

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 915231 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 915231

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12N 1/20

C12P 17/12

C07D241/18

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 06.11.1991

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 06.11.1991

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 09.05.1992

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(32) (33) (31) Etu oikeus - Prioritet - Priority

08.11.1990 CH 3550/90

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Lonza A.G.**, Basel, Gampel/Wallis, Switzerland, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Kiener, Andreas**, Switzerland, SVEITSI, (CH)

2 • **Heinzmann, Klaus**, Switzerland, SVEITSI, (CH)

3 • **Bokel, Michael**, Switzerland, SVEITSI, (CH)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Mikrobiologinen menetelmä hydroksyloitujen pyratsiinijohdannaisten valmistamiseksi

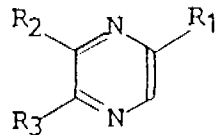
Mikrobiologiskt förfarande för framställning av hydroxylerade pyrazin derivat

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

6136 DSM

Mikrobiologinen menetelmä hydroksyloitujen pyratsiinijohdannaisten valmistamiseksi

5 Keksintö koskee uusia mikro-organismeja, jotka kasvavat pyratsiinilla ja hydroksyloivat pyratsiinijohdannaisia, joiden yleinen kaava on



I

10

jossa R₁ on vetyatomi tai halogeeniatomi ja R₂ ja R₃ ovat identtiset tai erilaiset ja ovat kumpikin vetyatomi tai C₁-C₄-alkyyli-ryhmä, jolloin kuitenkin R₁, R₂ ja R₃ eivät ole samanaikaisesti vetyatomeja, sekä menetelmää hydroksy-
15 loitujen pyratsiinijohdannaisten valmistamiseksi.

Hydroksyloidut pyratsiinijohdannaiset ovat esimerkiksi tärkeitä välituotteita metoksialkyylipyratsiinien valmistuksessa. Metoksialkyylipyratsiinit ovat aromia-
neiden tärkeitä ainesosia (Maga ja Sizer, J.Agric.Food Chem. 21 (1973) 22 - 30).
20

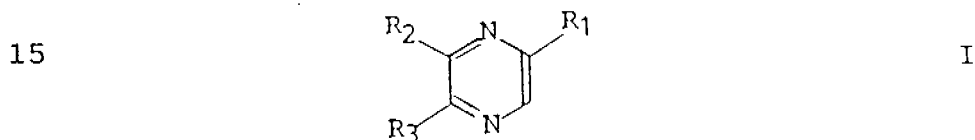
Tähän asti on tunnettu vain kemiallisia menetelmiä hydroksyloitujen pyratsiinien valmistamiseksi, kuten esimerkiksi menetelmä, jota kuvaavat Karmas ja Spoerri julkaisussa J.Amer.Chem.Soc. 74 (1952) 1580 - 1584, jossa
25 esimerkiksi syntetisoidaan 2-hydroksi-5-metyyli-pyratsiini lähtien metyyli-glyoksaalista ja glysiiniamidi-hydrokloridista. Tällä menetelmällä on kuitenkin se huono puoli, että tuote on hyvin epäpuhtas.

Edelleen tutkimuksia 2-hydroksipyratsiinin biologisesta hajoamisesta kuvataan julkaisussa Matley ja Harle, Biochem.Soc.Trans. 4 (1976) 492 - 493.
30

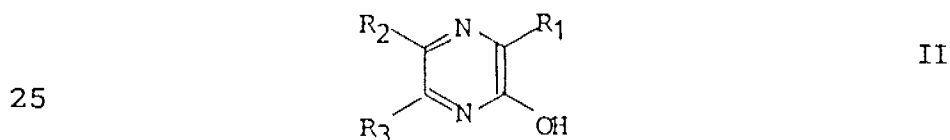
Bioteknistä menetelmää aluespesifisesti hydroksyloitujen pyratsiinijohdannaisten valmistamiseksi pyratsiinilla kasvavilla mikro-organismeilla lähtien substituoiduista pyratsiinijohdannaisista ei tunneta.
35

Keksinnön tehtävänä on löytää uusia mikro-organis-
meja, jotka hydroksyloivat taloudellisesti bioteknistä
tietä ja yksinkertaisella tavalla aluespesifisesti yleisen
kaavan I mukaisia pyratsiinijohdannaisia, sekä kehittää
5 biotekninen menetelmä hydroksyloitujen pyratsiinijohdan-
naisten valmistamiseksi.

Tämä tehtävä ratkaistiin patenttivaatimuksen 1 mu-
kaisilla mikro-organismeilla sekä patenttivaatimuksen 5
mukaisella menetelmällä hydroksyloitujen pyratsiinijoh-
10 dannaisten valmistamiseksi. Nämä mikro-organismit kykene-
vät kasvamaan käyttäen pyratsiinia ainoana hiili-, typpi-
ja energialähteenä sekä konvertoimaan substraattina py-
ratsiinijohdannaisia, joiden yleinen kaava on



jossa R_1 on vetyatomi tai halogeeniatomi ja R_2 ja R_3 ovat
identtiset tai erilaiset ja ovat kumpikin vetyatomi tai
20 C_1 - C_4 -alkyyli-ryhmä, jolloin kuitenkin R_1 , R_2 ja R_3 eivät
ole samanaikaisesti vetyatomeja, hydroksyloiduksi pyrat-
siinijohdannaiseksi, jonka yleinen kaava on



jossa R_1 , R_2 ja R_3 määritellään kuten edellä, jolloin vii-
meksi mainittua kerääntyy kasvualustaan.

Keksinnön mukaan kyseeseen tulevat kaikki mikro-
30 organismit, joille riittää pyratsiini ainoaksi hiili-,
typpi- ja energialähteeksi ja jotka valikoidaan tavan-
omaisilla mikrobiologisilla tekniikoilla, esim. maanäyt-
teistä, puhdistuslaitoksista, mullasta, muurahaiskeoista
ja komposteista.

Tarkoituksessa voidaan käyttää kaikkia gram-positiivisia ja gram-negatiivisia mikro-organismeja, jotka hajottavat pyratsiinia, ja hydroksyloivat yleisen kaavan I mukaisen pyratsiinijohdannaisen substraattina yleisen kaavan II mukaiseksi hydroksyloiduksi pyratsiinijohdannaiseksi sekä keräävät tätä kasvualustaan.

Eduellinen mikro-organismi on Agrobacterium radiobacter DRS 3, jonka hakunumero on DSM-nro 6136, ja jota seuraavissa erittäin yksityiskohtaisissa tunnistustiedoissa kutsutaan mikro-organismiksi Agrobacterium sp. (DSM-nro 6136).

Tämä kanta talletettiin 7.9.1990 talletuslaitokseen die Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) und Zellkulturen GmbH, Mascherodeweg 1b, 3300 Braunschweig, Saksa.

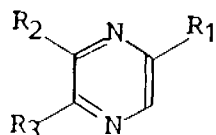
Tieteellinen kuvaus Agrobacterium sp.:stä (DSM-nro 6136):

	Solumuoto	sauvoja	ADH	-
	leveys μm	0,6 - 0,8		
20	pituus μm	1,5 - 3,0	LDC	-
	Liikkuvuus	+	ODC	-
	Gram-reaktio	-	ONPG	+
	Lyysi 3-%:isella KOH-liuoksella	+		
25	Aminopeptidaasi (Cerny)	+	VP	-
	Itiöitä	-	Indoli	-
	Oksidaasi	+	NO_2 NO_3 :sta	+
	Katalaasi	W	Denitrifikaatio	+
30	Kasvu: anaerobi	-	Fenyylialaniini-desaminaasi	-
	37/41 °C	-/-	Lesitinaasi	-
	pH 5,6	-		
35	Mac-Conkey-agar	+	Ureaasi	+
	SS-agar	-		
	Cetrimid-agar	-	Simmons-sitraatti	+
	2-%:inen NaCl-liuos	-	Malonaatti	-
	Pigmenttejä:	-		
40	ei diffundoituvia	-	Ketolaktoosi	-
	diffundoituvia	-	Hydrolyysi:	
	fluoresoivia	-	tärkkelys	-

	pyocyaniini	-	gelatiini	-
	Happoja: (OF-testi)		kaseiini	-
	glukoosi, aerob.	-	DNA	-
	glukoosi, anaerob.	-	Tween 80	-
5			eskuliini	+
	kaasua glukoosista	-	Tyrosiinin hajotus	-
	Happoja: (ASS)		Lakmusmaidon	
	glukoosi	+	alkalisointi	+
	fruktoosi	+	Kasvuainetarve	-
10	ksyloosi	+	Substraattikelpoisuus:	
	etanoli	+	asettaatti	+
	m-erytritoli	+	adipaatti	-
	meletsitoosi	-	kapraatti	-
	arabinoosi	+	sitraatti	-
15	sakkaroosi	+	glykolaatti	+
	sellobioosi	+	laktaatti	+
	trehaloosi	+	levulinaatti	-
	ramnoosi	+	malaatti	+
	dulsiitti	-		
20	sorbitoli	+		
	glyseroli	+		
	malonaatti	-		
	fenyyliaasettaatti	-		
	suberaatti	-		
25	sebasinaatti	-		
	m-tartraatti	-		
	L-arabinoosi	+		
	fruktoosi	+		
	glukoosi	+		
30	mannoosi	+		
	maltoosi	+		
	ksyloosi	+		
	fukoosi	-		
	mannitoli	+		
35	2-ketoglukonaatti	-		
	N-asetyyli-			
	glukosamiini	+		
	L-aspartaatti	+		
	L-seriini	+		
40	L-glutamaatti	+		
	L-histidiini	-		
	hydroksibutyyraatti	-		
	betaiini	+		
	metyyliamiini	-		
45	metanoli	-		
	etanoli	-		
	Pääasiallinen			
	kinoninaainesosa: ubikinoni 10			

Hydroksyloitujen pyratsiinijohdannaisten valmistamiseksi mikro-organismeilla konvertoidaan pyratsiinijohdannainen, jonka yleinen kaava on

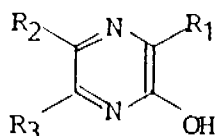
5



I

jossa R_1 on vetyatomi tai halogeeniatomi ja R_2 ja R_3 ovat identtiset tai erilaiset ja ovat kumpikin vetyatomi tai C_1 - C_4 -alkyyli-ryhmä, jolloin kuitenkin R_1 , R_2 ja R_3 eivät ole samanaikaisesti vetyatomeja, hydroksyloiduksi pyratsiinijohdannaiseksi, jonka yleinen kaava on

15



II

jossa R_1 , R_2 ja R_3 määritellään kuten edellä, ja eristetään rikastunut tuote.

Edullisesti näillä mikro-organismeilla valmistetaan hydroksyloituja pyratsiinijohdannaisia, joissa R_1 on vetyatomi tai klooriatomi ja R_2 ja R_3 ovat identtiset tai erilaiset ja ovat kumpikin vetyatomi, metyyli-ryhmä tai etyyli-ryhmä, jolloin kuitenkin R_1 , R_2 ja R_3 eivät ole samanaikaisesti vetyatomeja.

Samoin voitiin näillä mikro-organismeilla valmistaa uusi hydroksyloitu pyratsiinijohdannainen, nimittäin 6-etyyli-2-hydroksipyratsiini.

Tavallisesti mikro-organismeja viljellään ennen varsinaisen menetelmän suorittamista (substraatin konvertointia) kasvusubstraattia sisältävässä kasvualustassa.

Kasvusubstraattia pyratsiinia käytetään määrä 0,001 - 10 paino-% laskettuna kasvualustasta, edullisesti määrä 0,001 - 5 paino-% laskettuna kasvualustasta.

Mikro-organismin hydroksyloinnista vastuulliset entsyymit indusoidaan edullisesti pyratsiinilla.

Indusoinnissa käytetty yhdiste voi joko olla läsnä pyratsiinijohdannaisen (substraatin) konvertoinnin aikana tai tämän yhdisteen lisääminen keskeytetään konvertoinnin ajaksi.

Edullisesti indusoinnissa käytettyjen yhdisteiden lisääminen keskeytetään pyratsiinijohdannaisen konvertoinnin ajaksi joko lopettamalla lisääminen tai sentrifugoimalla solut.

Ennen substraatin lisäämistä solut kasvatetaan (viljellään) optiseen tiheyteen 100 650 nm:ssä, edullisesti optiseen tiheyteen 10 - 60 650 nm:ssä.

Mikro-organismien kasvualustana voidaan sekä niiden viljelemiseksi että varsinaista menetelmää varten käyttää alan puitteissa tavanomaisia kasvualustoja. Edullisesti käytetään kasvualustaa, jonka koostumus esitetään taulukossa 1.

Tavallisesti varsinainen menetelmä suoritetaan sitten lepotilassa olevilla soluilla.

Kaavan I mukaista pyratsiinijohdannaista voidaan lisätä substraatiksi solulietteeseen kerran tai jatkuvasti, edullisesti siten, että substraattipitoisuus kasvualustassa ei ylitä 20 % (w/v).

Erityisesti substraattipitoisuus ei ylitä 5 % (w/v) kasvualustassa.

Konvertointi suoritetaan tarkoituksenmukaisesti pH:ssa 4 - 10, edullisesti pH:ssa 6 - 8.

Tavallisesti konvertointi suoritetaan lämpötilassa 0 - 55 °C, edullisesti 20 - 40 °C.

Tavanomaisen konvertoimisajan 5 - 100 tuntia jälkeen hydroksyloidut pyratsiinijohdannaiset voidaan eristää tunnettuun tapaan, esimerkiksi uuttamalla sopivalla orgaanisella liuottimella. Tarkoituksenmukaisesti hydroksyloidut pyratsiinijohdannaiset eristetään uuttamalla

klooratuilla orgaanisilla liuottimilla, kuten esimerkiksi klooratuilla hiilivedyillä tai etyyliasetaatilla.

Esimerkki 1

5 Pyratsiinia metaboloivien mikro-organismien eristäminen

10 Aerobisia pyratsiinia metaboloivia mikro-organismeja kasvatettiin A+N-kasvualustassa (taulukko 1), johon oli lisätty 0,1 % (w/v) pyratsiinia ainoaksi hiili-, typpi- ja energialähteeksi. Yleisiä tekniikoita mikro-organismien eristämiseksi kuvataan esimerkiksi kirjassa G. Drews, "Mikrobiologisches Praktikum", 4. painos, Springer Verlag, 1983.

15 Ympäristä käytettiin näytteitä, jotka olivat peräisin maaperästä, puhdistuslaitoksista, komposteista ja muurahaiskeoista. Kasvatus suoritettiin ravistelukolvelissa 30 °C:ssa. Kolmen siirrostuksen tuoreeseen kasvualustaan jälkeen kasvatusta jatkettiin pintaviljelynä samassa kasvualustassa, johon oli lisätty 16 g agar-agarita litraa kohden, inkuboiden 30 °C:ssa. Useampikertaisen siirrostuksen agar-kasvualustalle jälkeen voitiin eristää puhdasviljelmiä.

20

Taulukko 1:
A+N-kasvualusta

	Koostumus	Pitoisuus (mg/litra)
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 000
5	Na_2HPO_4	2 000
	KH_2PO_4	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
10	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,8
	pyridoksaalihydrokloridi	10×10^{-3}
	riboflaviini	5×10^{-3}
	nikotiinihappoamidi	5×10^{-3}
	tiamiinihydrokloridi	2×10^{-3}
15	biotiini	2×10^{-3}
	pantoteenihappo	5×10^{-3}
	p-aminobentsoaatti	5×10^{-3}
	foolihappo	2×10^{-3}
	vitamiini B_{12}	5×10^{-3}
20	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100×10^{-3}
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	90×10^{-3}
	H_3BO_3	300×10^{-3}
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200×10^{-3}
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10×10^{-3}
25	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20×10^{-3}
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	30×10^{-3}
	$\text{EDTANa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5×10^{-3}
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2×10^{-3}
	(liuoksen pH säädettiin 7,0:ksi)	

30

Esimerkki 2

3-klooripyratsiinin konvertointi 3-kloori-2-hydroksipyratsiiniksi

Agrobacterium sp.:tä (DSM-nro 6136) kasvatettiin

35 A+N-kasvualustassa, johon oli lisätty 0,1 % (w/v) pyrat-

siinia, fermentorissa pH:ssa 7 ja lämpötilassa 30 °C. Sit-
ten solut sentrifugoitiin eroon, ne uudelleenlietettiin
A+N-kasvualustaan säätäen optiseksi tiheydeksi 10 650
nm:ssä. Tämä soluliete kaadettiin ravistelukolviin ja li-
sättiin 26 mmol 3-klooripyratsiinia litraa kohden (0,3 %
w/v).

Inkuboitiin 30 °C:ssa 8 tunnin ajan ravisteluko-
neessa, minkä jälkeen todettiin 20 mmol 3-kloori-2-hyd-
roksipyratsiinia litraa kohden, mikä vastaa 77 %:n saan-
toa.

Esimerkit 3 - 5 suoritettiin kuten esimerkki 2 ja
tulokset on koottu taulukkoon 2.

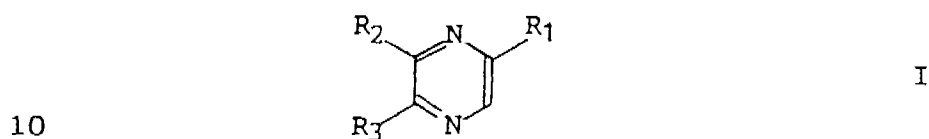
Hydroksyyli-ryhmän sijainti määritettiin julkaisun
Mac Donald, J.C., Bishop, G.G., Mazurek, Tetrahedron 32
(1976) 655ff, tietojen mukaan.

Taulukko 2

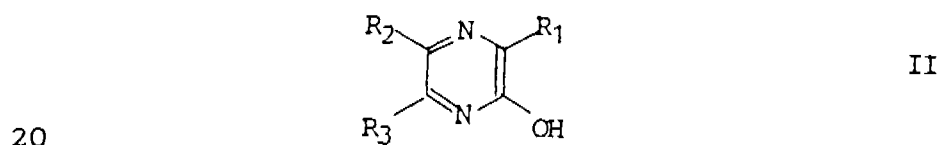
Esim.	Substraatti	Heterosyklin pitoisuus, % (w/v) kasvu- alustassa	Reaktio- aika (tuntia)	Lopputuote	Saanto (%)
3	2-metyylipyraatsiini	0,2	1	2-hydroksi-6- metyylipyraatsiini	50
4	2-etyylipyraatsiini	0,2	24	6-etyyli-2-hydrok- si-pyraatsiini	20
5	2,3-dimetyyli- pyraatsiini	0,2	10	2-hydroksi-5,6-di- metyylipyraatsiini	20

Patenttivaatimukset

1. Acrobacterium sp. mikro-organismi, t u n -
n e t t u siitä, että se kykenee kasvamaan pyratsiini ai-
noana hiili-, typpi- ja energialähteenä sekä konvertoimaan
5 substraattina pyratsiini johdannaisia, joiden yleinen kaava
on



jossa R₁ on vetyatomi tai halogeeniatomi ja R₂ ja R₃ ovat
identtiset tai erilaiset ja ovat kumpikin vetyatomi tai
C₁-C₄-alkyyli-ryhmä, jolloin kuitenkin R₁, R₂ ja R₃ eivät
15 ole samanaikaisesti vetyatomeja, hydroksyloituksi pyrat-
siini johdannaiseksi, jonka yleinen kaava on



jossa R₁, R₂ ja R₃ määritellään kuten edellä, jolloin vii-
meksi mainittua kerääntyy kasvualustaan.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen mikro-organismi,
t u n n e t t u siitä, että se on Agrobacterium sp., jo-
ka on talletettu talletuslaitokseen DSM talletusnumerolla
25 6136, ja sen jälkeläiset ja mutantit.

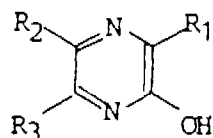
3. Menetelmä hydroksyloitujen pyratsiini johdan-
naisten valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että
pyratsiini johdannainen, jonka yleinen kaava on I
30



jossa R₁ on vetyatomi tai halogeeniatomi ja R₂ ja R₃ ovat
35 identtiset tai erilaiset ja ovat kumpikin vetyatomi tai

C₁-C₄-alkyyli-ryhmä, jolloin kuitenkin R₁, R₂ ja R₃ eivät ole samanaikaisesti vetyatomeja, konvertoidaan hydroksyloiksi pyratsiinijohdannaiseksi, jonka yleinen kaava on

5



II

jossa R₁, R₂ ja R₃ määritellään kuten edellä, mikro-organismissa, joka kykenee kasvamaan pyratsiini ainoana hiili-, typpi- ja energialähteenä ja joka kykenee mainittuun konvertointiin, ja eristetään kerääntynyt tuote.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että mikro-organismin vaikuttavat entsyymit indusoidaan pyratsiinilla.

15 5. Patenttivaatimuksen 3 tai 4 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että konvertointi suoritetaan lisäten substraattia kerran tai jatkuvasti siten, että substraatin pitoisuus kasvualustassa ei ylitä 20 % (w/v).

20 6. Jonkin patenttivaatimuksista 3 - 5 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että konvertointi suoritetaan pH:ssa 4 - 10.

7. Jonkin patenttivaatimuksista 3 - 6 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että konvertointi suoritetaan lämpötilassa 0 - 55 °C.

25 8. Yhdiste, tunnettu siitä, että se on 6-etyyli-2-hydroksipyratsiini.