

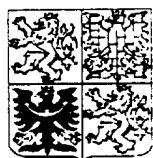
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

282 098

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1507-95**

(22) Přihlášeno: **08. 06. 95**

(30) Právo přednosti:
09. 06. 94 CH 94/1813
13. 07. 94 CH 94/2231

(40) Zveřejněno: **15. 05. 96**
(Věstník č. 5/96)

(47) Uděleno: **12. 03. 97**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **14. 05. 97**
(Věstník č. 5/97)

(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 17/12, C 12 R 1:22,

C 12 R 1:38, C 12 R 1:40)

(73) Majitel patentu:

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

(72) Původce vynálezu:

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

(74) Zástupce:

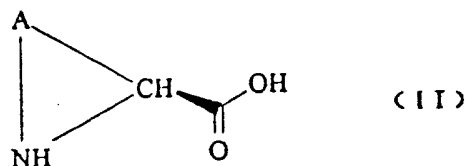
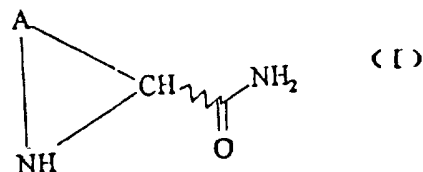
Nowaková Naděžda RNDr.CSc.,
Neustupného 1832/22, Praha 5, 15500;

(54) Název vynálezu:

**Mikroorganismy rodu *Klebsiella* a způsob
mikrobiologické výroby
S-alfa-aminokarboxylových kyselin a
amidů R-alfa-aminokarboxylových kyselin**

(57) Anotace:

Popsány jsou nové mikroorganismy rodu *Klebsiella*, 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 282 098 B6

Mikroorganismy rodu Klebsiella 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



15

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

20

25



30

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

35

40



kde A má jmenovaný význam.

45

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

50

Dosavadní stav techniky

Vedle množství chemických štěpení racemátu kyseliny (RS)-pipekolinové, popřípadě jejích 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 oxydázy. Přitom se specificky oxiduje R-izomer na kyselinu 1-piperidein-2-karboxylovou, přičemž vznikne kyselina S-pipekolinová. Po chemické redukci kyseliny 1-piperidein-2-karboxylové na kyselinu (RS)-pipekolinovou vznikne pak vlivem R-aminokyselinové oxydázy 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 čišťená R-aminokyselinová oxydáza.

Dále je známo, že racemické estery kyseliny pipekolinové za působení lipázy 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) 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 amidázy. 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 hexózy, jako například glukóza nebo pentózy. 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 uhlíku používá 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 amidázy jsou mikroorganismy, zužitkující piperazinkarboxamid rodu Klebsiella, zejména druhu Klebsiella pneumoniae s označením DSM 9175 a DSM 9176, nebo druhu Klebsiella terrigena s označením DSM 9174, jakož i jejich funkčně ekvivalentní varianty a mutanty. Tyto mikroorganismy byly uloženy 25. 04. 1994 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.

Vědecký popis mikroorganismu DSM 9175, identifikovaný jako Klebsiella pneumoniae

20 Vlastnosti kmene

	buněčná forma	tyčinky
	šířka µm	0,8-1,0
	délka µm	1,0-3,0
25	pohyblivost	-
	Gram-reakce	-
	lyze 3 %ním KOH	+
30	aminopeptidáza (Cerny)	+
	spóry	-
	oxidáza	-
35	kataláza	+
	růst	
	anaerobní	+
40	kyselina z (OF-test)	
	glukózy aerobně	+
	glukózy anaerobně	+
45	plyn z glukózy	+
	kyselina z (ASS)	
	glukózy	+
	fruktózy	+
50	xylózy	+
	erythritolu	-
	adonitu	+
	D-manózy	+

	L-rhamnózy	+	
	dulcitu	-	
	inositu	+	
	sorbitu	+	
5	α -methyl-D-glukosidu	+	
	cellobiózy	+	
	maltózy	+	
	laktózy	+	
	L-sorbózy	+	
10	L-fukózy	-	
	D-arabitolu	+	
	ONPG	+	
15	ADH	-	
	LDC	+	
	ODC	-	
20	VP	+	
	indol	-	
25	tvorba H ₂ S	-	
	Simmonův citrát	+	
	fenylalaninidesamináza	-	Zkratky:
30	ureáza	-	ASS = kys. acetylsalicylová OF = oxidace-fermentace
	hydrolýza		ONPG = O-nitrofenylgalaktosidáza
35	želatiny	-	ADH = alkoholdehydrogenáza
	DNA	-	VP = Voges Proskauer

Vědecký popis mikroorganismu DSM 9176, identifikovaný jako Klebsiella pneumoniae

40	Vlastnosti kmene	
	buněčná forma	tyčinky
	šířka μm	0,8-1,0
	délka μm	1,0-3,0
45	pohyblivost	-
	Gram-reakce	-
	lyze 3 %ním KOH	+
50	aminopeptidáza (Cerný)	+
	spóry	-

	oxidáza	-
	kataláza	+
5	růst	
	anaerobní	+
	kyselina z (OF-test)	
	glukózy aerobně	+
10	glukózy anaerobně	+
	plyn z glukózy	+
	kyselina z (ASS)	
15	glukózy	+
	fruktózy	+
	xylózy	+
	erythritolu	-
	adonitu	+
20	D-manózy	+
	L-rhamnózy	+
	dulcitu	-
	inositu	+
	sorbitu	+
25	α -methyl-D-glukosidu	+
	cellobiózy	+
	maltózy	+
	laktózy	+
	L-sorbózy	-
30	L-fukózy	+
	D-arabitolu	+
	ONPG	+
35	ADH	-
	LDC	+
	ODC	-
40	VP	+
	indol	-
45	tvorba H ₂ S	-
	Simmonův citrát	+
	fenylalanindesamináza	-
50	ureáza	-
	hydrolýza	

želatiny	-
DNA	-

Vědecký popis mikroorganismu DSM 9174, identifikovaný jako Klebsiella terrigena

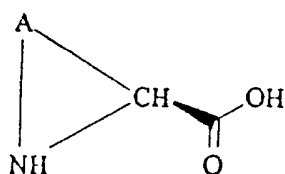
5

Vlastnosti kmene

	buněčná forma	tyčinky
10	šířka μm	0,8-1,0
	délka μm	1,0-2,0
	pohyblivost	-
15	Gram-reakce	-
	lyze 3 %ním KOH	+
	aminopeptidáza (Cerny)	+
	spóry	-
20	oxidáza	-
	kataláza	+
25	růst	
	anaerobní	+
	kyselina z (OF-test)	
	glukózy aerobně	+
30	glukózy anaerobně	+
	plyn z glukózy	+
	kyselina z (ASS)	
35	glukózy	+
	fruktózy	+
	xylózy	+
	erythritolu	-
	adonitu	+
40	D-manózy	+
	L-rhamnózy	+
	dulcitu	-
	inositu	+
	sorbitu	+
45	α -methyl-D-glukosidu	+
	cellobiózy	+
	maltózy	+
	laktózy	+
	L-sorbózy	+
50	L-fukózy	+
	D-arabitolu	+
	5-ketoglukonátu	+

	ONPG	+
	ADH	-
5	LDC	+
	ODC	+
	VP	+
10	indol	-
	tvorba H ₂ S	-
15	Simmonův citrát	+
	fenylalaninidesamináza	-
	ureáza	-
20	hydrolyza želatiny	-
	DNA	-
25	Způsob přípravy S- α -aminokarboxylových kyselin obecného vzorce II	

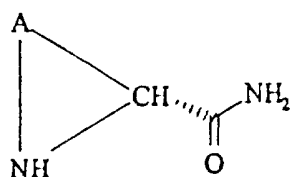
30



(II),

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

40

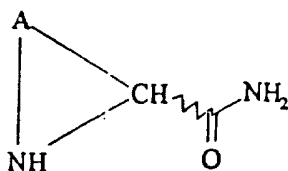


(III),

45

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

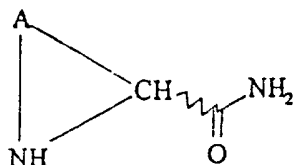
50



(I),

ve kterém A má jmenovaný význam, amid S- α -aminokarboxylové kyseliny přemění pomocí specifických již popsaných 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



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

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.

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 C₁-C₄-alkyl-substituované, jako například 4-methylpipekolinamid, H₂N-CH₂-substituované, jako například 4-aminomethylpipekolinamid, nebo CN-substituované, jako například 4-kyanpipekolinamid. Výhodně se používá piperazinkarboxamid, pipekolinamid nebo 4-methylpipekolinamid.

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.

Pro způsob jsou zvláště vhodné výše popsané specifické mikroorganismy druhu *Klebsiella terrigena* DSM 9174, *Klebsiella pneumoniae* DSM 9175 a DSM 9176, jakož i jejich bezbuněčné enzymy. Stejně vhodné jsou funkčně ekvivalentní varianty a mutanty popsaných mikroorganismů.

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.

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), nízko-molekulární fosfátové pufrы, 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.

- 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.

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

- 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

Příklad 1

- a) Izolace mikroorganismů, které jsou schopné zužitkovat racemický piperazinkarboxamid jako jediný zdroj dusíku:

- Pro izolaci mikroorganismů, které jsou schopné zužitkovat racemický piperazinkarboxamid jako jediný zdroj dusíku, se použilo A-médium, jehož složení je uvedeno v tabulce 1. 100 ml tohoto média se dalo do 300 ml Erlenmeyerovy baňky a smíchalo s různými vzorky půdy (2 g) z provozního areálu firmy LONZA AG ve Visp, Švýcarsku. Baňky byly inkubovány v klidu při 30 °C po dobu 5 dnů. Pak se použil 1 ml tohoto A-média, aby se naočkovala čerstvá baňka se stejným médiem. Tato baňka byla opět inkubována za stejných podmínek. Celkově se tento obohacovací cyklus opakoval 5-krát. Potom byly tyto obohacené kultury rozetřeny na agarové médium (A-médium s 16 g l⁻¹ agaru) jako jednotlivé kolonie. Izolované mikroorganismy byly testovány následujícím kvalitativním testovacím systémem na stereoselektivní amidázy. Použily se jednotlivé kolonie pro naočkování 100 ml A-média do 300 ml Erlenmeyerových baněk. Tyto baňky byly tři dny inkubovány na třepačce při 30 °C, přičemž byly kultury již po jednom dni vymyty. Pak byly bezbuněčné supernatanty kultur testovány na obsah kyseliny piperazinkarboxylové a piperazinkarboxamid pomocí tenkovrstvé chromatografie (silikagel, vyvíjecí rozpouštědlo: 11 dílů ethanolu, 6 dílů CHCl₃, 6 dílů NH₄OH (25 %), důkaz pomocí ninhydrinu). Mikroorganismy, které přeměnily asi polovinu vneseného množství (RS)-piperazinkarboxamidu, byly použity pro biochemické testy ke zjištění, které kmeny obsahovaly S-specifické amidázy.

b) Biochemické testy pro identifikaci mikroorganismů s S-specifickými amidázami:

- Pro přípravu proteinového surového extraktu byly buňky kultivovány v 1 litru A-média při 30 °C a pak byly sebrány a promyty. 5 g buněk (mokrý váha) bylo resuspendováno v 10 ml 69 mM fosfátového pufru, pH 7,0, a pomocí FRENCH^R-tlakového zařízení byly buňky rozbity. Surové extrakty po odstředění 2 hodiny při 40 000 x g byly v porcích zmrazeny při -20 °C. Pro určení stereoselektivity byly porovnávány hydrolyzáty R-prolinamidu a S-prolinamidu. K tomu byl

použit následující enzymový test: objem assaye 1 ml, obsahující 69 mMol fosfátového pufru, pH 7,0. 100 - 800 µg proteinového surového extraktu, 2 mg S-prolinamid.HCl respektive R-prolinamid.HCl, doba inkubace 1 - 24 hodin, teplota inkubace 30 °C, detekce pomocí ninhydrinu po chromatografii na tenké vrstvě (viz nahoře). Amidázy kmenů DSM 9174, DSM 9175 a DSM 9176 ukázaly velmi pomalou hydrolýzu R-prolinamidu. Tyto kmeny byly použity pro přípravu opticky aktivních cyklických derivátů α -aminokyselin.

Surové extrakty kmenů DSM 9175 a DSM 9176 ukázaly při stejných podmínkách hydrolýzu (RS)-piperazinkarboxamidu a (RS)-pipekolinamidu. Změnou inkubační teploty a hodnoty pH roztoku assaye bylo zjištěno, že specifická aktivita amidáz byla nejvyšší mezi teplotou od 30 - 60 °C a hodnotou pH od 7 - 10.

Tabulka 1

15 A-médium:

Pro přípravu tohoto média bylo k dále popsanému minimálnímu médiu přidáno 2 g^l (RS)-piperazinkarboxamidu a 10 g^l glycerinu.

20 Minimální médium:

Složení	Koncentrace (mg/l)
extrakt droždí	500
Na ₂ SO ₄	100
Na ₂ HPO ₄	2000
KH ₂ PO ₄	1000
NaCl	3000
MgCl ₂ x 6H ₂ O	400
CaCl ₂ x 2H ₂ O	14,5
FeCl ₃ x 6H ₂ O	0,8
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	100 x 10 ⁻³
MnCl ₂ x 4H ₂ O	90 x 10 ⁻³
H ₃ BO ₃	300 x 10 ⁻³
CoCl ₂ x 6H ₂ O	200 x 10 ⁻³
CuCl ₂ x 2H ₂ O	10 x 10 ⁻³
NiCl ₂ x 6H ₂ O	20 x 10 ⁻³
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	30 x 10 ⁻³
EDTANa ₂ x 2H ₂ O	5
FeSO ₄ x 7H ₂ O	2

25

Příklady 2 - 4

Příprava kyseliny S-piperazinkarboxylové

30 Pro přípravu kyseliny S-piperazinkarboxylové pomocí kmenů DSM 9174, DSM 9175 a DSM 9176 byly zvoleny následující podmínky. Pro biotransformaci byl použit 1,5 l fermentor, vybavený řízením pH, o pracovním objemu 1 l. Pro fermentace bylo v A-médiu zvýšeno množství glycerinu na 30 g^l a množství (RS)-piperazinkarboxamidu na 20 g^l. Buňky byly kultivovány při pH 7,0, teplotě 30 °C a provětrávání 0,5 lmin⁻¹. V jednom případě (příklad 4) 35 byly buňky nejdříve kultivovány 16 hodin za těchto podmínek, pak byla teplota zvýšena na 40 °C a pH média bylo zvýšeno na 8,0. Po určitých časových intervalech bylo stanoveno množství

vytvořené kyseliny S-piperazinkarboxylové pomocí chromatografie na tenké vrstvě a fermentace byla přerušena po 36 - 72 hodinách, kdy byla přibližně polovina použitého piperazin-karboxamidu přeměněna. K tomuto okamžiku byly optické hustoty buněčné suspenze při 650 nm mezi 6 a 10. Pro izolaci kyseliny S-piperazinkarboxylové byl bezbuněčný roztok zahuštěn za sníženého tlaku na 100 ml. Roztok byl okyselen koncentrovanou HCl na pH 1,0, aby kyselina vypadla jako dihydrochlorid. Izolovaná kyselina byla překrystalizována v 0,1 M HCl a sušena. Pro stanovení ee-hodnoty (enantiomeric excess - enantiomerní přebytek) vytvořené kyseliny byla nejprve kyselina převedena na deriváty pomocí 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glukopyranosylisothiokyanátu a analyzována pomocí kapilární elektroforézy (podmínky kapilární elektroforézy jsou uvedeny v tabulce 2). Výsledky jsou popsány v tabulce 3.

Tabulka 2

15 Podmínky kapilární elektroforézy

CE zařízení:	Hewlett-Packard HP ^{3D} CE
Detektor:	Detektor Hewlett-Packard s diodovou řadou
Pufr:	10 mM Di-natriumhydrogenfosfátu, 10 mM kyselina borová, 150 mM Natriumdodecylsulfátu, pH 9,0
Elektrolyt:	900 ml pufru plus 100 ml methanolu
Kapilára:	HP G1600-61211
Elektrické pole:	20 kV
Proud:	ca. 24 - 30 μ A
Teplota ohříváče:	20 °C
Nastavení detektoru:	210 nm (šířka svazku 5 nm)
Doba migrace:	ca. 17,1 min. (S-kyselina) ca. 17,7 min. (R-kyselina)

30

Tabulka 3

Příklad Kmen	Surový produkt	Překrystalizováno	Výtěžek	ee-hodnota
č. 2 DSM 9175	12,82 g	10,74 g	68,3 %	99,6
č. 3 DSM 9174	15,53 g	13,1 g	83,3 %	99,4
č. 4 DSM 9176	21,23 g	11,32 g	72,0 %	99,6

35

Příklad 5

Příprava kyseliny S-pipekolinové pomocí Klebsiella:

40 Buňky v klidu kmenů Klebsiella pneumoniae DSM 9175 a DSM 9176 přeměnily 20 g^l (RS)-pipekolinamidu při 47 °C a hodnotě pH 8,0 během 6 hodin na (S)-kyselinu.

Když se tato přeměna prováděla s Klebsiella pneumoniae DSM 9175, získala se kyselina S-pipekolinová s ee-hodnotou 96,5 %.

Příklad 6

Příprava kyseliny S-4-methylpipekolinové

- 5 Pro tuto reakci byl přeměněn racemický 4-methylpipekolinamid (substrát) proteinovým surovým extraktem z Klebsiella pneumoniae DSM 9175 nebo Klebsiella terrigena DSM 9174 podobně jako v příkladu 1b. Po inkubaci 24 hodin při pH 8,0 a 47 °C bylo z 0,2%ního roztoku substrátu přeměněno ca. 50 % vneseného amidu (měřeno analýzou pomocí chromatografie na tenké

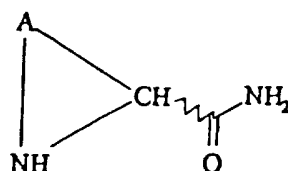
10

PATENTOVÉ NÁROKY

15

1. Mikroorganismy druhu Klebsiella terrigena DSM 9174 nebo druhu Klebsiella pneumoniae DSM 9175 a DSM 9176, které jsou schopné zužitkovat amidy α -aminokarboxylových kyselin, ve formě racemátu nebo jeho opticky aktivních isomerů, obecného vzorce I

20

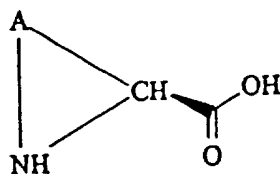


(I).

25

30 kde A spolu s -NH a -CH znamená popřípadě 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

35



(II),

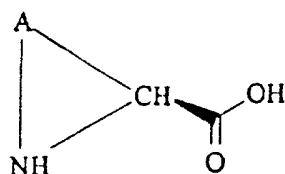
40

kde A má uvedený význam.

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

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

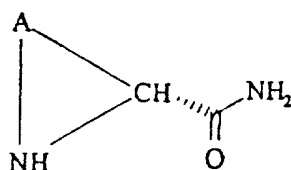
5



(II),

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

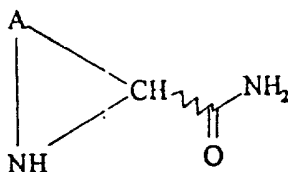
15



(III),

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

25



(I),

30

kde A má uvedený význam, převede amid S- α -aminokarboxylové kyseliny pomocí
mikroorganismů rodu Klebsiella 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
35 izoluje.

4. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že se biotransformace provádí
pomocí mikroorganismů druhu Klebsiella terrigena DSM 9174 nebo druhu Klebsiella
40 pneumoniae DSM 9175 a DSM 9176 nebo s jejich funkčně ekvivalentními variantami a mutanty,
nebo s bezbuněčnými enzymy z těchto mikroorganismů.

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

6. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 3 až 5, **vyznačující se tím**, že se
50 biotransformace provádí za jednorázového nebo kontinuálního přidání amidu (R,S)- α -amino-
karboxylové 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, **v y z n a č u j í c í s e t í m .** že se biotransformace provádí při hodnotě pH od 7 do 10 a při teplotě od 30 do 60 °C.

5

Konec dokumentu
