátu	+		
L-serínu	+		
L-glutamátu	+		
L-histidínu	-		
hydroxybutyrátu	-		
betainu	+		
metylamínu	-		
melanolu	-		
etanolu	-		

hlavné chinónové zložky: ubiquinón 10

Pri spôsobe výroby hydroxylovaných derivátov pyrazínu sa pomocou mikroorganizmov biotransformuje derivát pyrazínu všeobecného vzorca (I)



kde R₁ znamená atóm vodíka alebo atóm halogénu a R₂ a R₃ sú rovnaké alebo rozdielne skupiny a znamenajú atóm vodíka alebo C₁-C₄-alkylovú skupinu, ale R₁, R₂ a R₃ neznamenajú súčasne atóm vodíka, na hydroxylovaný derivát pyrazínu všeobecného vzorca (II)



kde R₁, R₂ a R₃ majú uvedený význam. Obohatený produkt sa izoluje.

Výhodne sa pomocou uvedených mikroorganizmov vyrábajú hydroxylované deriváty pyrazínu, kde R₁ znamená atóm vodíka alebo atóm chlóru a R₂ a R₃ sú rovnaké alebo rozdielne skupiny a znamenajú atóm vodíka, metylovú skupinu alebo etylovú skupinu, avšak R₁, R₂ a R₃ neznamenajú súčasne atóm vodíka.

Takto sa pomocou uvedených mikroorganizmov vyrobí nový hydroxylovaný derivát pyrazínu, 6-etyl-2-hydroxypyrazín.

Zvyčajne sa mikroorganizmy pred vlastným postupom (reakcia substrátu) kultivujú v médiu, ktoré obsahuje rastový substrát.

Rastový substrát pyrazín sa používa v množstve od 0,001 až 10 % hmotnostných, vzťahnuté na kultivačné médium, výhodne v množstve od 0,001 až 5 % hmotnostných, vzťahnuté na kultivačné médium.

Enzýmy mikroorganizmu, ktoré zodpovedajú za hydroxyláciu, sú vhodne indukované pyrazínom.

Zlúčenina použitá na indukciu môže byť prítomná buď počas priebehu reakcie derivátu pyrazínu (substrátu), alebo sa zamedzí dávkovanie tejto zlúčeniny v priebehu reakcie. Výhodne sa zamedzí dávkovanie zlúčeniny používanej na indukciu v priebehu reakcie derivátu pyrazínu buď ukončením dávok alebo odstredením buniek.

Pred pridaním substrátu sa kultivujú bunky až do optickej hustoty 100 pri 650 nm, výhodne až do optickej hustoty od 10 do 60 pri 650 nm.

Ako živné médium pre mikroorganizmy je možné tak pre kultiváciu, ako aj pre vlastný spôsob použiť v odbore bežne používané médiá. Výhodne sa používa médium, ktorého zloženie je uvedené v tabuľke 1. Vlastný postup potom zvyčajne prebieha s bunkami v pokoji.

Derivát pyrazínu všeobecného vzorca (I) sa ako substrát môže pridávať k bunkovej suspenzii jednorazovo alebo kontinuálne, výhodne tak, že koncentrácia substrátu v kultivačnom médiu nepresiahne 20 % (hmotn./obj.), pričom skratka (hmotn./obj.) znamená hmotnosť na objem. Zvlášť výhodne, ak nepresiahne koncentrácia substrátu v kultivačnom médiu 5 % (hmotn./obj.).

Reakcia sa účelne uskutočňuje v rozmedzí pH od 4 do 10, výhodne od 6 do 8.

Zvyčajne sa reakcia uskutočňuje pri teplote od 0 do 55 °C, výhodne pri 20 až 40 °C.

Po reakcii trvajúcej zvyčajne 5 až 100 hodín, sa izolujú hydroxylované deriváty pyrazínu známym spôsobom, napríklad extrakciou vhodným organickým rozpúšťadlom. Účelne sa hydroxylované deriváty pyrazínu izolujú extrakciou chlorovanými organickými rozpúšťadlami, ako sú napríklad chlorované uhľovodíky alebo etylacetát.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Izolácia mikroorganizmov metabolizujúcich pyrazín

Aeróbne mikroorganizmy metabolizujúce pyrazín sa koncentrujú v A+N-médiu (Tabuľka 1) s prídavkom 0,1 % hmotn./obj. pyrazínu ako jediného zdroja uhlíka, dusíka a energie. Všeobecné postupy pre izoláciu mikroorganizmov sú napríklad opísané v "G. Drews, Mikrobiologisches Praktikum, 4. vydanie, Springer Verlag, 1983".

Ako inokulum sa použijú vzorky z prsti, čistiacich zariadení, kompostov a mravenísk. Koncentráty sa pestujú v trepacích bankách pri 30 °C. Po trojnásobnom preočkovani do čerstvého média sa koncentráty rozotrut na rovnaké médium s prídavkom 16 g agaru na liter a inkubujú sa pri 30 °C. Po niekoľkonásobnom rozotretí na agarové médium je možné izolovať čisté kultúry.

Tabuľka 1: A+N-médium

Zloženie	Koncentrácia (mg/ml)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2000
Na_2HPO_4	2000
KH_2PO_4	1000
NaCl	3000
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	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	$10 \cdot 10^{-3}$
riboflavín	$5 \cdot 10^{-3}$
amid kyseliny nikotínovej	$5 \cdot 10^{-3}$
tiamínhydrochlorid	$2 \cdot 10^{-3}$
biotín	$2 \cdot 10^{-3}$
kyselina pantotenová	$5 \cdot 10^{-3}$
p-aminobenzoát	$5 \cdot 10^{-3}$
kyselina listová	$2 \cdot 10^{-3}$
vitamín B ₁₂	$5 \cdot 10^{-3}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$100 \cdot 10^{-3}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	$90 \cdot 10^{-3}$
H_3BO_3	$300 \cdot 10^{-3}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	$200 \cdot 10^{-3}$
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$10 \cdot 10^{-3}$
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	$20 \cdot 10^{-3}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$30 \cdot 10^{-3}$
$\text{EDTANa}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$5 \cdot 10^{-3}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$2 \cdot 10^{-3}$

(pH roztoku sa nastaví na hodnotu 7,0).

Příklad 2**Přeměna 3-chlórpyrazínu na 3-chlór-2-hydroxypyrazín**

Agrobacterium sp. (DSM-č. 6136) v A+N-médii s 0,1 %-ným hmotn./obj. pyrazínem sa kultivuje vo fermentore pri hodnote pH 7 a pri teplote 30 °C. Potom sa bunky odstredia, resuspendujú opäť v A+N-médii a nastaví sa optická hustota 10 pri 650 nm. Táto bunková suspenzia sa dá do trepacej banky a zmieša sa s 26 mmol 3-chlórpyrazínu na liter (0,3 % hmotn./obj.). Po inkubácii

pri 30 °C počas 8 hodín na trepacom zariadení sa nahromadí 20 mmol 3-chlór-2-hydroxypyrazínu na liter, čo zodpovedá 77 %-nému výťažku.

5

5
Příklady 3 až 5 sa uskutočňujú podľa príkladu 2 a sú súhrnne uvedené v tabuľke 2.

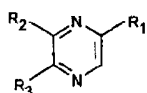
Poloha hydroxylovej skupiny sa určí podľa Mac Donalda JC, Bishopa GG, Mazureka (1976), Tetrahedron 32, str. 655 ad.

Tabuľka 2

Príklad	Substrát	Koncentrácia heterocyklu v médiu % (hmotn./obj.)	Reakčný čas (h)	Konečný produkt	Výtťažok (%)
3	2-metylpyrazín	0,2	1	2-hydroxy-6-metylpyrazín	50
4	2-etylpyrazín	0,2	24	6-etyl-2-hydroxypyrazín	20
5	2,3-dimetylpyrazín	0,2	10	2-hydroxy-5,6-dimetylpyrazín	20

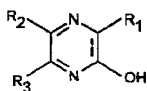
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Mikroorganizmus *Agrobacterium* sp. DSM 6136, ktorý je schopný rásť s pyrazínom ako jediným zdrojom uhlíka, dusíka a energie, a ako substrát premieňať deriváty pyrazínu všeobecného vzorca (I)



(I),

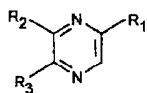
kde R₁ znamená atóm vodíka alebo atóm halogénu a R₂ a R₃ sú rovnaké alebo rozdielne a znamenajú atóm vodíka alebo C₁-C₄-alkylovú skupinu, ale R₁, R₂ a R₃ neznamenajú súčasne atóm vodíka, na hydroxylovaný derivát pyrazínu všeobecného vzorca (II)



(II),

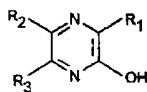
kde R₁, R₂ a R₃ majú uvedený význam, pričom sa vzniknutá zlúčenina akumuluje v rastovom médiu.

2. Spôsob mikrobiologickej výroby hydroxylovaných derivátov pyrazínu, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa pomocou mikroorganizmu rodu *Agrobacterium*, ktorý je schopný rásť s pyrazínom ako jediným zdrojom uhlíka, dusíka a energie premieňa ako substrát derivát pyrazínu všeobecného vzorca (I)



(I),

kde R₁ znamená atóm vodíka alebo atóm halogénu a R₂ a R₃ sú rovnaké alebo rozdielne a znamenajú atóm vodíka alebo C₁-C₄-alkylovú skupinu, ale R₁, R₂ a R₃ neznamenajú súčasne atóm vodíka, na hydroxylovaný derivát pyrazínu všeobecného vzorca (II)



(II),

kde R₁, R₂ a R₃ majú uvedený význam a že sa obohatený produkt izoluje.

3. Spôsob podľa nároku 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa reakcia uskutočňuje pomocou mikroorganizmu *Agrobacterium* sp. uloženého u DSM pod číslom 6136 a/alebo pomocou jeho spontánnych mutantov, ktoré si zachovávajú funkčnú schopnosť materského organizmu.

4. Spôsob podľa nároku 2 alebo 3, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa účinné hydroxyľujúce enzýmy mikroorganizmu indukujú pyrazínom.

5. Spôsob podľa aspoň jedného z nárokov 2 až 4, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa premena uskutočňuje pri jednorazovom alebo kontinuálnom pridaní substrátu tak, že koncentrácia substrátu v kultivačnom médiu nepresiahne 20 % hmotnosti na objem.

6. Spôsob podľa aspoň jedného z nárokov 2 až 5, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa premena uskutočňuje pri hodnote pH od 4 do 10.

7. Spôsob podľa aspoň jedného z nárokov 2 až 6, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa premena uskutočňuje pri teplotách od 0 do 55 °C.

8. 6-Etyl-2-hydroxypyrazín.

Koniec dokumentu