

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12P 17/12

C12N 1/20

/(C12P17/12, C12

R1:01)

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 93103482.5

[45]授权公告日 2000 年 4 月 26 日

[11]授权公告号 CN 1051803C

[22]申请日 1993.2.26 [24]颁证日 2000.1.22

[21]申请号 93103482.5

[30]优先权

[32]1992.2.26 [33]JP [31]39562/1992

[32]1992.3.31 [33]JP [31]77461/1992

[73]专利权人 三菱化学株式会社

地址 日本东京都

[72]发明人 安田磨理 大岸治行 佐藤胜利

森本裕纪 长泽透

[56]参考文献

EP434035A1 1991. 6.26 C12017/12

US5082777 1992. 1.21 C12017/12

审查员 董 芳

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 齐曾度

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图页数 0 页

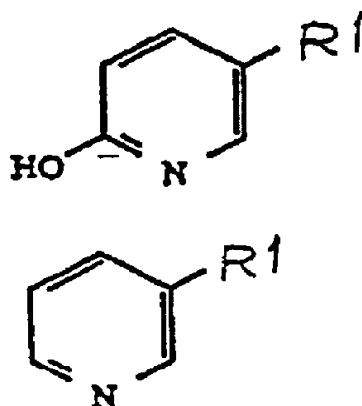
[54]发明名称 制备 6-羟基含氮六元环化合物的方法

[57]摘要

制备下式的 6-羟基含氮六元环化合物的方法:

其中 R¹表示氰基、氨基甲酰基、甲酰基,该方法包括使下式的化合物

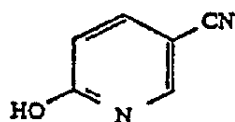
其中 R¹如上定义,与微生物在含水介质中反应。在吩噻甲硫酸酯的存在下 该反应可提高上述反应的效率。



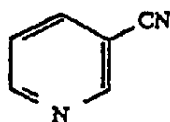
ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 制备下式的 6-羟基-3-氰基吡啶的方法:



该方法包括使下式的 3-氰基吡啶

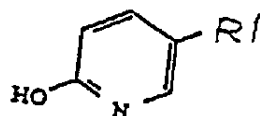


与微生物在含水介质中反应且将得到的产物从所述的介质中回收, 其中所述的微生物选自 *Achromobacter xerosis*, *Agrobacterium radiobacter*, *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes aquamarinus*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter globiformis*, *Arthrobacter fragilis*, *Bacterium cyclo-oxydans*, *Bordetella bronchiseptica*, *Brevibacterium butanicum*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Corynebacterium xerosis*, *Erwinia herbicola*, *Flavobacterium suaveolens*, *Micrococcus varians*, *Micrococcus morrhuae*, *Comamonas acidovorans*, *Comamonas testosteroni*, *Pseudomonas dacunhae*, *Pseudomonas maltophila*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas hydantoinophilum*, *Pseudomonas putida*, *Sarcina lutea*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Xanthobacter flavus* 和 *Pseudomonas fluorescens*, 且所述的反应在搅拌、有氧、pH 4.0-9.0 及 20-50°C 的温度下进行。

09 08 28

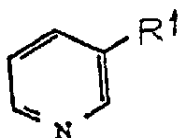
2. 按权利要求 1 的方法, 其中所述的反应在吩嗪甲硫酸酯的存在下进行。

3. 制备下式的 6-羟基-3-氨基甲酰基吡啶或 6-羟基-3-甲酰基吡啶的方法:



其中 R¹ 表示氨基甲酰基或甲酰基,

该方法包括使下式的 3-氨基甲酰基吡啶或 3-甲酰基吡啶



与微生物在含水介质中反应且将得到的产物从所述的介质中回收, 其中所述的微生物选自 *Serratia marcescens* 和 *Pseudomonas fluorescens*, 且所述的反应在搅拌、有氧、pH 4.0-9.0 及 20-50℃ 的温度下进行。

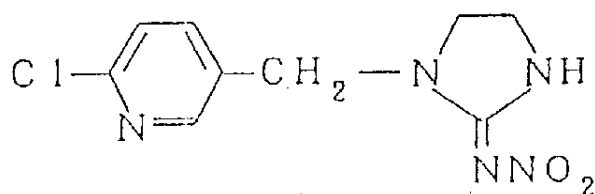
4. 按权利要求 3 的方法, 其中所述的反应在吩嗪甲硫酸酯的存在下进行。

说明书

制备 6-羟基含氮六元环化合物的方法

本发明涉及制备 6-羟基含氮六元环化合物的方法。更具体地说,本发明涉及制备 6-羟基吡啶衍生物及 6-羟基吡嗪衍生物的方法,它们利用微生物反应,作为制备药物、农药、染料或其类似物的中间体是有用的。

各种含氮六元环化合物如二氢吡啶、烟酸等,可以作为制备药物、农药、染料或其类似物的重要合成中间体。例如,最近研究了一种作用于烟酸受体的新型杀虫剂,和由下面通式所表示的 Imidacloprid (Nippon Tokushu Noyaku Co.) 是这种新杀虫剂其中之一



作为制备 Imidacloprid 的中间体,3-氯甲基-6-氯吡啶是非常重要的。

迄今制备在 3-及 6-位上有取代基的吡啶的各种合成路线已被深入研究,然而,没有方法是采用有机化学方法在 3-取代吡啶上选择性地引入 6-位取代基。另一方面,采用属于假单胞菌属、芽孢杆菌属或无色杆菌属的微生物,在烟酸 6-位上引入羟基基团的方法——该方法可以分解烟酸,已在日本专利公开 (KOKAI) Nos. 60-196193 及 60-196194 中有叙述。然而,在上述方法应用于实际用途中时,有必要更有效率地表示活性。

对于其它 3-取代含氮六元环化合物没有报导。

本发明目的在于制备具有下面通式 (II) 的 6-羟基含氮六元环化合物的方法：



其中 R^1 表示羧基、氨基甲酰基、氰基、甲酰基、 C_1-C_5 羟烷基、 C_2-C_6 烷氧羰基、羧乙烯基、羧甲基或肟基； R^2 表示氢原子或羧基；A 表示碳原子或氮原子，条件是当 R^2 是氢原子而 A 是碳原子时， R^1 不为羧基。该方法包括使具有下面通式 (I) 的含氮 6-元环化合物：



其中 R^1 、 R^2 及 A 的定义如通式 (II)

在含水介质中与微生物或物理化学处理过的微生物反应。

本发明将详述如下。

按本发明制备的 6-羟基含氮六元环化合物由上面的通式 (II) 表示。 R^1 所定义的 C_1-C_5 羟烷基举例包括羟甲基、1-羟乙基、2-羟乙基、3-羟乙基、3-羟丙基、4-羟丁基等；而 C_2-C_6 烷氧羰基包括甲氧羰基、乙氧羰基、正丙氧羰基、异丙氧羰基、正丁氧羰基等。

通式 (I) 的起始含氮六元环化合物包括烟酰胺、3-氰基吡啶、喹啉酸、烟碱醛、吡嗪酰胺等。所对应的 6-羟基含氮六元环化

合物可以按照本发明的方法制备。

本发明采用的优选的微生物举例包括选自属于土壤杆菌属 (Genus Agrobacterium)、节杆菌属 (Genus Arthrobacter)、博代氏 (杆) 菌属 (Genus Bordetella)、短杆菌属 (Genus Brevibacterium)、假单胞菌属 (Genus Pseudomonas)、无色杆菌属 (Genus Achromobacter)、Comamonas 菌属、欧文氏菌属 (Genus Erwinia)、无芽胞杆菌属 (Genus Bacterium)、棒状杆菌属 (Genus Corynebacterium)、沙雷菌属 (Genus Serratia)、八叠球菌属 (Genus Sarcina)、黄色杆菌属 (Genus Xanthobacter)、产碱菌属 (Genus Alcaligenes)、产黄菌属 (Genus Flavobacterium) 及小球菌属 (Genus Micrococcus) 的微生物。这些微生物经物理化学处理过的也可采用。本发明上述方法中使用的微生物不应局限于上面列出的有机体, 只要它们具有向通式 (I) 的含氮六元环化合物 6-位选择性地引入羟基的能力就可以。

属于土壤杆菌属的微生物举例包括放射形土壤杆菌、根癌病土壤杆菌、Agrobacterium Viscosum 等。更具体地举例: 放射形土壤杆菌 NRRL B-11291 (Agricultural Research Service Culture Collection), 根癌病土壤杆菌 IAM 13129 (Research Institute of Applied Microbiology, Tokyo University), A. viscosum IFO 13652 (Institute for Fermentation, Osaka) 等。

属于节杆菌属的微生物举例包括 Arthrobacter globiformis, Arthrobacter fragilis 等。更具体地举例: A. globiformis IFO 12137 (Institute for Fermentation, Osaka), A. fragilis FERM P-4350 (Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology) 等。

属于博代氏 (杆) 菌属的微生物举例包括支气管败血性博

代氏（杆）菌等。更具体地举例：支气管败血性博代氏（杆）菌 ATCC 4617 (American Type Culture Collection) 等。

属于短杆菌属的微生物举例包括 Brevibacterium butanicum, Brevibacterium ketoglutamicum 等。更具体地举例：B. butanicum ATCC 21196 (American Type Culture Collection), B. ketoglutamicum ATCC 15587 (American Type Culture Collection) 等。

属于假单胞菌属的微生物举例包括 Pseudomonas dacunhae, 嗜麦芽假单胞菌, Pseudomonas chlororaphis, Pseudomonas hydantoinophilum, 恶臭假单胞菌、荧光假单胞菌等。更具体地举例：P. dacunhae ATCC 13261 (American Type Culture Collection), 嗜麦芽假单胞菌 ATCC 13637 (American Type Culture Collection), P. chlororaphis IFO 3904 (Institute for Fermentation, Osaka), P. hydantoinophilum FERM P-4347 (Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Tehnology), 恶臭假单胞菌 ATCC 21244 (American Type Culture Collection), 荧光假单胞菌 IFO 3903 (Institute for Fermentation, Osaka) 等。

属于无色杆菌属的微生物举例包括 Achromobacter Xerosis 等。更具体地举例：A. xerosis IFO 12668 (Institute for Fermentation, Osaka) 等。

属于 Comamonas 属的微生物举例包括 Comamonas acidovorans, Comamonas testosteroni 等。更具体地举例：C. acidovorans NCIMB 9289 (National Collection of Industrial And Marine Bacteria Ltd.), C. testosteroni ATCC 11996 (American Type Culture Collection) 等。

属于欧文氏菌属的微生物举例包括草生欧文氏菌等。更具体地举例：草生欧文氏菌 ATCC 21434 (American Type Culture

Collection) 等。

属于无芽胞杆菌属的微生物举例包括 Bacterium cyclo-oxydans 等。更具体地举例：B. cyclo-oxydans ATCC 12673 (American Type Culture Collection) 等。

属于棒状杆菌属的微生物举例包括干燥棒状杆菌等。更具体地举例：干燥棒状杆菌 NCTC 9755 (National Collection of Type Cultures) 等。

属于沙雷菌属的微生物举例包括 Serratia liquefaciens，粘质沙雷菌等。更具体地举例：S. liquefaciens IFO 12979 (Institute for Fermentation, Osaka)，粘质沙雷菌 IFO 3054 (Institute for Fermentation, Osaka)，粘质沙雷菌 IFO 12648 (Institute for Fermentation, Osaka) 等。

属于八叠球菌属的微生物举例包括 Sarcina lutea 等。更具体地举例：S. lutea ATCC 9341 (American Type Culture Collection) 等。

属于黄色杆菌属的微生物举例包括 Xanthobacter flavus 等。更具体地举例：X. flavus NCIMB 10071 (National Collections of Industrial And Marine Bacteria Ltd.) 等。

属于产碱菌属的微生物举例包括 Alcaligenes eutrophus、Alcaligenes aquamarinus、粪产碱菌等。更具体地举例：A. eutrophus ATCC 17699 (American Type Culture Collection)、A. aquamarinus FERM P-4229 (Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology)、粪产碱菌 IFO 13111 (Institute for Fermentation, Osaka) 等。

属于产黄菌属的微生物举例包括 Flavobacterium Suaveolens、Flavobacterium aminogenes、Flavobacterium arborescens、Flavobacterium dehydrogenans、Flavobacterium heparinum 等。更具体地举

例：F. suaveolens IFO 3752 (Institute for Fermentation, Osaka)、F. aminogenes FERM P—3134 (Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology)、F. arborescens IFO 3750 (Institute for Fermentation, Osaka)、F. dehydogenans ATCC 13930 (American Type Culture Collection)、F. heparinum IFO 12017 (Institute for Fermentation, Osaka) 等。

属于小球菌属的微生物举例包括 *Micrococcus varians*、*Micrococcus morrhuae* 等。更具体地举例：*M. varians* IAM 1314 (Institute of Applied Microbiology, The University of Tokyo)、*M. morrhuae* IAM 1711 (Institute of Applied Microbiology, The University of Tokyo) 等。

对培养这些微生物的营养必需品没有限制，用于微生物的常规的营养必需品就可以使用。例如，碳源包括糖如葡萄糖、蔗糖、果糖、甘油、山梨（糖）醇、糖蜜、淀粉水解液或类似物，而有机酸比如乙酸、富马酸或类似物；氮源包括硝酸盐、铵盐、玉米浆、酵母抽提物、肉提取物、酵母粉、大豆水解产物、棉籽粉、多肽（polypeptone）、Benton 等；矿物质包括磷酸钾、磷酸钙、磷酸钠、硫酸镁、硫酸锰、氯化钠等。矿物质如铁离子、钴离子、铜离子或其类似物源加到培养物中对诱导酶的产生是有利的。

培养在需氧条件 20—40℃ 温度下，优选在 30—35℃，pH 4.0—9.0，优选 pH 5.0—7.0 时进行是有利的，经过 20—24 小时一段时间直到微生物种群增加到约 $OD_{660} 5$ 到 $OD_{660} 40$ 。

用物理化学处理过的微生物在本发明中是指微生物提取物、粉碎的微生物及它们的纯化产品。该纯化产品通过已知的方法得到，如用硫酸铵分离、离子交换色谱、硅胶过滤或类似方法。在本发明方法中，含氮六元环化合物 (I) 可与微生物

本身（活细胞或干细胞）或物理化学处理过的微生物反应。

通过培养得到的微生物或物理化学处理过的微生物可固定于凝胶上，如聚丙烯酰胺凝胶、光致交联树脂、carrageenan 或类似物，然后可以与含氮六元环化合物 (I) 反应。

当化合物 (I) 与微生物自身可以反应时，化合物 (I) 可以加到已充分生长的微生物中。含氮六元环化合物 (I) 的合适的浓度在 0.1% 重量及饱和浓度之间，优选 1.0 到 5.0% 重量。反应在 20—50℃、优选 30—40℃，pH 4.0—9.0、优选 5.0—7.0，在 2—24 小时通常 20—24 小时一段时间内、在需氧条件和搅拌下进行。

当化合物 (I) 可以与物理化学处理过的微生物反应时，化合物加到水溶液中，如含约 2—15mg（蛋白质重量）微生物提取物或粉碎的微生物的 0.01 到 1M 磷酸盐缓冲液（pH 6—9）。

当微生物自身或处理过的微生物固定后，含氮六元环化合物 (I) 在上述条件下，在一装有搅拌器的反应器中，与被固定的微生物反应。或者，含有含氮六元环化合物的液体通过装填着被固定微生物的柱。

羟基化的效率在本发明中可通过在吩嗪甲硫酸酯（phenazine methosulfate）的存在下进行反应来提高。在这种情况下，吩嗪甲硫酸酯（N—甲基吩嗪 翁 甲硫酸酯或 5—甲基吩嗪 翁 甲硫酸酯）需要存在于反应混合物中。更具体地说，吩嗪甲硫酸酯可与化合物 (I) 一起、在与微生物自身或处理过的微生物反应时同时加入。在反应混合物中合适的吩嗪甲硫酸酯的浓度为 1—100mM，优选 5—100mM。

本发明中使用的含水介质可为水或缓冲液如醋酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液等。对于化合物 (I) 过量的所说的含水介质

作为底物是优选的。

这样得到的 6-羟基含氮六元环化合物可由反应混合物中、采用常规的方式萃取，所用的溶剂如甲醇、水或类似物，并可通过装有 ODS 树脂或类似物的柱色谱纯化。

得自本发明的 6-羟基含氮六元环化合物 (II) 如 3-氰基-6-羟基吡啶，作为制备药物、农药、染料或类似物的中间体是有用的。例如，3-氰基-6-羟基吡啶采用常规的方法可以很容易地转化成 3-氯甲基-6-羟基吡啶，它是农药的中间体。

提出下面详细的实施例说明本发明某些特定的内容。这些实施例只是代表性的而不应作为任何方面的限制。

实施例 1

向装备有脐 (navels) 的锥形烧瓶中，加入含 1g 酵母抽提物、1g 葡萄糖、0.3g K_2HPO_4 、0.1g KH_2PO_4 、1mg $FeSO_4$ 、50mg $MgSO_4$ 、1mg $MnSO_4$ 及 100ml 水的营养液，所得的混合物在 120℃ 消毒 20 分钟，冷却到 30℃ 后，混合物加入各自消毒的 1mg $CuSO_4$ 及 0.2g 3-氰基吡啶作为诱导剂。表 1 中所列的微生物之一在营养琼脂培养基中孵育 24 小时后，用铂环接种到上述混合物中，采用 160rpm 的旋转摇动器使混合物在 30℃ 孵育 24 小时。24 小时后、肉汤回收并离心。分离的细胞悬浮并用 0.02mol 醋酸盐缓冲液 (pH 5.5) 洗涤，再离心得到剩余细胞。向 100ml 反应器中加入 20ml 1.0% 3-氰基吡啶 (pH 5.5)，混合物加热到 30℃ 并与上面得到的剩余细胞混合。所得的混合物充分搅拌 24 小时得到 3-氰基-6-羟基吡啶。产物通过 HPLC、IR 及 1H -NMR 鉴定。表 I 给出了结果。

表 1

所用微生物	产量 (mg)
<u>Achromobacter xerosis</u> (IFO 12668)	2.0
<u>Agrobacterium radiobacter</u> (NRRL B-11291)	1.0
<u>Alcaligenes eutrophus</u> (ATCC 17699)	3.0
<u>Alcaligenes aquamarinus</u> (FERM P-4229)	2.0
<u>Alcaligenes faecalis</u> (IFO 13111)	2.0
<u>Arthrobacter globiformis</u> (IFO 12137)	3.0
<u>Arthrobacter fragilis</u> (FERM P-4350)	2.0
<u>Bacterium cyclo-oxydans</u> (ATCC 12673)	13.0
<u>Bordetella bronchiseptica</u> (ATCC 4617)	10.0
<u>Brevibacterium butanicum</u> (ATCC 21196)	12.0
<u>Brevibacterium ketoglutamicum</u> (ATCC 15587)	2.0
<u>Corynebacterium xerosis</u> (NCTC 9755)	19.0
<u>Erwinia herbicola</u> (ATCC 21434)	2.0
<u>Flavobacterium guaveolens</u> (IFO 3752)	1.0
<u>Micrococcus varians</u> (IAM 1314)	1.0
<u>Micrococcus morrhuae</u> (IAM 1711)	1.0
<u>Comamonas acidovorans</u> (NCIMB 9289)	72.0
<u>Comamonas testosteroni</u> (ATCC 11996)	24.0
<u>Pseudomonas dacunhae</u> (ATCC 13261)	12.0
<u>Pseudomonas maltophila</u> (ATCC 13637)	19.0
<u>Pseudomonas chlororaphis</u> (IFO 3904)	1.0
<u>Pseudomonas hydantoinophilum</u> (FERMP-4347)	5.0
<u>Pseudomonas putida</u> (ATCC 21244)	1.0
<u>Sarcina lutea</u> (ATCC 9341)	3.0
<u>Serratia liquefaciens</u> (IFO 12979)	1.0
<u>Serratia marcescens</u> (IFO 3054)	1.0
<u>Serratia marcescens</u> (IFO 12648)	2.0
<u>Xanthobacter flavus</u> (NCIMB 10071)	1.0

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.42 (1H, d, $J_{4,5}=9.9\text{Hz}$, H-5), 7.67 (1H, dd, $J_{4,5}=9.9\text{Hz}$, $J_{2,4}=2.4\text{Hz}$, H-4), 8.26 (1H, d, $J_{2,4}=2.4\text{Hz}$, H-2), 12.40 (1H, bs, OH)

实施例 2

将含 1g 肉提取物、1g 苹果酸、0.1g K_2HPO_4 、1g 烟酸、500mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 100ml 水的营养溶液 (pH 7.0) 加到 Sakaguchi 烧瓶中, 内容物在 120°C 消毒 20 分钟。冷却到 30°C 后, 加入 2ml 消毒的金属溶液 (如表 2 所示)。在营养琼脂培养基中孵育 24 小时后, 粘质沙雷菌 (IFO 12648) 及荧光假单胞菌 (IFO 3903) 各自用铂环接种, 在一往复振动器中于 30°C 孵育 36 小时。回收培养的产物后, 细胞离心。分离的细胞悬浮并用 0.1mol 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 洗涤并离心得到细胞。所得的细胞通过超声波磨成粉状并采用超离心。所得沉淀混合并悬浮于置于冰上的 0.3% Triton X 及 0.1% 十六 (烷) 基吡啶 鎓氯化物中 1 小时, 再超离心。上清液作为粗酶溶液使用。沉淀再经过同样的步骤, 并将上清液加到粗酶溶液中。粗酶溶液通过在 DEAE Sephacel, Phenyl Sepharose, Butyl Toyopearl 或类似物上的柱色谱纯化。

反应由 100 μl 酶溶液与 1.5mM DCIP (2,6-二氯靛酚)、2.0ml 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0)、100 μl 3.0mM PMS (吩嗪甲硫酸酯) 及 500 μl 2mM—5mM 如表 2 所示的底物溶液混合而开始。 30°C 完成该反应 1 分钟后, 通过测量 600nm 处吸光度的变化测定活性。表 3 表示出试验结果。

表 2. 金属溶液的组成

金属	/L of DW
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	400mg
H_3BO_3	500mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	40mg
KI	100mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	400mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	400mg
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	200 mg
HCl	20ml

表 3.

底物	粘质沙雷菌	莹光假单胞菌
	IFO 12648	IFO 3903
	μM	μM
烟酰胺	213	701
吡嗪 2,3-二羧酸	19	3
烟碱醛	463	825
吡啶基甲醇	72	857
吡啶基丙醇	N. D	7
烟酸乙酯	461	539
喹啉酸	39	15
反-3-(3-吡啶基)丙烯酸	206	0.3
3-吡啶基乙酸	91	47
酰氨基吡嗪	17	14
3-吡啶乙醛肟	293	333
3-氰基吡啶	33	11

N. D. : 不确定

从实施例 1 及 2 的结果可以发现, 通过所采用的微生物的作用, 可以在含氮六元环化合物的 6-位选择性地引入羟基。