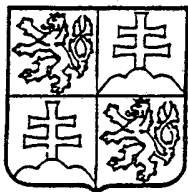


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 00663-92

(13) A3

(22) 05.03.92

(32) 07.03.91

(31) 91/696

(33) CH

(40) 16.09.92

5(51) C 12 P 7/02.
C 07 D 213/28.
C 12 N 15/78

(71) LONZA A.G., Basel, CH

(72) Kiener Andreas dr., Visp, CH
Zimmermann Thomas dr., Waters, CH

(54) Mikrobiologický způsob terminální hydroxylace
ethylových skupin aromatických heterocyklu

(57) Je popsán nový mikrobiologický způsob terminální
hydroxylace ethylových skupin aromatických
pětičlenných nebo šestičlenných heterocyklu.
Hydroxylace se provádí s mikroorganismy, které
a) obsahují geny Pseudomonas OCT-plasmidu, které
tvorí aktivní alkanmonooxygenázu a b) netvoří
účinnou chromosomálně nebo plasmidově kódovanou
alkoholdehydrogenázu.

0030
683-9

Číslo	012161
Řízení	05. III 92
ÚŘAD PRO VYVÁLEZY A OBJEVY	
Příl.	

Mikrobiologický způsob terminální hydroxylace ethylových skupin aromatických heterocyklů

Oblast techniky

Vynález se týká nového mikrobiologického způsobu terminální hydroxylace ethylových skupin na aromatických pětičlenných nebo šestičlenných heterocyklech a nového hybridního plasmidu pro tento způsob.

Dosavadní stav techniky

2-hydroxyethylové deriváty jsou důležité meziprodukty pro výrobu farmaceuticky účinných látek, jako je například 2-(4-pyridyl)ethanol pro výrobu derivátů kyseliny penicilinové.

Je známo, že biochemická oxidace alkanů probíhá v mikroorganismech rodu *Pseudomonas oleovorans* ve třech stupních. Působením komplexu alkan-hydroxylasa, (alkBA geny, které jsou dále označovány jako alkBFGH geny) vzniká nejprve odpovídající alkohol. Ten se pak převádí na kyselinu v dalších dvou stupních za katalytického působení alkoholdehydrogenázy (alkC geny) a aldehyddehydrogenázy (chromosomálně nebo plasmidově kódované). V tomto kmeni jsou geny, které řídí enzymy oxidace, umístěné na plasmidu OCT (Witholt a spol., TIBTECH, sv. 8, 1990, str.46-52).

Dále je znám z EP-A 277 674 mikrobiologický způsob terminální hydroxylace apolárních alifatických sloučenin s 6 až 12 atomy uhlíku. Například je známá výroba 1-oktanolu pomocí mikroorganismů rodu *Pseudomonas oleovorans* nebo *Pseudomonas putida*, které jsou resistantní vůči apolárním fázím. Z příkladu provedení je zřejmé, že je nutné uskutečnit hydroxylaci těchto sloučenin v nákladném dvoufázovém systému.

Chemickými postupy jsou 2-hydroxyethylderiváty pětičlenných nebo šestičlenných heterocyklů rovněž obtížně dostupné.

Podstata vynálezu

Úkolem předloženého vynálezu je tedy vypracovat jednoduchý mikrobiologický způsob terminální hydroxylace ethylových skupin na aromatických pětičlenných nebo šestičlenných heterocyklech.

Úkol je řešen podle patentového nároku 1.

Způsob podle vynálezu se provádí pomocí mikroorganismů, které

- a) obsahují geny z Pseudomonas OCT-plasmidu, které tvoří aktivní alkanmonooxygenázu,
- b) netvoří účinnou chromosomálně nebo plasmidově kódovanou alkoholdehydrogenázu

a jsou proto schopné hydroxylovat ethylové skupiny aromatických pětičlenných nebo šestičlenných heterocyklů na odpovídající hydroxylové deriváty. Heterocyklus slouží jako substrát pro reakci a hydroxyethylderivát není dále metabolizován.

Mikroorganismy obsahují účelně geny alkBFGH z Pseudomonas OCT-plasmidu, které kódují komplex alkan-hydroxyláza. Účelně se přitom odstraní nebo inaktivují alkC geny nebo jiné geny, které kódují aktivní alkoholdehydrogenázu.

Zdroj genů alkanmonooxygenázy

Jako zdroj genů alkanmonooxygenázy slouží OCT-plasmid například z Pseudomonas oleovorans nebo jiných mikroorganismů využívajících alkanů.

Vhodné jsou rovněž vytvořené hybridní plasmidy s geny alkanmonooxygenázy, které jsou obsaženy v jiných mikroorganismech, jako například v E.coli nebo v Pseudomonas putida. Jako takovýto hybridní plasmid může například sloužit plasmid pGEc41, obr. 1, uložený buď v E.coli DH1 (uložený u holandské Centrální sbírky plísňových kultur CBS č. 102-87) nebo v E.coli DH1 (uložený u Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur DSM č. 6726). Nově vytvořený hybridní plasmid pGMK921, obr. 3, uložený buď v Pseudomonas putida PpS81 (DSM 6676) nebo v Pseudomonas putida GP012 (DSM 6775) může rovněž sloužit jako zdroj genů alkanmonooxygenázy.

Genetickou informaci, která kóduje alkanmonooxygenázu, lze získat takovým způsobem, kdy a) se z mikroorganismů izoluje buď

DNA OCT-plasmidu nebo DNA hybridního plasmidu, pak b) se tato DNA pro izolaci genu alkanmonooxygenázy štěpí a tato specifická genová sekvence c) se pak vnese do expresního vektoru, čímž vznikne hybridní plasmid d). Tento hybridní plasmid se pak může vnést do vhodného e) mikroorganismu (hostitelský kmen) pomocí f) transformace. Tento transformovaný hostitelský kmen e) představuje pak produkční kmen g) pro postup podle vynálezu.

a) Isolace DNA OCT-plasmidu (DNA hybridního plasmidu)

Jak DNA OCT-plasmidu, tak také DNA hybridního plasmidu lze získat metodami běžnými v oboru. Například se mikroorganismus zcela lyzuje a požadovaná DNA plasmidu se získá pomocí odstředění v gradientu hustoty. Lze například postupovat podle učebnice "Current Protocols in Molecular Biology", Asubel a spol., vyd., J. Wiley, New York, 1989, odd. 2.

b) Štěpení DNA plasmidu restrikčními enzymy

Po izolaci DNA plasmidu ji lze štěpit restrikčními enzymy postupy běžnými v oboru tak, že DNA netvoří žádnou plasmidově kódovanou alkoholdehydrogenázu. Získaný štěp DNA (alkBFGH), který kóduje aktivní alkanmonooxygenázu, lze pak například izolovat gelovou elektroforézou na agarovém gelu.

c) Ligace štěpu DNA do expresního vektoru

Takto získaný štěp genu alkBFGH lze ligovat pomocí běžných molekulárněbiologických postupů s DNA expresního vektoru předem podobně rozštěpenou, jako je například popsáno autory M.Kok a spol. v J. Biol. Chem. 1989, 264, str. 5442-5451.

Expresní vektory obvykle obsahují vhodný, většinou regulovatelný promotor. Za tímto promotorem leží vhodně ve směru transkripce jedno nebo více singulárních míst štěpení pro restrikční enzymy. Do tohoto štěpného místa se pak obvykle inseruje požadovaný genový štěp, o jehož expresi je zájem.

Transkripci genů alkBFGH lze iniciovat jak alk-promotorem za přirozené regulace (pGEc41), tak také promotorem tacI jako alk-promotorem za přirozené regulace (pGMK921).

V zásadě jsou vhodné všechny expresní vektory, které mohou replikovat a exprimovat genový štěp alkBFGH ve zvoleném hostiteli.

d) Hybridní plasmidy

Takto účelně vzniklé hybridní plasmidy mají široké hostitelské spektrum a mohou být proto umístěny do hostitelských kmenů s velkou substrátovou a eduktovou tolerancí. Zvláště se používá hybridní plasmid pGEc41, který byl uložen v E.coli DH1 jednak 15. ledna 1987 u holandské sbírky "Centralbureau voor Schimmelcultures at Baarn" s číslem CBS 102-87 a jednak 30. září 1991 u Německé sbírky pro mikroorganismy a buněčné kultury GmbH (DSM), Mascheroderweg 1b, D-3300 Braunschweig, pod číslem DSM 6726.

Další zvláště vhodný hybridní plasmid je hybridní plasmid pGMK921, obr. 3, který byl uložen jak v Pseudomonas putida PpS81 DSM 6776, tak také v Pseudomonas putida GP012 DSM 6775 6. listopadu 1991 u Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur. Tento hybridní plasmid podle vynálezu představuje další vývoj již známého hybridního plasmidu pGEc285 uvedeného v J. Biol. Chem., 1989, 264, str. 5442-5451. Vytvoření hybridního plasmidu pGMK921 je schematicky znázorněno na obr. 2.

e) Hostitelské kmeny

Takto získané hybridní plasmidy lze vložit do velkého množství hostitelských kmenů. Účelně se používají hostitelské kmeny s velkou substrátovou a eduktovou tolerancí, jako jsou například mikroorganismy rodu Pseudomonas, Acinetobacter, Rhizobium, Agrobacterium nebo Escherichia. Výhodně se jako hostitelské kmeny používají E.coli DH1, Pseudomonas putida Pp81 nebo Pseudomonas putida GP012.

f) Transformace

Transformace hostitelských buněk hybridními plasmidy, čímž vznikají produkční kmeny podle vynálezu, je rovněž známá a popsána ve výše uvedené učebnici.

g) Produkční kmeny

Jako produkční kmeny mohou sloužit všechny hostitelské kmeny, které jsou transformovány hybridními plasmidy, které obsahují genový štěp alkBFGH. Přirozená regulace alk-operonu může být

ponechána nebo odstraněna. Jako produkční kmeny zvláště slouží *E.coli* DH1, transformované hybridním plasmidem pGEc41 (CBS 102-87 nebo DSM 6726), *Pseudomonas putida* Pp81 (DSM 6776) nebo *Pseudomonas putida* GP012 (DSM 6775), oba transformované hybridním plasmidem pGMK921, nebo účinné mutanty těchto kmenů. V těchto produkčních kmenech je ponechána přirozená regulace *alk*-operonu (*alkR* = *alkST*).

Selekce transformovaných mikroorganismů (produkčních kmenů)

Izolace (selekce) transformovaných hostitelských buněk se uskutečňuje s výhodou ze selektivního živného media, kterému se přidá biocid, vůči kterému propůjčuje resistenci značený gen obsažený v hybridním plasmidu. Jestliže hybridní plasmid pGEc41 výhodně obsahuje gen pro tetracyklinovou resistenci, přidá se k živnému mediu tetracyklin. V případě hybridního plasmidu pGMK921, který obsahuje gen pro streptomycinovou resistenci, přidá se k živnému mediu streptomycin. Růst buněk, které tento hybridní plasmid neobsahují, je v takovémto mediu brzděn.

Způsob fermentace

Podle vynálezu lze použít jako produkční kmeny všechny ty, které jsou transformované hybridním plasmidem, který obsahuje štěp genu *alkBFGH*. Jako příklad lze uvést mikroorganismy rodu *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* nebo *Escherichia*.

Fermentační postup je objasněn v následujícím textu na produkčním kmenu *E.coli* DH1, který je transformovaný hybridním plasmidem pGEc41.

Jako substráty reakce mohou sloužit ethylované aromatické pětičlenné nebo šestičlenné heterocykly, které obsahují jeden nebo více heteroatomů vybraných ze skupiny tvořené kyslíkem, dusíkem, sírou. Jako aromatické pětičlenné heterocykly mohou například sloužit ethylderiváty thiofenu, furanu, pyrrolu, thiazolu, pyrazolu nebo imidazolu. Vhodné aromatické šestičlenné heterocykly jsou například ethylderiváty pyridinu, pyrimidinu, pyrazinu nebo pyridazinu. Obzvláště vhodné jsou jako aromatické ethylované šestičlenné heterocykly deriváty z třídy sloučenin pyrazinu nebo pyridinu.

U *E.coli* DH1 obsahující pGEc41 v úloze produkčního kmenu lze indukovat enzymy alk-operonu, které jsou odpovědné za hydroxylaci, pomocí sloučenin, které popisuje Grund a spol., *J. Bacteriol.*, 123, str. 546-556, 1975. K tomu patří sloučeniny, které slouží například pro *Pseudomonas oleovorans* jako zdroj uhlíku a energie, jako například alkany, alkanoly nebo alkylované cyklické sloučeniny. Jako alkany lze například použít oktan, dodekan nebo hexan. Jako alkanoly lze například použít oktanol, dodekanol nebo hexanol. Jako zástupce alkylovaných cyklických sloučenin lze použít například ethylbenzen.

Sloučeniny, které například neslouží jako zdroj uhlíku a energie pro *Pseudomonas oleovorans*, které však přesto indukují geny alk-operonu, jsou například dicyklopropylketon, dicyklopropylmethanol nebo diethoxyethan. U *E.coli* DH1 obsahujícím pGEc41 se indukce enzymů výhodně provádí pomocí dicyklopropylketonu.

Reakce substrátu může probíhat buď za přítomnosti enzymového induktoru nebo i v jeho nepřítomnosti.

Pro růst jmenovaných produkčních kmenů lze použít všechny v oboru běžné zdroje uhlíku a energie, jako například sukcinát sodný.

Ke stabilizaci plasmidu pGEc41 se účelně před reakcí substrátu (při napěstování buněk) přidá ke kultivačnímu mediu tetracyklin.

Jako kultivační media slouží media běžná v oboru, jako například komplexní medium (živné medium "Nutrient Broth No.2", Oxoid Ltd., Velká Británie) nebo medium obsahující minerální soli, jako je například popsáno v Kulla a spol., *Arch.Microbiol.*, 135, 1983, str. 1-7.

Před přidáním substrátu se buňky pěstují obvyklým způsobem a pak se účelně uskuteční reakce substrátu při hodnotě optické hustoty od 1 do 200 při 650 nm v kultivačním mediu, výhodně při hodnotě optické hustoty od 5 do 100 při 650 nm.

Reakce probíhá buď při jednorázovém nebo při kontinuálním přidání substrátu tak, aby koncentrace substrátu v kultivačním mediu nepřesáhla 20 % hmotnosti/objem. Výhodně se přidává substrát tak, aby koncentrace substrátu nepřesáhla 5 % hmotnosti/objem, zvláště výhodně koncentrace nepřesáhne 1 % hmotnosti/objem.

Reakce se účelně provádí v rozmezí pH od 4 do 11, výhodně od 6 do 10.

Obvykle se reakce provádí při teplotě od 15 do 50 °C, výhodně při teplotě od 25 do 40 °C.

Reakce se účelně provádí po dobu 1 hodiny až několik dní, výhodně se provádí kontinuálně po několik dní. Po skončení reakce se odpovídající 2-hydroxyethylderiváty mohou izolovat známým způsobem, například extrakcí.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

E. coli DH1 (pGEc41), CBS 102-87 se pěstuje v mediu obsahujícím minerální soli (Kulla a spol., Arch. Microbiol. 135, 1983, str. 1-7) s 0,6 % hmotnosti/objem štavelanu sodného jako jediného zdroje uhlíku a energie. Ke stabilizaci plasmidu se k mediu přidá 25 mg/l tetracyklinu. Jako enzymový induktor se použije dicyklopropylketon v koncentraci 1 mmol/l.

Ke 100 ml buněčné suspenze o optické hustotě 10 při 650 nm se přidá 1 mmol 5-ethyl-2-methylpyridinu, což odpovídá koncentraci 0,12 % hmotnosti/objem. Buněčná suspenze se inkubuje po dobu dalších 16 hodin při teplotě 30 °C a při hodnotě pH 7. Za těchto podmínek zreagoval 1 mmol (121 mg/100 ml) 5-ethyl-2-methylpyridinu na 0,8 mmol 5-(hydroxyethyl)-2-methyl-pyridinu. To odpovídá 80 % výtěžku, vztaženo na vnesený 5-ethyl-2-methylpyridin.

Obdobně se provádí reakce pomocí *E. coli* DH1 (pGEc41) DSM 6726.

Příklady 2 a 3 se provádějí podle příkladu 1 a jsou souhrnně uvedeny v tabulce 1.

Příklad 4

I) Vytvoření hybridního plasmidu pGMK921 (obr. 2)

Vytvoření pGMK921 je další regulativní vývoj pGEc285 (viz obr.2). pGEc285 popsali M. Kok a spol. v J. Biol.Chem. 264 (1989), str. 5442-5451. Tento plasmid je derivát vektoru pMMB24

"multicopy number broad host range". (Gene 26 (1983), str.273-282) a obsahuje fragment PstI-DNA OCT-plasmidu respektive pGEc41 (J. Biol. Chem. 262 (1987), str. 17712-17718), který kóduje cytoplasmatickou membránovou komponentu alkanhydroxylázy (alkI_B), dva rubretoxiny (alkF, alkG) a aldehyddehydrogenázu (alkH). Transkripce alkBFGH (= alkBA) lze iniciovat jak pomocí alk-promotoru, tak také pomocí tacI-promotoru. Pro genovou expresi přes alk-promotor za přirozené regulace se ligují do pGEc285 alkST-cistrony (=alkR) z OCT-plasmidu, popřípadě z pGEc41.

pGEc41 se štěpí pomocí SalI (4 jednotky na 1 μ g DNA plasmidu) a fragmenty DNA se uvolní pomocí preparativní elektroforézy na agarozovém gelu (0,6 % hmotnosti/objem agarózy v TBE-pufriu (0,09 M Tris-borát, 2,5 mM Na₂EDTA, pH 8,3, ethidiumbromid (100 μ g/100 ml)). SalI-fragment velikosti 2,5 kb, který kóduje alkST, se izoluje přímo z gelu agarózy pomocí membrány z DEAE-celulózy. Nabobtnalá DNA se vymyje z membrány pomocí 0,5 ml elučního pufriu (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM Na₂EDTA, 1,5 M NaCl) během 1 hodiny při 65 °C. Ethidiumbromid se extrahuje ze vzorku DNA pomocí n-butanolu nasyceného vodou a DNA pak precipituje s isopropanolem. Vysušená sraženina tohoto fragmentového preparátu, dále označovaného jako preparát (a), se zředí 0,01 M Tris-HCl pufriu, pH 8,0, 0,001 M Na₂EDTA.

pGEc285 se štěpí pomocí XhoI (4 jednotky na 1 μ g plasmidové DNA) a stejným způsobem se precipituje. Vysušený plasmidový preparát, dále označovaný jako preparát (b), se zředí stejným pufrem.

Oba preparáty, (a) a (b), 0,1-4 μ g DNA ve 20 μ l, se podrobí Klenově reakci podle předpisu uvedeného Maniatisem a spol., Molecular Cloning 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, odst. 5.40-5.43). Klenovův pufir má složení: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 50 μ g/ml hovězího serumalbuminu.

K reakční směsi se přidá 1 μ l 0,5 mM každého dNTP (desoxy-nukleotidtrifosfát). Po přidání 1-5 jednotek Klenovy polymerázy se směs inkubuje při 30 °C po dobu 15 min. Pak se reakce přeruší na 10 min zahřátím na 75 °C.

Pro ligaci se preparáty (a) a (b) s "tupými konci" (to jsou

hladké konce DNA bez přečnávajících jednotlivých vláken) precipitují s isopropanolem a zředí se ve 100 μ l ligačního pufru (20 mM Tris-HCl, pH 7.2, 10 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 0.6 mM ATP). Ligace se uskuteční po přidání T4-DNA-ligázy (1 jednotka/ μ g DNA) přes noc při 15 °C.

Transformace se uskutečnila v *E. coli* za selekce v komplexním mediu s 30 mg streptomycinu na liter živného agaru (Nutrientagar). Jedná se o elektrotransformaci podle Maniatise a spol., Molecular cloning 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, odst. 1.75. Plasmid je označen jako pGMK920 a nepřinesl hostitelskému kmeni žádnou schopnost hydroxylace alkylových skupin. Teprve transformace v *E. coli* (mutD, propagace (spouštění pGMK920) v "pozadí mutátoru") a následující konjugativní transfer (s pomocným plasmidem pRK2013) v *Pseudomonas putida*, (*Ps. putida*) PpS81 vede k fenotypu alk⁺ kmene příjemce, který nese plasmid a je schopný hydroxylovat alkylové skupiny.

Ke konjugativnímu transferu se *E. coli* elektrotransformuje s alk-hybridním plasmidem, dodatečně s pomocným plasmidem pRK2013 podle výše citovaného Maniatise a spol. Selekcce se uskuteční na komplexním mediu (Nutrientagar) se streptomycinem 30 mg/l (hybridní plasmid) a kanamycinem 25 mg/l (pomocný plasmid).

Každý 1 ml této kultury dárce a kultury příjemce (*Ps. putida* PpS81) se několikrát promyje živným roztokem (Nutrient Broth), zředí pokaždé 50 μ l živného roztoku, spojí se a inkubují se přes noc při 30 °C na suchém živném agaru (Nutrientagar). Buňky se suspendují v 0.9 % roztoku chloridu sodného a vhodná zředění (10^{-7} - 10^9 buněk/ml suspenze) se umístí na desky selekčního media (150 mg streptomycinu na litr). Plasmid poskytující fenotyp alk⁺ je označen jako pGMK921.

II) Biotransformace

Produkční kmen *Ps. putida* PpS81 obsahující pGMK921 je obzvláště vhodný z důvodu alcA mutace hostitele, neboť alkanhydroxylázová aktivita vzniká před pozadím zcela bez alkohodehydrogenázy. *Ps. putida* PpS81 s pGMK921 se pěstuje na mediu obsahujícím minerální soli (Arch. Microbiol. 135 (1983), str. 1-7) s 0.2 % (hmotnost/objem) glukózou. Pro stabilizaci plasmidu se přidává streptomycin (150 mg/l). Pro indukci přirozeného promotoru pro

expresi alkanmonooxygenázy se přidává 1 mM dicyklopropylketonu.

Při hodnotě optické hustoty $OD_{650nm} = 10$ (kultury s nižší hodnotou OD se zahustí na $OD = 10$) se ke kultuře přidá 0.1 % (objem/objem) 5-ethyl-2-methylpyrimidinu. Při teplotě 30 °C a při neutrální hodnotě pH (7.0) tento substrát po 6 hodinách úplně zreagoval na 5-(2-hydroxyethyl)-2-methylpyrimidin.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1

pGEc41 se skládá z vektoru pLAFR1 (Gene 16 (1986), str. 289-296) a fragmentu EcoRI o velikosti 30 kb z DNA OCT-plasmidu který kóduje část $alkBFGHC^1$ -operonu (delece v $alkC$ -genu) a k tomu nese $alkR$ -locus. Čárkovaně označený fragment označuje deleci v $alkBFGHC^1$ -operonu ve směru proudu.

Rámečky představují velikost a pozici proteinů, čísla se vztahují k molekulární hmotě v kilodaltonech. V pGEc41 je orientace sekvence alk -DNA a sekvence $alkBFGHC^1$ shodná (J. Biol. Chem. 262 (1987), str. 17712-17718).

Obrázek 2

Představuje konstrukční schéma pro přípravu pGMK921.

Obrázek 3

pGMK920 je odvozen od pGEc285 a pGEc41. Směr transkripce $alkBFGH$ je proti směru hodinových ručiček, $alkST$ ($alkR$) cistrony se transkribují ve směru hodinových ručiček. Restrikční mapa pGMK921, který obsahuje alk^+ mutaci, je shodná s pGMK920.

Plasmid kóduje:

- membránovou komponentu alkanhydroxylázy ($alkB$)
- rubredoxin ($alkG$)
- rubredoxin-F ($alkF$)

- aldehyddehydrogenázu (alkH)
- rubredoxinreduktázu (alkS)
- pozitivní regulátor (alkS)

pGMK921 se může konjugativně transferovat z E.coli pomocí pomocného plasmidu (pRK2013) do Pseudomonas.

Selekce: streptomycin 35 mg/l (E.coli)
streptomycin 150 mg/l (Pseudomonas putida)

Tabulka 1

Pří- klad	Substrát	Koncen- trace substrátu na 100 ml	Doba reakce v hod.	Konečný produkt	Výtě- žek v %
2	3-ethylpyridin	1 mmol	16	3-(2-hydroxyethyl)- pyridin	50
3	2-ethylpyrazin	1 mmol	16	2-(2-hydroxyethyl)- pyrazin	80

Průmyslová využitelnost

2-hydroxyethylové deriváty jsou důležité meziprodukty pro výrobu farmaceuticky účinných látek, jako je například 2-(4-pyridyl)ethanol pro výrobu derivátů kyseliny penicilinové.

663-9

č. 012464
05. III. 92
ÚŘAD PRO VYHÁLEŽENÍ A OBJEVY
PŘÍL.

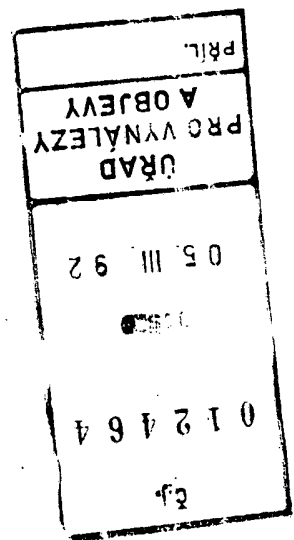
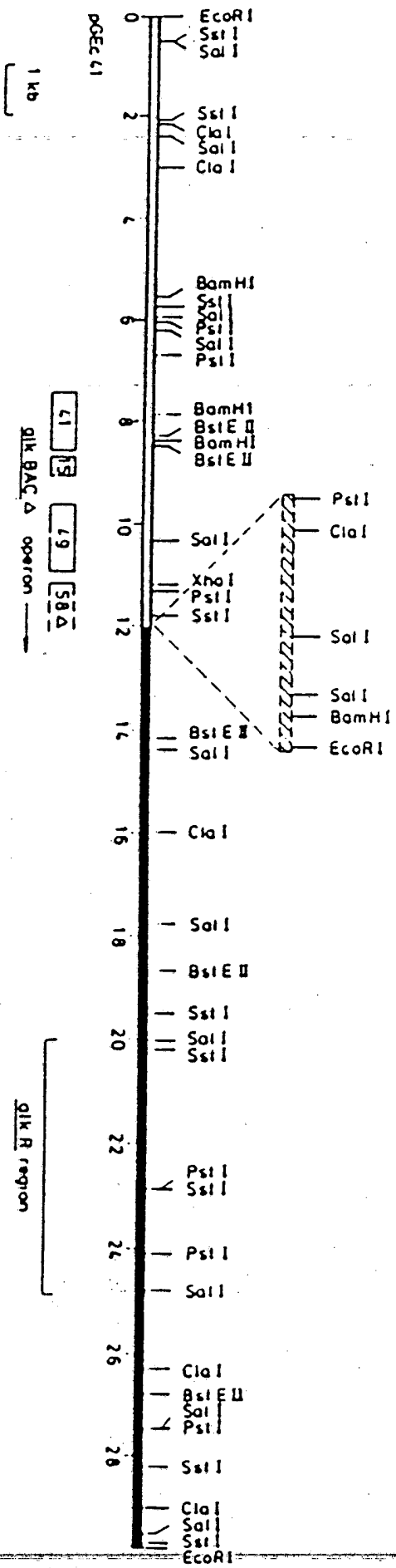
P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Mikrobiologický způsob terminální hydroxylace ethylových skupin aromatických heterocyklů, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se reakce provádí s mikroorganismy, které
a) obsahují geny *Pseudomonas* OCT-plasmidu, které tvoří aktivní alkanmonooxygenázu,
b) netvoří účinnou chromosomálně nebo plasmidově kódovanou alkoholdehydrogenázu a jsou tím schopné hydroxylovat ethylové skupiny aromatických pětičlenných nebo šestičlenných heterocyklů na odpovídající hydroxyethylderiváty, přičemž heterocyklus slouží jako substrát pro reakci a hydroxyethylderivát se dále nemetabolizuje.
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se reakce provádí s mikroorganismy, které obsahují geny *alkBA* z *Pseudomonas* OCT-plasmidu.
3. Způsob podle jednoho z nároků 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se reakce provádí s mikroorganismy, které patří k rodu *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* nebo *Escherichia*.
4. Způsob podle jednoho z nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se reakce provádí buď s *E.coli* DH1, uložené u holandské Centrální sbírky kultur CBS pod č. 102-87, nebo s *E.coli* DH1, uložené u Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur DSM pod č. 6726, oba transformované hybridním plasmidem pGEc41, nebo se reakce provádí s účinnými mutanty těchto kmenů.
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 buď s *Pseudomonas putida* PpS81, uloženého u Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur DSM č. 6776, nebo s *Pseudomonas*

putida GP012, uloženého u DSM č. 6775, oba transformované hybridním plasmidem pGMK921, nebo se reakce provádí s účinnými mutanty těchto kmenů.

6. Způsob podle jednoho z nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í se t í m, že se jako substrát použije ethylovaný aromatický pětičlenný nebo šestičlenný heterocyklus, který obsahuje jeden nebo více heteroatomů vybraných ze skupiny tvořené kyslíkem, dusíkem, sírou.
7. Způsob podle jednoho z nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í se t í m, že se jako substrát použije ethylovaný pyrazin nebo pyridin.
8. Způsob podle jednoho z nároků 1 až 7 v y z n a č u j í c í se t í m, že jsou enzymy mikroorganismů indukovány buď sloučeninami, které mikroorganismu slouží jako zdroj uhlíku a energie, nebo sloučeninami, které mikroorganismu neslouží jako zdroj uhlíku a energie.
9. Způsob podle jednoho z nároků 1 až 8, v y z n a č u j í c í se t í m, že se reakce provádí při jednorázovém nebo kontinuálním přidávání substrátu tak, aby přidání substrátu nepřesáhlo 20 % hmotnosti/objem.
10. Způsob podle jednoho z nároků 1 až 9, v y z n a č u j í c í se t í m, že se reakce provádí při hodnotě pH od 4 do 11.
11. Způsob podle jednoho z nároků 1 až 10, v y z n a č u j í c í se t í m, že se reakce provádí při teplotě od 15 do 50 °C.
12. Hybridní plasmid pGMK921 uvedený na obr. 3, jak je uložený v Pseudomonas putida PpS81, který je uložen u Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur DSM č. 6776, a v Pseudomonas putida GP012, který je uložen u DSM č. 6775.

Obr. 1



č.j.	0 1 2 1 6 4
05. III 92	
URAD PRO VYNALEZY A OBJEVY	
PRIL.	

