



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(51) Int Cl⁷

(11) 319146

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

(13) B1

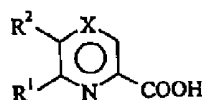
Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19962389	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	
(22)	Inng.dag	1996.06.06	(85)	Videreføringsdag	
(24)	Løpedag	1996.06.06	(30)	Prioritet	1995.06.07, CH, 1664/95 1995.06.13, CH, 1733/95
(41)	Alm.tilgj	1996.12.09			
(45)	Meddelt	2005.06.27			
(73)	Innehaver	Lonza AG , Münchensteinerstrasse 38, 4052 BASEL, CH Andreas Kiener, Visp, CH Jean-Paul Roduit, Rue Pré-Fleuri 12, 1950 SION, CH Rainer Glöckler, Visperterminen, CH			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Bryn & Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 Oslo, NO			
(54)	Benevnelse	Mikrobiologisk fremgangsmåte for fremstilling av heteroaromatiske karboksylsyrer og picolinsyre eller deres fysiologisk fordragelige salter ved hjelp av mikroorganismer fra slekten Alcaligenes			
(56)	Anførte publikasjoner	US-A-5264361			
(57)	Sammendrag				

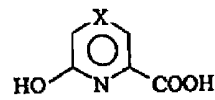
Det beskrives en mikrobiologisk fremgangsmåte for fremstilling av heteroaromatiske karboksylsyrer og deres fysiologisk fordragelige salter med de i generelle formler

hvor R^1 , R^2 er like eller forskjellige og betyr et hydrogen- eller halogenatom, og X et nitrogenatom eller -CH-. Omsetningen utføres slik at man som substrat omsetter heteroaromatiske nitriler med de generelle formler:

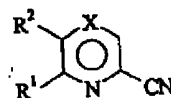
hvor R^1 , R^2 , og X har den nevnte betydning, ved hjelp av 2-cyanpyridinmetaboliserende mikroorganismer av slekten Alcaligenes, som før biotransformasjonen blir dyrket i nærvær av en dikarboksylsyre, tikarboksylsyre eller et karbohydrat, til den tilsvarende karboksylsyre, og eventuelt overfører sistnevnte i fysiologisk fordragelige salter.



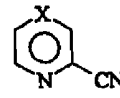
I



II

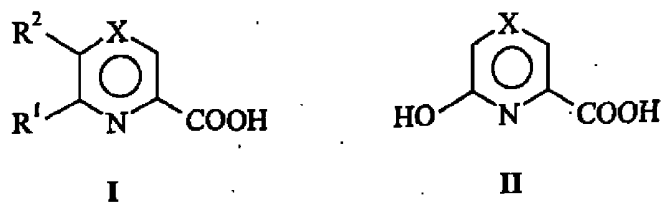


III



IV

Oppfinnelsen vedrører en ny mikrobiologisk fremgangsmåte for fremstilling av heteroaromatiske karboksylsyrer eller deres fysiologisk fordragelige salter med de generelle formler:



hvor R^1 , R^2 er like eller forskjellige og betyr et hydrogen- eller halogenatom, og X et nitrogenatom eller -CH-.

Heteroaromatiske karboksylsyrer såsom f.eks. 6-hydroksypikolinsyre, er viktige mellomprodukter for fremstilling av farmasøytika som f.eks. for fremstilling av 2-oksypyrimidin (Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 1912, 45, s.2456-2467) eller for fremstilling av herbicider (EP-A 0 447 004).

Generelt er det kjent at mikroorganismer som inneholder nitrilhydrataser og amidaser eller nitrilaser omsetter nitriler til de tilsvarende syrer.

Eksempelvis beskriver EP A 0 187 680 en mikrobiologisk fremgangsmåte for fremstilling av organiske syrer som f.eks. nikotinsyre, ved hjelp av mikroorganismer av slekten *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Bacteridium*, *Micrococcus* og *Brevibacterium*. Denne reaksjonen utføres obligatorisk i nærvær av lysenergi. Fra EP-A 0 444 640 er det kjent en mikrobiologisk fremgangsmåte for fremstilling av organiske syrer som f.eks. nikotinsyre, ved hjelp av mikroorganismer av slekten *Rhodococcus*. Denne omsetningen utføres obligatorisk i nærvær av et laktam.

Videre er det kjent at mikroorganismer av arten *Rhodococcus rhodochrous* J1 omsetter f.eks. 2-cyanpyrazin til pyrazinkarboksylsyre (Kobayashi et al., J. of Antibiotics, Vol.43, Nr. 10, 1990, s. 1316-1320).

Disse mikroorganismene kan imidlertid ikke omsette 2-cyanpyridin til pikolinsyre (Mathew et al., Appl. Environmental Microbiology, Vol. 54, Nr. 4, 1988, s. 1030-1032).

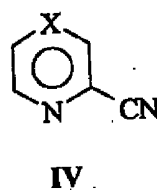
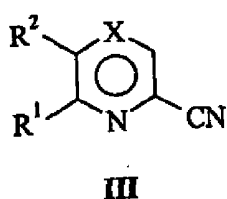
Det er også kjent at 2-cyanpyridin-utnyttende mikroorganismer av slekten *Alcaligenes* omsetter 2-cyanpyridin til 6-hydroksypikolinsyre (EP-A 0 504 818).

Med denne fremgangsmåten er det en ulempe at 6-hydroksypikolinsyren bare dannes i måtelig utbytte.

Oppgaven for foreliggende oppfinnelse var å tilveiebringe en økonomisk mikrobiologisk fremgangsmåte for fremstilling av heteroaromatiske karboksylsyrer eller deres fysiologisk fordragelige salter, såsom pyrazinkarboksylsyre, pikolinsyre eller krompikolinat, ved hjelp av mikroorganismer av slekten *Alcaligenes*, hvorunder de dannede karboksylsyrer eller deres fysiologisk fordragelige salter dannes i godt utbytte.

Denne oppgaven ble løst ved fremgangsmåten ifølge krav 1.

Ifølge oppfinnelsen utføres fremgangsmåten ved at man som substrat omsetter et heteroaromatisk nitril med de generelle formler



hvor X , R^1 og R^2 har nevnte betydning, ved hjelp av 2-cyanpyridin-metaboliserende mikroorganismer av slekten *Alcaligenes*, som før biotransformasjonen ble dyrket i nærvær av en dikarboksylsyre, trikarboksylsyre eller et karbohydrat, til heteroaromatiske karboksylsyrer med formel I eller II. Heteroaromatiske karboksylsyrer overføres deretter eventuelt i fysiologisk fordragelige salter. Som fysiologisk fordragelige salter av disse karboksylsyrer forstås i det følgende henholdsvis krom-, kalsium- eller ammoniumsalter.

Før den egentlige biotransformasjon dyrkes det på vanlig måte mikroorganismer av slekten *Alcaligenes* som anvendes for fremgangsmåten, og deres virksomme enzymer induseres hensiktsmessig med 2-cyanpyridin.

For dyrking og induksjon kan 2-cyanpyridin anvendes i en konsentrasjon på 0,01 til 20 vekt %, fortrinnsvis i en konsentrasjon på 0,1 til 1 vekt %.

Med en dikarboksylsyre forstås i det følgende fumarsyre, ravsyre, eplesyre, glutarsyre, malonsyre, henholdsvis deres salter og derivater såvel som estere.

Med en trikarboksylsyre forstås i det følgende sitronsyre, isositronsyre, henholdsvis deres salter og derivater såsom estere. Som salter og derivater av

disse dikarboksylysyrer og trikarboksylysyrer kan det anvendes fumarat, malat, malonat, oksalacetat, sitrat, aconitat, isositrat, 2-oksoglutarat, suksinat eller suksinyl-CoA. Fortrinnsvis anvendes fumarat, malonat eller suksinat.

Som karbohydrater anvendes i det følgende monosakkarider såsom
5 glukose, disakkarider såsom sakkarose, trehalose eller maltose, trisakkarider
såsom raffinose, sukkeralkoholer såsom glycerol. Fortrinnsvis anvendes glycerol
som karbohydrat.

Hensiktsmessig anvendes dikarboksylyren, trikarboksylyren, henholdsvis
karbohydratet i en konsentrasjon fra 0,1 til 20 vekt %, fortrinnsvis i en
10 konsentrasjon på 0,5 til 5 vekt %.

Som dyrkningsmedium kan de medier anvendes som er vanlige innen
fagområdet, som f.eks. mineralsaltmediet ifølge Kulla et al. (Arch. Microbiol., 135,
1-7, 1983), lavmolare fosfatbufferer eller den ifølge Tabell 1. Fortrinnsvis
anvendes den som er beskrevet i Tabell 1.

15 Etter dyrkningsfasen, henholdsvis før den egentlige substrattilsetning,
høstes mikroorganismene enten ved hjelp av en separasjonsprosess eller
substratet settes direkte til mikroorganismene.

Substratene som anvendes for biotransformasjonen, de heteroaromatiske
nitriler med formel III og IV, som f.eks. 2-cyanpyridin, er forbindelser i handelen.

20 I de generelle formler I-IV betyr X et nitrogenatom eller -CH-, fortrinnsvis
-CH-. Resten av R¹ og R² er like eller forskjellige og betyr hydrogen eller halogen
såsom fluor, klor, brom eller jod.

Mulige substrater er følgende 2-cyanpyridin, 6-klor-2-cyanpyridin, 5,6-diklor-
2-cyanpyridin, 2-cyanpyrazin, 6-klor-2-cyanpyrazin, 5-brom-6-klor-2-cyanpyrazin.
25 Hensiktsmessig anvendes som substrater 2-cyanpyridin, 2-cyanpyrazin eller
6-klor-2-cyanpyridin.

Substratet kan tilsettes for biotransformasjonen en gang eller kontinuerlig.
Hensiktsmessig skjer substrattilsetningen slik at substratkonsentrasjonen i mediet
ikke overstiger 20 vekt %, fortrinnsvis ikke overstiger 10 vekt %.

30 Biotransformasjonen som normalt utføres med hvilende celler, utføres
hensiktsmessig med de kjente 2-cyanpyridin-metaboliserende mikroorganismer av
arten *Alcaligenes faecalis* med betegnelsen DSM 6335 kjent fra EP-A 0 504 818
samt med de funksjonelt ekvivalente varianter og mutanter. Denne
mikroorganismen ble deponert 3. Januar 1991 ved der Deutschen Sammlung von

Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, ifølge Budapestkonvensjonen.

Med «funksjonelt ekvivalente varianter og mutanter» forstås mikroorganismer som i det vesentlige har de samme egenskaper og funksjoner som opprinnelsesmikroorganismene. Slike varianter og mutanter kan dannes tilfeldig, f.eks. ved hjelp av UV-bestråling.

For biotransformasjon kan de samme medier anvendes som for dyrking av mikroorganismene.

Biotransformasjonen kan også skje i nærvær eller fravær av de forut beskrevne dikarboksyliksyrer, trikarboksyliksyrer, henholdsvis karbohydrater.

pH-verdien ligger hensiktsmessig i et område på 4 til 10, fortrinnsvis i et område på 5 til 9. Biotransformasjonen kan utføres ved en temperatur på 10 til 50°C, fortrinnsvis ved en temperatur på 20 til 40°C.

Etter en vanlig omsetningstid på 6 til 100 timer, kan så de tilsvarende karboksyliksyrer med formel I eller II erholdes gjennom vanlige opparbeidingsmetoder som f.eks. ved surgjøring. Karboksyliksyrene kan også isoleres i form av salter som f.eks. ammonium- eller kromsalt.

Fremstilles som heteroaromatiske karboksyliksyrer i posisjon 6 hydroksylerte heteroaromatiske karboksyliksyrer (generell formel II), utføres biotransformasjonen hensiktsmessig under aerobe betingelser. Fremstilles imidlertid en ikkehydroksylert heteroaromatisk karboksyliksyre så som f.eks. pikolinsyre, utføres biotransformasjonen hensiktsmessig under anaerobe betingelser.

Eksempler

Eksempel 1

Fremstilling av 6-hydroksypikolinsyre

For fremstillingen av 6-hydroksypikolinsyre med stammen *Alcaligenes faecalis* DSM 6335 valgtes følgende betingelser. Det anvendtes en 7,5 l fermentor med 5 l arbeidsvolum. *Alcaligenes faecalis* DSM 6335 ble dyrket i et mineralsaltmedium (Tabell I) med natriumfumarat som eneste karbon- og energikilde, og 2-cyanpyridin som induktor ved 30°C, 600 opm, og en pH-verdi på 7,0. Luftingshastigheten var derunder ca. 3 l/min. Tilsetningen av natriumfumaratet fant derunder sted pO₂-styrt ved en pO₂ på >30 %. Det anvendtes en

20 %ig stamløsning av natriumfumarat blandet med 0,5% 2-cyanpyridin. Cellene ble dyrket opp til en optisk tetthet, målt ved 650 nm (OD_{650}), på 16 innenfor 23 timer før biotransformasjonen ble startet. For vekstfasen bruktes ca. 160 g natriumfumarat i form av en 20 %ig løsning (ca. 800 ml).

5 Under den aerobe biotransformasjonen av 2-cyanpyridin til 6-hydrokso-pikolinsyre ble det ikke tilsatt en karbon- og energikilde. Biotransformasjonen fant sted med hvilende celler.

Tilsetningen av 2-cyanpyridinet fant sted begrensende ved hjelp av en pumpe. Pumpehastigheten ble derunder overvåket «on line» ved hjelp av HPLC.
10 Konsentrasjonen av mellomproduktet pikolinsyre, hvis dannelseshastighet er ca. 2,5 ganger høyere enn omsetningshastigheten av pikolinsyre til 6-hydrokso-pikolinsyre (10 g/l/time til 4g/l/t) ble begrenset til verdier mindre enn 2 g/l, da omvandlingen av pikolinsyre til 6-hydrokso-pikolinsyre ellers ble inhibert.

Da 2-cyanpyridin er et fast stoff ved romtemperatur, var det nødvendig å
15 oppvarme startbeholderen som inneholdt 2-cyanpyridin til 50°C for at 2-cyanpyridin kunne tilsettes i flytende form.

Med denne fremgangsmåten var det mulig å fremstille 75 g/l 6-hydrokso-pikolinsyre i løpet av 31 timer.

Mellomproduktet pikolinsyre kunne ikke lenger påvises på slutten av
20 biotransformasjonen.

For isolering av 6-hydrokso-pikolinsyre, ble cellene separert ved hjelp av filtrering. Deretter ble den cellefrie løsningen oppvarmet til 60°C og surgjort med konsentrert saltsyre til en pH på 2-2,5. Ved denne pH falt 6-hydrokso-pikolinsyren ut fra løsningen.

25 Deretter ble det langsomt avkjølt til 4°C under røring, filtrert, resten vasket med mineralfritt vann og tørket (100 mbar, 55°C).

I moderluten forble derunder ca. 2g/l 6-hydrokso-pikolinsyre. Utbyttet var 87 % beregnet på utgangsmaterialet 2-cyanpyridin.

Tabell 1:

	Sammensetning	konsentrasjon (g/l):
	Fumarsyre-dinatriumsalt	10
	Gjærekstrakt	1
5	MgCl ₂ *6H ₂ O	0,8
	Na ₂ SO ₄	0,25
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
	NH ₄ Cl	2,33
	NaCl	0,2
10	CaCl ₂ *2H ₂ O	0,16
	MnSO ₄	1,8*10 ⁻²
	H ₃ BO ₃	3*10 ⁻²
	NiCl ₂	2*10 ⁻³
	NaMoO ₄	3*10 ⁻³
15	FeSO ₄ *7H ₂ O	0,3
	Na ₂ EDTA*2H ₂ O	0,75
	2-cyanpyridin	1
	KH ₂ PO ₄	0,4
	Na ₂ HPO ₄	0,96

20

Eksempel 2**Fremstilling av pikolinsyre**

Dyrking av biomassen fant sted som beskrevet i Eksempel 1. Dannelsen av pikolinsyre fant sted under strengt anaerobe betingelser.

25 For biotransformasjonen anvendtes en 500 ml glassflaske med gummi-septum, fylt med 400 ml biomasse av OD₆₅₀= 20. Det inkubertes ved 30°C. Før man begynte med biotransformasjonen, ble satsen gjort anaerob med ren nitrogen. For dette ble satsen gasset i 30 min. gjennom kanyler under røring med

nitrogen (50 mbar overtrykk) for å drive oksygenet kvantitativt ut. For å utelukke oksygeninnngang under biotransformasjonen eller ved tilsetningen av 2-cyanpyridin, ble gassingene opprettholdt under biotransformasjonen (ca. 10 mbar overtrykk).

5 Tilsetningen av 2-cyanpyridin fant sted i 12 trinn på 10g/l hver gang etter 1 times forløp. Tilsetningen kan imidlertid også foregå kontinuerlig. Ved hjelp av HPLC ble undersøkt om 2-cyanpyridin var fullstendig omsatt i pikolinsyre før tilsetning av en ytterligere porsjon. Under biotransformasjonen kunne ingen dannelse av pikolinsyreamid påvises.

10 Med denne fremgangsmåten var det mulig å fremstille ca. 150g/l pikolinsyre i løpet av 26 timer. 6-hydroksypikolinsyre ble derunder ikke dannet.

For isoleringen ble den cellefrie pikolinsyreløsningen utfelt med $\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$. For dette ble den cellefrie pikolinsyreløsningen fra Eksempel 2 fortynnet 3 ganger og blandet under røring med 0,5 ekvivalenter CaCl_2 pr. 15 ekvivalent pikolinsyre etter at den cellefrie fermenteringsløsning var forvarmet til 90°C. Det dannede kalsium-pikolinsyrekompleks falt derunder straks ut. Det dannede kompleks ble avkjølt til 4°C under røring, frafiltrert gjennom et glass-filter (porøsitet 3), og vasket med mineralfritt vann.

Filterkaken ble oppslømmet i mineralfritt vann og surgjort med konsentrert 20 svovelsyre til en pH på 2,5. Derunder ble pikolinsyren løst ut fra komplekset og samtidig dannet det seg uløselig kalsiumsulfat. Da den frie pikolinsyren er meget godt vannløselig, kunne kalsiumsulfat skilles fra gjennom filtrering. Pikolinsyreløsningen ble inndampet til tørrhet og analysert. Råutbyttet var ca. 70 % med en renhet på 86 % ifølge titrering. Vanninnholdet lå på 0,7 % målt med Karl-Fischer- 25 metoden.

Eksempel 3

Fremstilling av krom(III)-pikolinat

Til en ammoniumpikolinatløsning (271,4 g; 0,325 mol; 16,8 %), plassert i en 500 ml kolbe, dryptes ved 73°C vandig kromtriklorid-hekahydrat-løsning (23,95 g, 30 0,09 mol krom i 63 ml vann) over et tidsrom på 3,5 timer. Den erholdte, fiolette løsning ble rørt videre enda en time og deretter avkjølt langsomt til 3°C. Etter presipitering av det dannede røde faststoff, ble den øvre blå fasen dekantert fra.

Faststoffet ble oppslemmet med 100 ml vann i 30 minutter og deretter igjen dekantert fra. Etter en andre oppslemming med 50 ml vann (30 min.), ble faststoffet filtrert fra og tørket ved 50°C under vakuum. Det ble oppnådd 33,64 g mørkerøde krystaller (90 % utbytte).

5 Eksempel 4

Dyrking av *Alcaligenes faecalis* DSM 6335 med forskjellige karbonkilder

For dyrking av *Alcaligenes faecalis* (DSM 6335) anvendtes 300 ml Erlenmeyerkolber med 100 ml A + N Medium (Tabell 1 uten fumarsyre-dinatriumsalt). Mediet ble i tillegg blandet med 2g/l 2-cyanpyridin og 10g/l av
10 følgende karbonkilder:

Fumarsyre-dinatriumsalt

Glycerol

Malonsyre-dinatriumsalt

Ravsyre-dinatriumsalt

15 Inkubasjonen fant sted på en rystemaskin ved 30°C. Etter 16 timer vekst, ble cellene sentrifugert fra, og det friske A + N medium (uten karbonkilde) som inneholdt 10g/l 2-cyanpyridin gjenoppslemmet. Den optiske tettheten til celleduspensjonen målt ved 650 nm (OD_{650}) var 10. Deretter ble celleduspensjonen (totalvolum 10-20 ml) på nytt inkubert ved 30°C. Dannelsen av
20 6-hydroksypikolinsyre ble fulgt spektrofotometrisk ved måling av absorpsjonen til den cellefrie løsningen ved 308 nm. Følgende gjennomsnittlige produktiviteter ble bestemt for dannelsen av 6-hydroksypikolinsyre:

	Karbonkilde	Produktivitet (i $g\ l^{-1}h^{-1}$)
	Fumarsyre-dinatriumsalt	2,4
25	Glycerol	2,0
	Malonsyre-dinatriumsalt	4,2
	Bernsteinsyre-dinatriumsalt	0,14

Eksempel 5

Fremstilling av 6-hydroksypyrazinkarboksylysyre

Dyrkingen av *Alcaligenes faecalis* (DSM 6335) fant sted som i Eksempel 4 med fumarsyre som karbonkilde. De vaskede celler ble gjenoppslemmet i A+N-medium inneholdende 10 g/l 2-cyanpyrazin ($OD_{650}=10$) og inkubert ved 30°C. Dannelsen av 6-hydroksypyrazinkarboksylysyre ble fulgt spektrofotometrisk ved måling av absorpsjonen til den cellefrie løsning ved 320 nm. Reduksjonen av konsentrasjonen av 2-cyanpyrazin (substrat) kunne bestemmes ved måling av absorpsjonen ved 270 nm. Etter 7 timer var den innførte mengde 2-cyanpyrazin omsatt til 6-hydroksypyrazinkarboksylysyre.

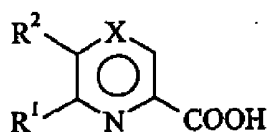
Eksempel 6

Fremstilling av 6-klorpikolinsyre og pyrazinkarboksylysyre

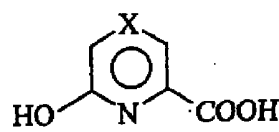
Dyrking av *Alcaligenes faecalis* (DSM 6335) fant sted som i Eksempel 4 med fumarsyre som karbonkilde. De vaskede celler ble gjenoppslemmet i A+N medium i glasskar ($OD_{650} = 10$) som kunne lukkes med gummipropper, og gasset ved hjelp av kanyler med nitrogen for å fjerne oppløst oksygen. Deretter ble celleduspensjonene tilsatt 2-cyanpyrazin henholdsvis 6-klor-2-cyanpyridin som substrat til en sluttkonsentrasjon på 10g/l og inkubert ved 30°C. Etter 3 timer var utgangssubstansene kvantitativt omsatt til de tilsvarende syrer [Påvisning med tynnskikt-kromatografi; kiselgel 60 med fluorescensindikator, eluent: kloroform 30 / etanol 55 / NH_4OH (25 %) 10 / H_2O 5].

Patentkrav

1. Mikrobiologisk fremgangsmåte for fremstilling av heteroaromatiske karboksylsyrer eller deres fysiologisk fordragelige salter med de generelle formler:

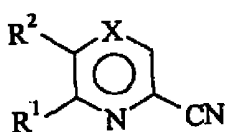


I

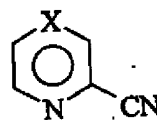


II

hvor R^1 , R^2 er like eller forskjellige, og betyr et hydrogen- eller halogenatom og X et nitrogenatom eller -CH-, karakterisert ved at man som substrat omsetter heteroaromatiske nitriller med de generelle formler:



III



IV

hvor R^1 , R^2 og X har den nevnte betydning, ved hjelp av 2-cyanpyridin-metaboliserende mikroorganismer av slekten *Alcaligenes*, som før biotransformasjonen er dyrket i nærvær av en dikarboksylsyre, trikarboksylsyre eller et karbohydrat, til den tilsvarende karboksylsyre, og eventuelt omsetter sistnevnte til fysiologisk fordragelige salter.

2. Mikrobiologisk fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at man utfører biotransformasjonen med mikroorganismer av arten *Alcaligenes faecalis* med betegnelsen DSM 6335 samt med deres funksjonelt ekvivalente varianter og mutanter.

3. Mikrobiologisk fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d a t man utfører biotransformasjonen ved en pH på 4 til 10 og en temperatur på 10 til 50°C.
- 5 4. Mikrobiologisk fremgangsmåte for fremstilling av picolinsyre og dens fysiologisk fordragelige salter, k a r a k t e r i s e r t v e d a t man som substrat omsetter 2-cyanpicolin ved hjelp av 2-cyanpyridinmetaboliserende mikroorganismer av slekten *Alcaligenes*, som før biotransformasjonen ble dyrket i nærvær av en dikarboksylsyre, under anaerobe betingelser, til picolinsyre, og eventuelt
- 10 overfører sistnevnte i det fysiologisk fordragelige salt.