

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12P 17/12

//(C12P17/12, C12R1 : 05)



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96110476.7

[45] 授权公告日 2003 年 11 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1127573C

[22] 申请日 1996. 6. 7 [21] 申请号 96110476. 7

[30] 优先权

[32] 1995. 6. 7 [33] CH [31] 1664/1995

[32] 1995. 6. 13 [33] CH [31] 1733/1995

[71] 专利权人 瑞士隆萨股份公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 A · 基纳尔 J · P · 罗杜因特

R · 格洛克勒

审查员 杨 帆

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

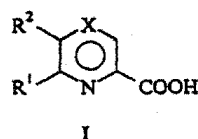
代理人 林蕴和

权利要求书 2 页 说明书 9 页

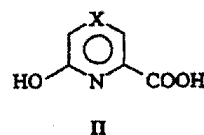
[54] 发明名称 利用产碱杆菌属的微生物制造杂芳香族羧酸的微生物学方法

[57] 摘要

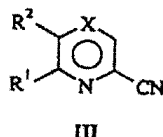
描述了一种制造具有下列通式的杂芳香族羧酸或其生理学上可吸收盐的微生物方法：其中 R¹, R² 相同或者不同，代表氢原子或卤原子，X 代表氮原子或 -CH-。以具有下列通式的杂芳香族腈作为底物，借助于产碱杆菌属微生物将其转化为相应的羧酸并在必要时再转化为生理学上可吸收的盐，在进行生物转化之前将所述微生物在一种二羧酸，三羧酸或一种碳水化合物存在下进行培养。其中 R¹, R² 和 X 的含义如上所述。



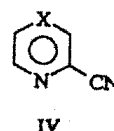
I



II

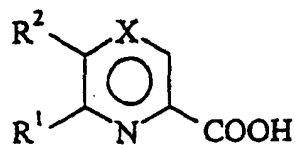


III



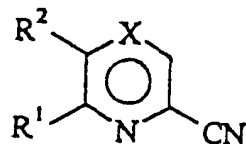
IV

1. 制备具有下列通式的杂芳香族羧酸的微生物学方法,



I

其中 R^1 , R^2 相同或不同并且是 H 原子或卤原子而 X 代表氮原子或-CH-, 其特征在于, 将具有下列通式的杂芳香族腈作为底物, 借助于保藏号为 DSM6335 的粪产碱杆菌种微生物或其具有把通式 III 的杂芳香族腈生物转化成通式 I 的杂芳香族羧酸的相同功能的变异体和突变体



III

其中 R^1 , R^2 和 X 的含义如上所述,
在无氧条件下转化为通式 I 的羧酸, 其中在进行生物转化前将微生物在二羧酸, 三羧酸或者碳水化合物以及 2-氰吡啶或 2-氰吡嗪作为诱导剂的存在下进行培养。

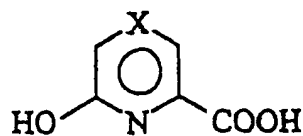
2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 生物转化是在 PH 为 4-10, 温度为 10-50°C 条件下完成。

3. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 将所述的杂芳香族羧酸转化为生理学上可吸收的盐。

4. 根据权利要求 1 或 3 所述的的方法, 其特征在于, 2-氰吡啶

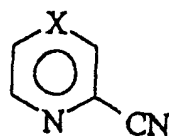
用作底物。

5. 制备具有下列通式的杂芳香族羧酸的微生物学方法,



II

其中 X 代表氮原子或-CH-, 其特征在于, 将具有下列通式的杂芳香族腈作为底物, 借助于保藏号为 DSM6335 的粪产碱杆菌种微生物或其具有把通式 IV 的杂芳香族腈生物转化成通式 II 的杂芳香族羧酸的功能的变异体和突变体



IV

其中 X 的含义如上所述,

在好氧条件下转化为通式 II 的羧酸, 其中在进行生物转化前将微生物在二羧酸, 三羧酸或者碳水化合物以及 2-氰吡啶或 2-氰吡嗪作为诱导剂的存在下进行培养。

6. 根据权利要求 5 所述的方法, 其特征在于, 生物转化是在 PH 为 4-10, 温度为 10-50°C 条件下完成。

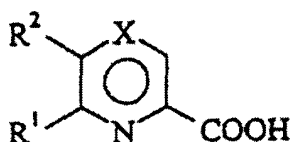
7. 根据权利要求 5 所述的的方法, 其特征在于, 将所述的杂芳香族羧酸转化为生理学上可吸收的盐。

8. 根据权利要求 5 或 7 所述的的方法, 其特征在于, 2-氰吡啶用作底物。

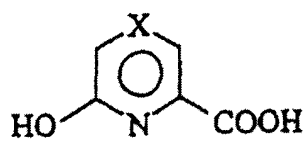
9. 根据权利要求 8 所述的的方法, 其特征在于, 在生物转化过程中, 中间产物吡啶甲酸的浓度限制在<2 克/升的值。

利用产碱杆菌属的微生物制造杂芳香
族羧酸的微生物学方法

本发明涉及制备具有下列通式的杂芳香族羧酸或其生理学上可吸收的盐的新的微生物学方法。



I



II

其中 R¹, R² 可以是相同的或者不同并且是氢或者卤原子以及 X 代表氮或者-CH-。

杂芳香族羧酸例如 6-羟基吡啶甲酸是制备药物的重要的中间产物, 例如用于制造 2-羟基嘧啶(德国化学公司报告 1912, 45, 2456-2467 页)或者用于制造除草剂(EP-A 0447004)。

通常含有脲水化酶和酰胺酶或脲水解酶的微生物使脲转化为相应的酸是众所周知的。例如 EP-A0187 680 描述了借助于棒状杆菌属, 诺卡氏菌属, 芽孢杆菌属; *Bacteridium*, 微球菌属以及短杆菌属的微生物制造有机酸例如烟酸的微生物学方法。该反应需要有光能存在才能完成。EP-A0444 640 公开了利用红球菌属微生物制造有机酸如烟酸的微生物学方法。所述反应要求有内酰胺存在才能实现。

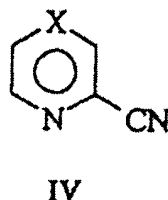
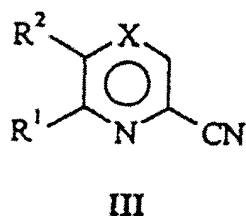
此外还已知例如玫瑰色红球菌 J1 菌株的微生物可将 2-氰吡嗪转变为吡嗪羧酸(Kobayashi et al., J. of Antibiotics, Vol. 43,

NO. 10, 1990, 1316-1320 页) 但该微生物不能将 2-氰吡啶转变为吡啶甲酸(Mathew et al., Appl. Environmental Microbiology, Vol. 54, No. 4, 1988, 1030-1032 页)。可由利用 2-氰吡啶的微生物产碱杆菌属将 2-氰吡啶转变为 6-羟基吡啶甲酸也是已知的(EP-A0504818)。但该方法具有缺点, 即仅获得了中等产率的 6-羟基吡啶甲酸。

本发明的任务是提供一种利用产碱杆菌属微生物制造杂芳香族羧酸或者其生理学可接受盐如吡嗪羧酸, 吡啶甲酸或吡啶甲酸铬的经济的微生物学方法, 利用该方法获得较大产率的所制造的羧酸或生理学上可接受盐。

利用权利要求 1 所述方法可完成这一任务。

本发明的方法按下述方法进行, 即借助于产碱杆菌属的能利用 2-氰吡啶的微生物以具有下列通式的杂芳香族腈作为底物, 将转化为通式 I 或 II 所述的杂芳香族羧酸, 其中所述微生物在进行生物转化之前在一种二羧酸, 三羧酸或一种碳水化合物存在下培养过,



其中 X、R¹ 和 R² 的含义如前所述。

然后在所需情况下将该杂芳香族羧酸转化为生理学上可吸收的盐。作为该羧酸的生理学上可吸收的盐可理解为下列例举的铬、钙或铵盐。

在进行真正的生物转化之前需将该方法所用的产碱杆菌属微生物按常规方法进行培养并用 2-氰吡啶诱导其有效酶。为了进行培

养和诱导可以使用浓度为0.01-20W/W%,优选的是浓度为0.1-1W/W%的2-氰吡啶。

二羧酸指下列富马酸,琥珀酸,苹果酸,戊二酸,丙二酸或其盐和衍生物如酯。

三羧酸,指下列柠檬酸,异柠檬酸或其盐和衍生物如酯。作为所述二羧酸和三羧酸的盐和衍生物,可以利用富马酸盐、苹果酸盐,丙二酸盐,草乙酸盐,柠檬酸盐,乌头酸盐,异柠檬酸盐,2-氧代戊二酸盐,琥珀酸盐或琥珀酰-CoA。优先使用富马酸盐,丙二酸盐或琥珀酸盐。

作为碳水化合物可利用下列单糖如葡萄糖,二糖如蔗糖,海藻糖或麦芽糖,三糖如棉子糖,糖醇如甘油。优先利用甘油作为碳水化合物。

二羧酸,三羧酸或者碳水化合物的适宜浓度是0.1-20W/W%,优先的使用浓度是0.5-5W/W%。

作为培养用的培养基可以是本领域内使用的任何普通培养基,例如 Kulla 等人描述的无机盐培养基(Arch. Microbiol., 135, 1-7, 1983),低克分子浓度的磷酸盐缓冲液或者表1所述培养基。优先使用表1描述的培养基。

在培养阶段结束之后或者在加入底物之前,或者采用常规分离方法收集微生物或者直接将底物供给微生物。

对于生物转化使用的底物,通式III和IV的杂芳香族腈如2-氰吡啶是可购买的商品化合物。

在通式I-IV中X代表氮原子或者-CH-,优先的是-CH-。残基R¹和R²相同或者不同,代表氢或者卤原子如氟,氯,溴或碘。

因此,可以使用的底物是2-氰吡啶,6-氯-2-氰吡啶,5,6-二氯-

2-氰吡啶, 2-氰吡嗪, 6-氯-2-氰吡嗪, 5-溴-6-氯-2-氰吡嗪。合适的底物是 2-氰吡啶, 2-氰吡嗪或者 6-氯-2-氰吡啶。

用于生物转化的底物可以是一次性供给或者连续添加, 合适的情况是底物添加后使底物浓度在培养基中不超过 20% (W/W), 优选的是不超过 10% (W/W)。

通常利用静止细胞完成的生物转化过程, 适当的是用 EP-A0504818 公开的利用 2-氰吡啶的保藏号为 DSM6335 的粪产碱杆菌微生物或者功能等同的变异体和突变体来完成。该微生物于 1991 年 1 月 3 日按照布达佩斯条约规定寄存于德国微生物和细胞培养物收集有限公司, Mascheroder weg 16, D-38124 Braunschweig。

对于“功能等同的变异体和突变体”, 指该微生物基本上具有与原始微生物相同的特性和功能。如此所述的变异体和突变体可以例如采用紫外线照射偶然获得。

用于生物转化的培养基可以与用于微生物培养的培养基相同。所述生物转化可在前面所述二羧酸, 三羧酸或者碳水化合物存在或不存在的条件下实现。

合适的 PH 值在 4-10 范围内, 优先的是在 5-9 范围内。实现生物转化的温度是 10-50°C, 优选的是 20-40°C 温度。

通常在经过 6-100 小时转化时间之后, 采用常规的处理方法例如通过酸性化即得到通式 I 或 II 相应的羧酸。也可以分离出相应羧酸的盐形式如铵或者铬盐。

在好氧条件下完成生物转化时产生在第 6 位上羟基取代的杂芳香族羧酸(通式 II)。在厌氧条件下实施生物转化时产生非羟基化的杂芳香族羧例如吡啶甲酸。

实施例 1

6-羟基吡啶甲酸的制备

选择下列条件用粪产碱杆菌 DSM6335 制备 6-羟基吡啶甲酸。使用工作体积为 5 升的一个 7.5 升发酵罐。在以富马酸钠作为唯一碳源和能源的无机盐培养基(表 1)并以 2-氰吡啶作为诱导剂, 于 30℃, PH7, 0, 600rpm 条件下培养粪产碱杆菌 DSM6335。其中通气量共计约 3 升/分钟。加入富马酸钠时应使 pO_2 控制在大于 30%。使用混合了 0.5% 2-氰吡啶的 20%富马酸钠原液。将细胞在 23 小时内培养至在 650nm 处检测的光密度值(OD650)为 16, 然后开始进行真正的生物转化。在生长阶段需要消耗约 160 克的 20%富马酸钠溶液(800ml)。

如在好氧生物转化条件下将 2-氰吡啶转化为 6-羟基甲基吡啶时不必添加碳源和能源。使用静止期细胞实现生物转化。

利用一个泵来限制 2-氰吡啶的添加, 利用 HPLC “联机”自动检测来监督泵的工作。中间产物吡啶甲酸的形成速率约比吡啶甲酸转化为 6-羟基吡啶甲酸的转化速率高约 2.5 倍(10 克/升. 小时比 4 千克/升. 小时), 应将该中间产物的浓度限制在<2 克/升的值, 否则将抑制吡啶甲酸向 6-羟基吡啶甲酸的转化。在室温下 2-氰吡啶是一种固体材料, 必须将含有 2-氰吡啶的贮存容器加热到 50℃, 从而可以液体形式添加 2-氰吡啶。利用该方法可在 31 小时内制造 75 克/升 6-羟基吡啶甲酸。在生物转化结束后不能再证实存在中间产物吡啶甲酸。

为了分离 6-羟基吡啶甲酸, 通过过滤将细胞分开。此后将无细胞溶液升温到 60℃, 并用浓缩的硫酸将 PH 调至 2-2.5。在该 PH 值时 6-羟基吡啶甲酸从该溶液中沉淀。此后在搅拌条件下慢慢地

冷至 4℃，过滤，残留物用去离子水洗涤并干燥(100mbar, 55℃)。

该母液中约残留 2 克/升的 6-羟基吡啶甲酸。产量共计为起始的 2-氰吡啶的 87%。

表 1

成分	浓度(克/升)
富马酸二钠	10
酵母提取物	1
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
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
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.3
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	0.75
2-氰吡啶	1
KH ₂ PO ₄	0.4
Na ₂ HPO ₄	0.96

实施例 2

吡啶甲酸的制备

按照实施例 1 描述的方法培养生物物质。然后在严格厌氧条件下制备吡啶甲酸。用一个 500ml 带橡胶塞的玻璃瓶进行生物转化, 瓶中装有 OD₆₅₀=20 的 400ml 生物物质, 培养在 30℃ 进行。在开始生物转化之前, 通入纯氮提供厌氧条件。一边搅拌一边通过插管向容器中通入约 30 分钟氮气(500mbar 超压), 以便定量地挤掉氧气。为了防止在生物转化和添加 2-氰吡啶时氧气进入, 在转化期间应维持通气(约 10mbar 超压)。以一小时期间添加 12 次每次直到 10 克/升的方案添加 2-氰吡啶。该添加步骤当然也可连续进行。利用 HPLC 法检测在添加另一份以前是否已将其其他的 2-氰吡啶全部转化为吡啶甲酸。在生物转化时, 没有证实存在吡啶甲酸酰胺。利用该方法可在 26 小时内制备约 150 克/升的吡啶甲酸。该方法没有形成 6-羟基吡啶甲酸。

用 $\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ 使无细胞甲基吡啶酸溶液沉淀以便分离。为此将实施例 2 的无细胞的吡啶甲酸溶液稀释 3 倍, 将该无细胞发酵液预热到 90℃ 后, 边搅拌边以 0.5 克当量 CaCl_2 /每当量吡啶甲酸的浓度掺入 CaCl_2 。形成的 Ca-吡啶甲酸复合物立即沉淀。边搅拌将形成的复合物冷至 4℃, 用半熔的玻璃原料(孔隙度 3)过滤并用蒸馏水洗涤。

过滤残留物悬浮于蒸馏水中并用浓硫酸酸化至 PH 为 2.5。由此吡啶甲酸从复合物中浸提出, 同时形成了不溶性有硫酸钙。该游离的吡啶甲酸有很好的水溶性, 通过过滤可分离出硫酸钙。将甲基吡啶羧酸溶液蒸发至干, 并进行分析, 在滴定之后粗产率为大约 70%, 纯度为 86%。根据 Karl-Fischer 方法测出含水量为 0.7%。

实施例 3

吡啶甲酸铬(III)的制备

向放在一个 500ml 烧瓶中的 PH7.1 的甲基吡啶铵溶液(271.4 克, 0.325mol; 16.8%), 在 3.5 小时时间内于 73℃下滴加入六水合三氯酸铬水溶液(23.95 克, 溶于 63ml 水中的 0.09mol Cr)。继续搅动该紫色溶液 1 小时, 然后使其慢慢冷却到 3℃。等产生的红色固体沉淀之后滗去其上的蓝色相。在 30 分钟内, 将固体悬浮在 100ml 水中之后重新滗去液体。接下来将其再悬浮于 50ml 水(30 分钟)之后, 将该固体抽吸过滤并于 50℃真空干燥。得到 33.64 克暗红色晶体(90%产率)。

实施例 4

用各种各样的碳源培养粪产碱杆菌 DSM6335

在 300ml 爱伦迈耳烧瓶中加入 100ml A+N-培养基(表 1 中除去富马酸二钠盐)用于培养粪产碱杆菌(DSM 6335)。该培养基补加了 2 克/升 2-氰吡啶和 10 克/升下列碳源:

富马酸二钠盐

甘油

丙二酸二钠盐

琥珀酸二钠盐

培养是用摇床于 30℃完成的。在生长 16 小时之后将细胞离心并重悬浮于含 10 克/升 2-氰吡啶的新鲜 A+N-培养基(无碳源)。在 650nm(OD₆₅₀)处测出该细胞悬浮液的光学密度为 10。此后将细胞悬浮液(总体积 10-20ml)于 30℃重新培养。在 308nm 处用分光光度法检测无细胞溶液的吸收值跟踪 6-羟基吡啶甲酸的产生。下表

给出了的产生的 6-羟吡啶甲酸的平均产生量:

碳源	产生量(以克/升. 小时表示)
富马酸二钠	2.4
甘油	2.0
丙二酸二钠	4.2
琥珀酸二钠	0.14

实施例 5

6-羟基吡嗪羧酸

如实施例 4 的方法以富马酸作为碳源培养粪产碱杆菌(DSM 6335)。将洗净的细胞重悬浮于含有 10 克/升 2-氰吡嗪的 A+N-培养基(OD₆₅₀=10)并于 30℃ 进行培养。用分光光度计检测无细胞溶液于 320nm 处吸收值来跟踪 6-羟基吡嗪羧酸的产生。通过在 270nm 处检测吸收值可确定减少的 2-氰吡嗪(底物)的浓度。7 小时之后所加入数量的 2-氰吡嗪被转化为 6-羟基吡嗪羧酸。

实施例 6

6-氯吡啶甲酸和吡嗪羧酸的制备。

如实施例方法 4 的方法以富马酸作为碳源培养粪产碱杆菌(DSM6335)。将生长的细胞重悬浮于玻璃瓶中的 A+N-培养基(OD₆₅₀=10), 该玻璃瓶可用橡胶塞封闭, 并借助于插管通入氮气, 以便去除溶解的氧气。此后向该细胞悬浮液中加入 2-氰吡嗪或 6-氯-2-氰吡啶作为底物, 于 30℃ 培养 3 小时之后原料物质定量地转化为相应的酸[用薄层色谱层分析证明, 带有荧光检测器的硅胶 60, 流动相: 氯仿 30/乙醇 55/NH₄OH(25%) 10/H₂O₅]。