

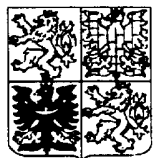
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

282 337

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **668-96**

(22) Přihlášeno: **08. 06. 95**

(40) Zveřejněno: **11. 12. 96**
(Věstník č. 12/96)

(47) Uděleno: **29. 04. 97**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **11. 06. 97**
(Věstník č. 6/97)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 P 17/12

C 12 P 17/10

C 12 P 17/00

// (C 12 P 17/10, C 12 R 1:38,

C 12 R 1:39, C 12 R 1:40)

(73) Majitel patentu:

LONZA A. G., Gampel/Wallis (Dir.:Basel),
CH;

(72) Původce vynálezu:

Klener Andreas dr., Visp, CH;
Roduit Jean-Paul dr., Grone, CH;
Kohr Jörg dr., Raron, CH;
Shaw Nicholas dr., Visp, CH;

(74) Zástupce:

Nowaková Naděžda RNDr. CSc.,
Neustupného 1832/22, Praha 5, 15500;

(54) Název vynálezu:

**Mikroorganismy rodu *Pseudomonas*
a způsob mikrobiologické výroby
S- α -aminokarboxylových kyselin
a amidů R- α -aminokarboxylových kyselin**

(57) Anotace:

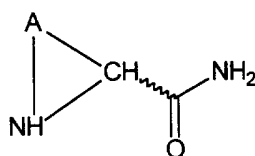
Popsány jsou nové mikroorganismy rodu *Pseudomas*, které jsou schopné amidy α -aminokarboxylových kyselin, ve formě racemátu nebo jeho opticky aktivních isomerů, obecného vzorce I, kde A spolu s -NH- a -CH- znamená popřípadě substituovaný pětičlenný nebo šestičlenný nasycený heterocyklický kruh, zužitkovat jako jediný zdroj dusíku a amidy (RS)- α -aminokarboxylových kyselin shora definovaného vzorce I převést na kyselinu S- α -aminokarboxylovou obecného vzorce II, kde A má uvedený význam.

CZ 282 337 B6

Mikroorganismy rodu Pseudomonas a způsob mikrobiologické výroby S- α -aminokarboxylových kyselin a amidů R- α -aminokarboxylových kyselin

5 Oblast techniky

Vynález se týká nových mikroorganismů, které jsou schopné zužitkovat amid α -aminokarboxylové kyseliny ve formě racemátu nebo jeho opticky aktivních izomerů, obecného vzorce I

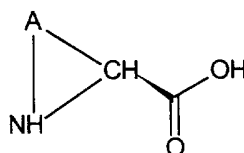


10

(I)

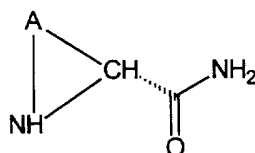
ve kterém A spolu s -NH- a -CH- znamená popřípadě substituovaný pětičlenný nebo šestičlenný nasycený heterocyklický kruh, jako jediný zdroj dusíku a převést amid (RS)- α -aminokarboxylové kyseliny již definovaného vzorce I na S- α -aminokarboxylovou kyselinu obecného vzorce II

15



(II)

20 ve kterém A má jmenovaný význam. Tyto mikroorganismy, popřípadě jejich bezbuněčné enzymy, se používají pro nový způsob přípravy S- α -aminokarboxylových kyselin (vzorec II) a/nebo pro přípravu amidů R- α -aminokarboxylových kyselin obecného vzorce III



25

(III)

kde A má jmenovaný význam.

30 S- α -aminokarboxylové kyseliny vzorec II jako například kyselina S- α -pipekolinová jsou důležité meziprodukty pro výrobu mnoha bioaktivních sloučenin, jako například pro Thioridazin nebo Pipradol (Ng-Youn-Chen a spol., J. Org. Chem., sv. 59, č. 8, 1994).

Dosavadní stav techniky

35

Vedle množství chemických štěpení racemátu kyseliny (RS)-pipekolinové, popřípadě jejich derivátů, jsou známy také biotechnologická štěpení racemátů. Tak popisuje například Huh a spol. (Biosci. Biotech. Biochem., 56 (12), 2081-2082) štěpení racemátu kyseliny (RS)-pipekolinové pomocí R-aminokyselinové oxydasy. Přitom se specificky oxiduje R-izomer na kyselinu 1-piperidein-2-karboxylovou, přičemž vznikne kyselina S-pipekolinová. Po chemické redukci

40

kyseliny ¹-piperidein-2-karboxylové na kyselinu (RS)-pipekolinovou vznikne pak vlivem R-aminokyselinové oxidasy opět kyselina S-pipekolinová. Přitom stále více ubývá kyseliny R-pipekolinové. Analogický způsob přípravy S-prolinu je popsán v J. Ferm. Bioeng., 74, 189-190, 1992. Oba tyto způsoby jsou však nevýhodné v tom, že nejsou schůdné pro velkovýrobu. Dalším nedostatkem je, že se musí použít čištěná R-aminokyselinová oxidasa.

Dále je známo, že racemické estery kyseliny pipekolinové za působení lipasy z *Aspergillus niger* se přeměňují na kyselinu S-pipekolinovou a estery kyseliny R-pipekolinové (Ng-Youn-Chen a spol., 1994, ibid). Tento způsob má však ten nedostatek, že se kyselina S-pipekolinová získá s enantiomerní čistotou ee=93 %.

Podstata vynálezu

Úkolem předloženého vynálezu je poskytnout jednoduchý a technicky schůdný biotechnologický způsob výroby cyklických S- α -aminokarboxylových kyselin, které se mohou izolovat s dobrou enantiomerní čistotou.

Tento úkol se řeší pomocí mikroorganismů podle nároku 1 a způsobem podle nároku 3.

Mikroorganismy podle vynálezu se mohou izolovat ze vzorků půdy, kalu nebo odpadní vody za pomoci obvyklých mikrobiologických postupů. Podle vynálezu se izolace těchto mikroorganismů uskuteční tak, že se

- a) obvyklým způsobem pěstují v médiu s amidem α -aminokarboxylové kyseliny (vzorec I) ve formě racemátu nebo jeho opticky aktivních izomerů jako jediným zdrojem dusíku a s vhodným zdrojem uhlíku
- b)
- b) z kultury získané pěstováním se pak izolují takové, které jsou stabilní a jsou schopné přeměnit amid (RS)- α -aminokarboxylové kyseliny (vzorec I) na S- α -aminokarboxylovou kyselinu (vzorec II).

K tomu se mohou použít všechny mikroorganismy, které specificky obsahují tyto S-aminokyselinové amidasy. Účelně se podrobí selekci ty mikroorganismy, které zužitkují piperazinkarboxamid nebo pipekolinamid ve formě racemátu nebo opticky aktivních izomerů jako jediný zdroj dusíku. Výhodně se podrobí selekci ty mikroorganismy, které zužitkují piperazinkarboxamid nebo pipekolinamid jako jediný zdroj dusíku.

Jako zdroj uhlíku mohou mikroorganismy užít například cukry, alkoholické cukry, karboxylové kyseliny nebo alkoholy jako růstový substrát. Jako cukry se mohou použít hexosy jako například glukosa nebo pentosy. Jako karboxylové kyseliny se mohou použít dikarboxylové kyseliny nebo trikarboxylové kyseliny, popřípadě jejich soli, jako například kyselina citronová nebo sukcinát. Jako alkohol se může použít trojmocný alkohol, jako například glycerin. Výhodně se jako zdroj používá uhlíku trojmocný alkohol jako glycerin.

Jako selekční a růstová média se mohou použít běžná média používaná v oboru, jako například médium obsahující minerální soli podle Kulla a spol., (Arch. Microbiol., 135, 1-7, 1983) nebo médium popsané v tabulce 1. Výhodně se používá médium popsané v tabulce 1.

Během pěstování a selekce se účelně indukují účinné enzymy mikroorganismu. Jako enzymový induktor se může například použít piperazinkarboxamid, pipekolinamid nebo acetamid.

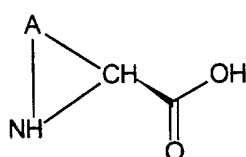
Účelně se pěstování a selekce uskutečňuje při teplotě od 15 do 50 °C, výhodně od 20 do 45 °C

a při hodnotě pH mezi pH 5 a pH 10, výhodně mezi pH 6 a pH 9.

Výhodné mikroorganismy se specifickou aktivitou S-aminokyselinové amidasy jsou mikroorganismy zužitkující pipekolinamid rodu Pseudomonas, zejména druhu Pseudomonas putida s označením DSM 9923 nebo druhu Pseudomonas fluorescens s označením DSM 9924, jakož i jejich funkčně ekvivalentní varianty a mutanty. Tyto mikroorganismy byly uloženy 20.04.1995 u Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur GmbH, Mascheroderweg 1b, D-38124 Braunschweig, podle Budapešťské úmluvy.

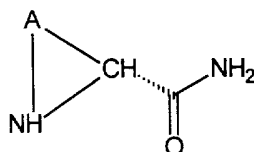
Pod pojmem "funkčně ekvivalentní varianty a mutanty" se rozumějí mikroorganismy, které mají v podstatě stejné vlastnosti a funkce jako původní mikroorganismy. Takové varianty a mutanty mohou náhodně vzniknout, například UV-ozářením.

Způsob přípravy S- α -aminokarboxylových kyselin obecného vzorce II



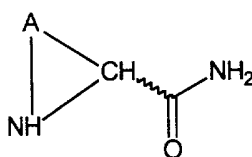
(II)

ve kterém A má jmenovaný význam, a/nebo amidů R- α -aminokarboxylových kyselin obecného vzorce III



(III)

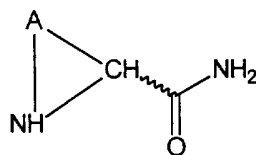
ve kterém A má jmenovaný význam, spočívá podle vynálezu v tom, že se v amidu (RS)- α -aminokarboxylové kyseliny obecného vzorce I



(I)

ve kterém A má jmenovaný význam, amid S- α -aminokarboxylové kyseliny přemění pomocí specifických již popsanych mikroorganismů nebo pomocí bezbuněčných enzymů z těchto mikroorganismů na S- α -aminokarboxylovou kyselinu a ta se izoluje, přičemž při biotransformaci vedle S- α -aminokarboxylové kyseliny vzniká amid R- α -aminokarboxylové kyseliny, který se případně izoluje.

Edukty, amidy (RS)- α -aminokarboxylových kyselin obecného vzorce I



(I)

5

ve kterém A spolu s -NH- a -CH- znamená pětičlenný nebo šestičlenný nasycený heterocyklický kruh, popřípadě substituovaný, ve kterém je heteroatom vybrán z kyslíku, dusíku nebo síry, mohou být získány z odpovídajících aromatických amidů v oboru obvyklou hydrogenací.

10

Jako amidy aminokarboxylových kyselin vzorce I s pětičlenným nasyceným heterocyklickým kruhem se mohou použít popřípadě substituovaný prolinamid, pyrazolidinkarboxamid, imidazolidinkarboxamid, oxazolidinkarboxamid, isoxazolidinkarboxamid, thiazolidinkarboxamid nebo triazolidinkarboxamid. Jako substituovaný prolinamid se může například použít indolinamid.

15

Jako amidy aminokarboxylových kyselin vzorce I se šestičlenným nasyceným heterocyklickým kruhem se mohou použít piperazinkarboxamid, pipekolinamid, morfolinkarboxamid, perhydrochinolinkarboxamid (chinolinankarboxamid), perhydroisochinolinkarboxamid (isochinolinkarboxamid), perhydrochinolinkarboxamid (chinolinkarboxamid), které jsou rovněž popřípadě substituované. Zástupci amidů aminokarboxylových kyselin se substituovaným šestičlenným nasyceným heterocyklickým kruhem mohou být C_1 - C_4 -alkyl-substituované jako například 4-methylpipekolinamid, H_2N-CH_2 -substituované jako například 4-aminomethylpipekolinamid nebo CN-substituované jako například 4-kyanpipekolinamid. Výhodně se používá piperazinkarboxamid, pipekolinamid nebo 4-methylpipekolinamid.

25

Enzymy pro bezbuněčný systém lze získat v oboru běžným způsobem rozbitím mikroorganismů. Například lze pro tento postup použít ultrazvuk, Frenchovo tlakové zařízení nebo metodu s lysozomy. Tyto bezbuněčné enzymy se mohou také imobilizovat na vhodném nosiči.

30

Pro způsob jsou zvláště vhodné výše popsané specifické mikroorganismy druhu *Pseudomonas putida* DSM 9923 a druhu *Pseudomonas fluorescens* DSM 9924, jakož i jejich bezbuněčné enzymy. Stejně vhodné jsou funkčně ekvivalentní varianty a mutanty popsaných mikroorganismů.

35

Biotransformace se může provádět po obvyklém napěstování mikroorganismů s buňkami v klidu (nerostoucí buňky, které již nepotřebují žádný zdroj uhlíku a energie) nebo s rostoucími buňkami.

40

Jako média pro postup s buňkami v klidu mohou sloužit v oboru běžná média, jako například předtím popsané médium s minerálními solemi podle Kulla a spol., 1983 (ibid), nízkomolekulární fosfátové pufr, HEPES-pufr, nebo médium popsané v tabulce 1. Pro postup s rostoucími buňkami se obvykle používá médium, které obsahuje zdroj uhlíku a dusíku, jako například komerčně běžná média nebo médium podle tabulky 1. Výhodně se při postupu použije médium podle tabulky 1.

45

Účelně se biotransformace provádí za jednorázového nebo kontinuálního přidávání amidu (RS)- α -aminokarboxylové kyseliny tak, že koncentrace amidu (RS)- α -aminokarboxylové kyseliny nepřesáhne 20 % hmotnostních, výhodně 10 % hmotnostních.

Hodnota pH média může být v rozmezí od pH 5 do pH 11, výhodně od pH 7 do pH 10.

Účelně se biotransformace provádí při teplotě od 25 do 65 °C, výhodně od 30 do 60 °C.

- 5 Po obvyklé reakční době od 1 do 100 h je amid S- α -aminokarboxylové kyseliny vzorce I úplně přeměněn na S- α -aminokarboxylovou kyselinu, přičemž vzniká také amid R- α -aminokarboxylové kyseliny.

- 10 Tímto způsobem získané S- α -aminokarboxylová kyselina a/nebo amid R- α -aminokarboxylové kyseliny lze izolovat obvyklými postupy zpracování, jako například okyselením, chromatografií nebo extrakcí.

Příklady provedení vynálezu

15

Příklad 1

Izolace mikroorganismů, které zužitkují pipekolinamid jako jediný zdroj dusíku

20

- 100 ml B-média, jehož složení je uvedeno v tabulce 1, bylo dáno do 300 ml Erlenmeyerových baněk a smícháno s ca. 2 g vzorků půdy. Baňky byly po 3 dny inkubovány v klidu při pokojové teplotě. Pak byly čerstvé baňky se stejným médiem smíchány s 2 ml z předchozích kultur a inkubovány v klidu po 4 dny při 30 °C. Tento obohacovací cyklus byl celkem 3 krát opakován, přičemž dva poslední kroky byly provedeny sterilně. Poslední krok byl ještě dodatečně proveden na třepačce při 140 otáčkách za minutu. Nakonec byly obohacené kultury rozetřeny na B-médium s přidanými 16 g/l agaru ke vzniku jednotlivých kolonií. Podrobeny selekci pak byly takové kolonie, jejichž vlastnost přeměňovat (RS)-pipekolinamid na kyselinu pipekolinovou, byla stabilní. K tomu byly kultury rozetřeny na živný agar (Nutrient Agar) a po několika dnech 30 růstu byly z destiček se živným agarem rozetřeny na destičky s pipekolinamidem a glukosou. 2 kmeny, které měly požadovanou stabilní vlastnost, byly identifikovány po Gram-barvení a oxidasovém testu s 20 NE API proužky. Byly identifikovány 2 druhy Pseudomonas: Pseudomonas putida, DSM 9923 a Pseudomonas fluorescens, DSM 9924.

35 Tabulka 1

B-médium:

- 40 Pro přípravu tohoto média bylo k dále popsanému minimálnímu médiu přidáno 1 g^l (RS)-pipekolinamidu a 4 g^l glukosy.

Minimální médium:

Složení	Koncentrace (mg/l)
45 extrakt droždí	500
Na ₂ SO ₄	100
Na ₂ HPO ₄	2000
KH ₂ PO ₄	1000
50 NaCl	3000
MgCl ₂ ·6H ₂ O	400
CaCl ₂ ·2H ₂ O	14,5
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,8

	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	100x10 ⁻³
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	90x10 ⁻³
	H ₃ BO ₃	300x10 ⁻³
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	200x10 ⁻³
5	CuCl ₂ ·2H ₂ O	10x10 ⁻³
	NiCl ₂ ·6H ₂ O	20x10 ⁻³
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	30x10 ⁻³
	EDTANa ₂ ·2H ₂ O	5
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2
10		

Příklad 2

Příprava kyseliny S-pipekolinové:

15 S kmeny izolovanými v příkladu 1 byly uskutečněny 1% pipekolinamidové biotransformace (koncentrace substrátu 1 %) v 0,1 M fosfátovém pufru při pH 7,0, při 30 °C a při 130 otáčkách za min. Biomasa z předkultur byla zahuštěna a přidána k 0,1 M fosfátovému pufru pH 7,0, aby se získala koncentrace biomasy OD_{650nm}=10. Nasazené kultury byly inkubovány na třepačce při 20 30 °C, 130 otáčkách za min. a odebírány vzorky v různých časových bodech. Bezbuněčné supernatanty byly testovány pomocí tenkovrstevné chromatografie (silikagel, vyvíjecí rozpouštědlo: 11 dílů ethanolu, 6 dílů CHCl₃, 6 dílů NH₄OH 25%) na obsah zbylého amidu a vytvořené kyseliny pipekolinové. Pak byly bezbuněčné supernatanty testovány pomocí vysokotlakové kapalně chromatografie (HPLC; tvorba isothiokyanátových derivátů), aby se 25 otestovala enantiomerní čistota vytvořené kyseliny pipekolinové. Výsledky ukázaly, že Pseudomonas putida a Pseudomonas fluorescens produkují kyselinu S-pipekolinovou o optické čistotě nad 90 %. Optimální podmínky pro biotransformaci s Pseudomonas putida byly při pH 8,0 a teplotě 30 °C, pro Pseudomonas fluorescens pH 8,0 a 50 °C.

30 Jestliže se biotransformace uskutečnila s Pseudomonas putida, získala se kyselina S-pipekolinová s ee-hodnotou 95,0 %; jestliže se biotransformace uskutečnila s Pseudomonas fluorescens, získala se kyselina S-pipekolinová s ee-hodnotou 97,3 %. ee-hodnota znamená enantiomerní přebytek (enantiomeric excess).

35

Příklad 3

Příprava kyseliny S-piperazinkarboxylové

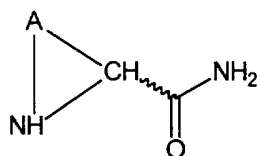
40

Se dvěma izolovanými kmeny, jak v příkladu 1 popsáno pro pipekolinamid, byla uskutečněna 1% piperazinkarboxamidová biotransformace při pH 7,0, při 30 °C a při 130 otáčkách za min. Bezbuněčné supernatanty byly rovněž testovány na obsah zbylého piperazinkarboxamidu a vytvořené kyseliny piperazinkarboxylové pomocí tenkovrstevné chromatografie. HPLC- 45 analýza umožnila testovat optickou čistotu vytvořené kyseliny piperazinkarboxylové. Jestliže by se biotransformace uskutečnila s Pseudomonas putida, získala se kyselina S-piperazinkarboxylová s ee-hodnotou 73,9 %; jestliže by se biotransformace uskutečnila s Pseudomonas fluorescens, získala se kyselina S-piperazinkarboxylová s ee-hodnotou 59,5 %.

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Mikroorganismy, druhu Pseudomonas putida DSM 9923 nebo druhu Pseudomonas fluorescens DSM 9924, které jsou schopné zužitkovat amidy α -aminokarboxylových kyselin, ve formě racemátu nebo jeho opticky aktivních isomerů, obecného vzorce I

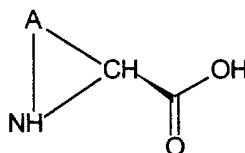


10

(I)

kde A spolu s -NH a -CH znamená nesubstituovaný nebo substituovaný pětičlenný nebo šestičlenný nasycený heterocyklický kruh, ve kterém je heteroatom vybrán z kyslíku, dusíku nebo síry, jako jediný zdroj dusíku a převést amidy (RS)- α -aminokarboxylových kyselin shora definovaného vzorce I na kyselinu S- α -aminokarboxylovou obecného vzorce II

15



(II)

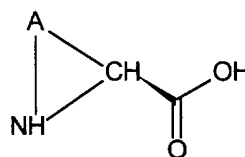
20

kde A má uvedený význam.

25

2. Mikroorganismy podle nároku 1, které jsou schopné zužitkovat pipekolinamid nebo piperazinkarboxamid ve formě racemátu nebo jeho opticky aktivních isomerů jako jediný zdroj dusíku.

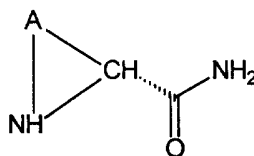
3. Způsob mikrobiologické výroby kyselin S- α -aminokarboxylových obecného vzorce II



30

(II)

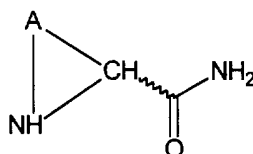
kde A má uvedený význam a/nebo amidů R- α -aminokarboxylových kyselin obecného vzorce III



35

(III)

kde A má uvedený význam, **vyznačující se tím**, že se v amidu (R,S)- α -aminokarboxylové kyseliny obecného vzorce I



5

(I)

kde A má uvedený význam, převede amid S- α -aminokarboxylové kyseliny pomocí mikroorganismů rodu Pseudomonas nebo pomocí bezbuněčných enzymů z těchto mikroorganismů na kyselinu S- α -aminokarboxylovou a izoluje se, přičemž při biotransformaci vznikne vedle kyseliny S- α -aminokarboxylové amid kyseliny R- α -aminokarboxylové, který se popřípadě izoluje.

4. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že se biotransformace provádí pomocí mikroorganismů druhu Pseudomonas putida DSM 9923 nebo druhu Pseudomonas fluorescens DSM 9924 nebo s jejich funkčně ekvivalentními variantami a mutanty nebo s bezbuněčnými enzymy z těchto mikroorganismů.

5. Způsob podle nároků 3 nebo 4, **vyznačující se tím**, že se jako amid (R,S)- α -aminokarboxylové kyseliny použije (R,S)-pipekolinamid, (R,S)-piperazinkarboxamid, (R,S)-4-methylpipekolinamid nebo (R,S)-prolinamid.

6. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 3 až 5, **vyznačující se tím**, že se biotransformace provádí za jednorázového nebo kontinuálního přidání amidu (R,S)- α -aminokarboxylové kyseliny tak, aby koncentrace amidu (R,S)- α -aminokarboxylové kyseliny v kultivačním médiu nepřesáhla 20 % hmotnostních.

7. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 3 až 6, **vyznačující se tím**, že se biotransformace provádí při hodnotě pH od 7 do 10 a při teplotě od 30 do 60 °C.

30

Konec dokumentu

35