

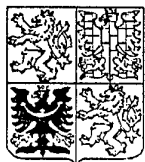
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

279 290

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2076-91**

(22) Přihlášeno: 04. 07. 91

(30) Právo přednosti:

06. 07. 90 CH 90/2272

01. 10. 90 CH 90/3149

(40) Zveřejněno: 19. 02. 92

(47) Uděleno: 07. 02. 95

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 12. 04. 95

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 P 17/00

(73) Majitel patentu:

LONZA AG, Basel, CH;

(72) Původce vynálezu:

Hoeks Frans, Naters, CH;

(54) Název vynálezu:

**Způsob mikrobiologické oxidace
methylových skupin na aromatických
5 nebo 6členných kyslíkatých,
dusíkatých nebo sírných heterocyklech**

(57) Anotace:

Způsob mikrobiologické oxidace methylskupin v aromatických 5-nebo 6-ti členných heterocyklech na odpovídající karboxylové kyseliny se provádí působením toluen-, xylen- nebo cymen-zhodnocujících mikroorganismů rodu *Pseudomonas*, přičemž se do reakce zavádí induktor, aromatický heterocyklus jako substrát a zdroj uhlíku a energie a po dosažení maximální koncentrace produktu se produkt oddělí.

CZ 279 290 B6

Způsob mikrobiologické oxidace methylových skupin na aromatických 5 nebo 6 členných kyslíkatých, dusíkatých nebo sirných heterocyklech.

Oblast vynálezu

Vynález se týká mikrobiologického způsobu oxidace methylových skupin na aromatických 5 nebo 6 členných heterocyklických kruzích na odpovídající karboxylové kyseliny, přičemž heterocyklus nenese na atomu uhlíku, sousedícím s oxidovanou methylskupinou, žádný substituent.

Dosavadní stav techniky

Tyto deriváty karboxylových kyselin mohou být například použity jako meziprodukty pro další chemické syntézy. Například 2-pyrazin-karboxylová kyselina je důležitým meziproduktem pro výrobu tuberkulostatika parazinamidu /2-pyrazin-karboxylová kyselina ve formě amidu/ /Römpps Chemie Lexikon, sv. 5, 1987, str.3411/.

Výzkumy mikrobiologické výroby karboxylových kyselin se nyní provádějí s aromatickými uhlovodíky.

Produkce karboxylových kyselin mikrobiologickou oxidací methylovaných aromátů je popsána /Raymond a spol., Process Biochem., 1969, str, 71-74/.

US patent č. 3383289 popisuje způsob biochemické oxidace methylskupin v aromatických uhlovodících kmenem mikroorganismu rodu *Nocardia*.

Nevýhodou tohoto způsobu je, že např. při oxidaci methylskupin se od aromatických uhlovodíků benzenového kruhu odštěpuje odpovídající kyselina.

O *Pseudomonas putida* ATCC 33015 je známo, že biochemická oxidace toluenu na benzoovou kyselinu probíhá ve 3 stupních. Působením toluen-monooxygenázy vzniká nejprve benzylalkohol, který je v dalších dvou stupních, katalyzovaných alkohol- a aldehyddehydrogenázou, převeden na kyselinu.

V tomto kmenu jsou v plasmidu pWWO uloženy rovněž Xylgeny, které kodují enzym, odbourávání xylenů, jakož i geny, které jsou odpovědné za regulaci Xyl-genu. Tento archaetypický Tol-plasmid je v molekulární biologii v širokém rozsahu využíván (Harayama a spol., J. Bacteriol. 171, 1989, str. 5048-5055, Burlage a spol., Appl. Environ Microbiol. 55, 1989, str. 1323-1328/.

Z literatury jsou rovněž známy mikrobiologické způsoby oxidace methylskupin N-heterocyklu. Podle SU patentu č. 417468 se 2-methylpyridin oxiduje kmenem grampozitivního mikroorganismu rodu *Nocardia* na odpovídající kyselinu.

SU patent č. 228688 popisuje mikrobiologický způsob výroby kyseliny nikotinové ze 3-methylpyridinu grampozitivním mikroorganismem rodu *Mycobakterium*. Ze SU patentu č. 302341 je znám mikro-

biologický způsob výroby kyseliny nikotinové grampozitivními bakteriemi rodu *Nocardia*.

Nevýhodou oxidace methylskupin N-heterocyklů grampozitivními bakteriemi je, že při těchto alkan-využívajících bakteriích musí být přesně dodržen ve směsi poměr alkanu k oxidační substanci, aby bylo možno dosáhnout biotransformace a že neprobíhá biotransformace substrátu za nepřítomnosti alkanu, tj. že k indukci použitý alkan musí být vždy, i při reakci substrátu, přítomen. Srovnávacím pokusem s grampozitivní bakterií *Nocardia* a naší gramnegativní *Pseudomonas* bylo prokázáno, že *Nocardia* i v přítomnosti alkanu, např. dodekanu, neoxiduje 3-methylpyridin na odpovídající kyselinu nikotinovou.

US patent č. 4859592 popisuje způsob výroby kyseliny pikolinové pomocí *Pseudomonas putida*, ve kterém tvoří alkylsubstituovaný uhlovodík za přítomnosti molekulárního kyslíku v prvním stupni působením dioxxygenázy semialdehyd 2-hydroxymukonové kyseliny, který ve druhém stupni reaguje s amoniakem nebo primárním aminem na odpovídající kyselinu nikotinovou.

Nevýhodou tohoto způsobu je, že odpovídající kyselina pikolinová se tvoří teprve ve druhém stupni reakcí semialdehydu 2-hydroxymukonové kyseliny s amoniakem.

Mikrobiologický způsob oxidace methylskupin na heterocyklech je rovněž popsán ve švýcarské patentové přihlášce č. 458/90.

V tomto způsobu se mikroorganismy nejprve kultivují v kultivačním médiu s p-xylenem jako jediným zdrojem uhlíku a energie, pak se oddělí a nakonec se provede biotransformace přidávkou eduktu. Vyčerpáním aktivity biomasy se v tomto dvojstupňovém způsobu dosáhne relativně nízké koncentrace produktu.

Podstata vynálezu

Úlohou předloženého vynálezu je odstranit nevýhody tohoto postupu a nalézt způsob, který je možno provádět ve velkém měřítku ve vysokých objemových výtěžcích za čas, při kterém se dosahuje mnohem větší koncentrace produktu a při kterém se karboxylová kyselina po izolaci získá ve vyšším výtěžku.

Předmětem tohoto vynálezu je způsob mikrobiologické oxidace methylových skupin na aromatických 5 nebo 6 členných kyslíkatých, dusíkatých nebo sirných heterocyklech neobsahujících žádný substituent na sousedícím uhlíkovém atomu methylové skupiny, která se má oxidovat, na odpovídající karboxylové kyseliny.

Podstata způsobu podle vynálezu spočívá v tom, že se do kultivačního prostředí, obsahujícího mikroorganismy druhu *Pseudomonas putida*, zhodnocující toluen, xylen nebo cymen přivádí

a) induktor, jako jsou mono- a disubstituované methyl-, ethyl a chlortolueny, benzylalkoholy, p-chlorbenzaldehyd, o-xylen nebo o-cymen,

b) methylovaný aromatický 5 nebo 6 členný kyslíkatý, dusíkatý nebo sirný heterocyklus jako substrát pro biotransformaci a popřípadě

c) alespoň jeden zdroj uhlíku a energie a po dosažení maximální koncentrace produktu se karboxylová kyselina oddělí, přičemž se jako induktor přidávají buď sloučeniny, které slouží mikroorganismu jako zdroj uhlíku a energie, jako je alespoň jedna sloučenina z řady toluen, xylen nebo jeho isomery, nebo cymen nebo jeho isomery, nebo se jako induktor přidávají sloučeniny, které neslouží mikroorganismu jako zdroj uhlíku a energie.

Reakce může být prováděna s mikroorganismy, zhodnocujícími toluen, xylen nebo cymen rodu *Pseudomonas*, výhodně druhu *Pseudomonas putida*, zejména s kmenem mikroorganismu *Pseudomonas putida*, využívajícím xylen, uloženým v American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852, USA, pod číslem ATCC 33015.

Pro způsob jsou rovněž vhodné mutanty těchto mikroorganismů jakož i jiné mikroorganismy, do kterých byl buď konjugací nebo metodami genových manipulací zabudován pro reakci nezbytný Tol-plasmid.

Způsob podle vynálezu pro oxidaci methylskupin v aromatických 5 nebo 6 členných heterocyklech se výhodně provádí tak, že se v prvním stupni způsobu a/ podle patentového nároku 4, v tak zvané batch-fázi, připraví produkce schopná biomasa. Proto se mikroorganismy známým způsobem podle CH patentové přihlášky č. 458/90 pokryjí buď zástupci řady sloučenin, tvořené toluenem, xylenem a jejich isomery nebo cymenem a jeho isomery jako je p-xylen, p-cymen nebo m-cymen jako induktorem a jediným zdrojem uhlíku a energie v minerálním médiu, např. Kulla a spol., Arch. Microbiol. 135, 1983, str. 1-7, nebo se pokryjí zástupci řady sloučenin, která zahrnuje toluen, xylen a jejich isomery nebo cymen a jeho isomery, jako je p-xylen, m-xylen, p-cymen nebo m-cymen jako induktorem v komplexním médiu jako je např. "Nutrient Broth Nr.2", Oxoid Ltd., Anglie, nebo v minerálním médiu, jako např. podle Kully a spol., Arch. Microbiol. 135, 1983, str. 1-7, se zdroji uhlíku, jako jsou uhlohydráty, cukerné alkoholy, nízkovroucí alifatické alkoholy, alifatické mastné kyseliny nebo aminokyseliny jako zdroj uhlíku a energie.

Sloučeniny, které mikroorganismu slouží jako zdroj uhlíku a energie, jako p-xylen, m-xylen, p-cymen, m-cymen nebo toluen, slouží výhodně popřípadě k indukci mikroorganismového enzymu, který je odpovědný za reakci. Tato indukce enzymu může být také prováděna sloučeninami, které neslouží jako zdroj uhlíku a energie, jako je například mono- nebo disubstituovaný methyl-, ethyl- a chlortoluen, benzylalkohol a p-chlorbenzaldehyd, o-xylen, o-cymen, které jsou již známy jako induktory enzymu pro odbourávání aromatických uhlovodíků (Abril M. A. a spol., J. Bacteriol., sv. 171, 1989, str. 6782-6789). Tyto sloučeniny se výhodně přivádějí například plynné, podle Hoslera a Eltze (Microbiol. Conversion of p-xylenen in stirred Fermenters, Fermentation Advances, str. 789-805, Acad. Press. Inc. NY 1969). Sloučeniny použité pro indukci mohou být také přiváděny v kapalně formě.

Výhodně se induktor přidává tak, že specifická rychlost odbourávání induktoru je mezi 0,01 a 50 mmol/g sušiny/hodinu.

Výhodně se kultivují mikroorganismy v minerálním médiu s p-xylenem, až do získání sušiny buněčné suspenze 0,01 až 200 g.

Výhodně se mikroorganismy kultivují při hodnotě pH od 5 do 9, zvláště při hodnotě pH od 7 do 8.

Kultivace se při všech stupních způsobu provádí při teplotě od 15 do 90 °C, výhodně při 25 až 35 °C.

Vypěstovanou biomasou mohou být očkovány další kultury, které pak výhodně mají stejné složení.

Při způsobu podle vynálezu je vypěstovaná biomasa výchozí látkou pro mikrobiologickou oxidaci methylskupin v heterocyklech v tak zvané biotransformační fázi, která může být prováděna kontinuálně nebo diskontinuálně.

Po vytvoření biomasy může být b) přívod induktoru podle patentového nároku 4 přerušen.

Stupně způsobu c) až e) podle patentového nároku 4 vyznačují v tomto způsobu tak zvanou biotransformační fázi.

Kultivační médium a kultivační podmínky v biotransformační fázi jsou podobné podmínkám pro kultivaci biomasy.

Fáze biotransformace je charakterizována tím, že

- c) se ke kultivačnímu médiu přivádí edukt, methylovaný aromatický 5- nebo 6-členný heterocyklus a zdroj uhlíku a energie, až mikroorganismy vykazují ztrátu aktivity pro biotransformaci,
- d) pak se regeneruje aktivita mikroorganismů přívodem induktoru, popřípadě ještě současným přerušením zdroje uhlíku a energie, až se dosáhne specifické rychlosti odbourávání induktoru mezi 0,01 a 50 mmol/l sušiny/hodinu a
- e) stupně b) až d) se opakují, čímž je možno provádět biotransformaci po delší dobu a dosáhnout maximální koncentrace produktu a/nebo uskutečnit kontinuální způsob výroby a dosáhnout vysokého výtěžku, vztaženo na prostor a čas.

Edukt, heterocyklus, se výhodně zavádí tak, že koncentrace v kultivačním médiu je mezi 0,0001 a 5 %, výhodně mezi 0,01 a 1 %.

Jako zdroje uhlíku a energie mohou být použity v oboru známé, a např. pro kmeny *Pseudomonas* popsané, sloučeniny (The Prokaryotes, vyd. M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balow, H. G. Schlegel, Springer Verlag 1981).

Výhodně jsou zdroje uhlíku a energie uhlohydráty, cukerné alkoholy, nízko vroucí alifatické alkoholy, alifatické mastné kyseliny nebo aminokyseliny.

Výhodně se používají glukóza a/nebo glycerin a/nebo glutamát. Tyto zdroje uhlíku a energie se výhodně zavádějí tak, že specifická rychlost odbourávání substrátu je mezi 0,01 a 200 mmol/g sušina/hodinu.

Po kultivaci v diskontinuálně provedené biotransformační fázi, obvykle 10 až 250 h, je možno dosáhnout koncentrace produktu v kultuře větší než 100 mmol/l.

Při modifikaci způsobu je také možné po ukončení fermentace část kultivačního roztoku oddělit a se zbývajících částí, doplněnou novým kultivačním médiem, znovu provádět biotransformaci-kultivaci.

Takzvaným opakovaným biotransformačním způsobem se podařilo snížit objemovou produktivitu fermentace. Objemová produktivita může ještě být dále zvýšena, jestliže se současně zavádí nové médium a kultivační roztok se odtahuje (kontinuální způsob).

Kultivaci je možno napomoci tak, že se edukt (heterocyklus) odsolí a čistí pomocí měniče iontů nebo elektrodialýzy.

Získání produktu z kultivačního roztoku se provádí obvyklými způsoby a výhodně může být prováděno kontinuálně nebo diskontinuálně, přičemž výhodnější je kontinuální získávání.

Oddělení biomasy může být například provedeno odstředěním, ultrafiltrací nebo mikrofiltrací.

Jak při elektrodialýze, tak při použití měničů iontů získané koncentrované roztoky produktů mohou být zakonzentrovány odpařením, nebo použitím osmotického zpracování a nakonec azeotropně odvodněny.

Při získávání produktu kontinuální elektrodialýzou (např. podle Eymondta a Wandreye, 1990, Chem. Ing. Tech. 62, č. 2, str. 134-135), může být produktivita ještě dále zvýšena.

Výhodně se tímto způsobem vyrábí 5-methyl-2-pyrazinkarboxylová kyselina nebo 6-methyl-2-pyrazinkarboxylová kyselina.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Výroba 5-methyl-2-pyrazinkarboxylové kyseliny

Pseudomonas putida ATCC 33015 se v minerálním médiu (Kulla a spol., Arch. Microbiol. 135, 1983, str. 1-7) pokryje p-xylenem jako jediným zdrojem uhlíku a energie ve fermentoru při pH 7,0 a teplotě 30 °C. Induktor enzymu p-xylen se přivádí plynný podle Haslera a Eltze ("Microbiol-Conversion of p-xylene in Stirred Fermenters", Fermentation Advances, str. 789-805, Acad. Press. Inc. NY 1969), až se dosáhne koncentrace biomasy 7,8 g/l (sušina/1).

Nakonec se přívod induktoru přeruší a do fermentoru se dává 2,5-dimethylpyrazin a 50% roztok glukózy rychlostí 1 g/l/h. Po 4 h, když biotransformační aktivita biomasy klesla na asi 80 %, se opět dává p-xylen (2 h) až do specifické rychlosti odbourávání induktoru 0,51 mmol/g sušiny/h, za současného přerušování dávkování glukózy. Pokles biotransformační aktivity biomasy byl stanoven spotřebou louhu, který byl spotřebován pro neutralizaci produktu.

Potom se dává glukóza a p-xylen jak bylo popsáno, až se dosáhne koncentrace 5-methyl-2-pyrazinkarboxylové kyseliny 101 mmol/l, což odpovídá výtěžku 95 %, vztaženo na použitý 2,5-dimethylpyrazin.

Příklad 2

Výroba 6-methyl-2-pyrazinkarboxylové kyseliny

Pseudomonas putida ATCC 33015 se kultivuje analogicky příkladu 1, až do dosažení koncentrace biomasy 7,8 g sušiny/l.

Nakonec se přeruší přívod induktoru a do fermentoru se dává 50% roztok glukózy rychlostí 1 g/l/h. Po 4 h když biotransformační aktivita biomasy klesne asi na 75 %, dává se opět p-xylen /2 h/ až do specifické rychlosti odbourávání induktoru 0,45 mmol/g sušiny/h a přívod glukózy se přeruší. Pokles biotransformační aktivity biomasy byl stanoven spotřebou louhu, který byl nutný pro neutralizaci produktu.

Pak byla dávkována glukóza a p-xylen, jak je popsáno, až bylo dosaženo koncentrace 6-methyl-2-pyrazinkarboxylové kyseliny 105 mmol/l, což odpovídá výtěžku 95 %, vztaženo na použitý 2,6-dimethylpyrazin.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob mikrobiologické oxidace methylových skupin na aromatických 5 nebo 6 členných kyslíkatých, dusíkatých nebo sirných heterocyklech, neobsahujících žádný substituent na sousedícím uhlíkovém atomu methylové skupiny, která se má oxidovat, na odpovídající karboxylové kyseliny, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se do kultivačního prostředí, obsahujícího mikroorganismy druhu *Pseudomonas putida*, zhodnocující toluen, xylen nebo cymen přivádí

a) induktor, což jsou buď sloučeniny, které slouží mikroorganismu jako zdroj uhlíku a energie, jako je alespoň jedna sloučenina z řady toluen, xylen nebo jeho isomery nebo cymen nebo jeho isomery, nebo sloučeniny, které neslouží mikroorganismu jako zdroj uhlíku a energie, jako jsou mono- a disubstituované methyl-, ethyl- a chlortolueny, benzylalkoholy, p-chlorbenzaldehyd, o-xylen a o-cymen,

b) methylovaný aromatický 5 nebo 6 členný kyslíkatý, dusíkatý nebo sirný heterocyklus jako substrát pro biotransformaci a popřípadě

c) alespoň jeden zdroj uhlíku a energie, jako je alespoň jedna sloučenina z řady toluen, xylen nebo jeho isomery nebo cymen a jeho isomery.

a po dosažení maximální koncentrace produktů se karboxylová kyselina oddělí.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se

a) mikroorganismus nakultivuje s uvedeným induktorem, až se dosáhne dostatečného množství buněk, potřebných pro produkci,

b) omezí se přívod induktoru

c) přidá se methylovaný 5 nebo 6 členný heterocyklus a zdroj uhlíku a energie, až mikroorganismy projeví úbytek aktivity při biotransformaci,

d) aktivita mikroorganismu se regeneruje přívodem induktoru, a energie a

postupy b) až d) se opakují, přičemž se induktor přidává tak, že měrná rychlost odbourávání induktoru je mezi 0,01 a 50 mmol/g sušiny za hodinu, methylovaný aromatický 5 nebo 6 členný heterocyklus se přidává tak, že jeho koncentrace v kultivačním prostředí se pohybuje v rozmezí 0,0001 až 5 % a zdroj uhlíku a energie se přidává tak, že se měrná rychlost odbourávání substrátu pohybuje mezi 0,01 a 200 mmol/g sušiny za hodinu.

3. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 a 2, v y z n a č u-
j í c í s e t í m, že se jako zdroj uhlíku a energie dále
používají uhlohydráty, cukerné alkoholy, níževroucí alifatické
alkoholy, alifatické mastné kyseliny nebo aminokyseliny.
4. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 3, v y z n a č u-
j í c í s e t í m, že se produkt odděluje kontinuálně ne-
bo diskontinuálně.
5. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 4, v y z n a č u-
j í c í s e t í m, že se reakce provádí s mikroorganismy
kmene *Pseudomonas putida* s označením ATCC 33015, zužitkováva-
jícími xylen.
6. Způsob podle nároků 1 až 5 pro výrobu 5-methyl-2-pyrazin-
karboxylové kyseliny, v y z n a č u j í c í s e t í m,
že se jako substrát používá 2,5-dimethylpyrazin.
7. Způsob podle nároků 1 až 6 pro výrobu 6-methyl-2-pyrazin-
karboxylové kyseliny, v y z n a č u j í c í s e t í m,
že se jako substrát používá 2,6-dimethylpyrazin.

Konec dokumentu
