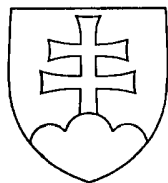


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

1885-92

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12P 17/12,
C 12P 7/40,
C 12P 7/42,
C 12P 7/22
// (C 12P 17/12,
C 12R 1:38,
C 12R 1:025)

- (22) Dátum podania: 19.06.92
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 1843/91-3
(32) Dátum priority: 21.06.91
(33) Krajina priority: CH
(40) Dátum zverejnenia: 08.10.97
(86) Číslo PCT:

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

(72) Pôvodca vynálezu: Kiener Andreas, Dr., Visp (Kanton Wallis), CH;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Spôsob mikrobiologickej výroby kyseliny 5-hydroxypyrazínkarboxylovej**

(57) Anotácia:
Spôsob mikrobiologickej výroby kyseliny 5-hydroxypyrazínkarboxylovej a/alebo jej soli je založený na tom, že sa kyselina pyrazínkarboxylová a/alebo jej soli ako substrát premenia pomocou mikroorganizmov rodu *Pseudomonas* a/alebo *Achromobacter*, ktoré rastú s kyselinou nikotínovou a/alebo jej soľami ako jediným zdrojom uhlíka, dusíka a energie, na kyselinu 5-hydroxypyrazínkarboxylovú a/alebo jej soli, ktoré sa akumuluju v médiu.

Spôsob mikrobiologickej výroby kyseliny 5-hydroxypyrazínkarboxylovej

Oblasť techniky

Vynález sa týka ~~nového~~ spôsobu výroby kyseliny 5-hydroxypyrazínkarboxylovej a/alebo jej solí pomocou mikroorganizmov spracujúcich kyselinu nikotínovú a/alebo jej soli, pričom východiskovou látkou je kyselina pyrazínkarboxylová a/alebo jej soli.

V nasledujúcom texte sa pod pojmi kyselina nikotínová, kyselina pyrazínkarboxylová a kyselina 5-hydroxypyrazínkarboxylová rozumejú tiež ich soli, ako sú napríklad ich alkalické soli alebo amonné soli.

Doterajší stav techniky

Kyselinu 5-hydroxypyrazínkarboxylovú je možné použiť napríklad ako medziprodukt na výrobu farmaceutických prostriedkov, ako napríklad na výrobu pyrazín-nukleozidových analógov s cytostatickým účinkom (M. Bobek, J. Heterocyclic Chem., 1991, 28, str. 1131).

Je známe, že sa kyselina 5-hydroxypyrazínkarboxylová tvorí pri metabolizme u psov a ľudí z pyrazínamidu cez kyselinu pyrazínkarboxylovú (J. Pharmacol. Exp. Ther., 1972, 180(2), 411-434).

Opisuje sa päťstupňový chemický spôsob výroby kyseliny 5-hydroxypyrazínkarboxylovej, pri ktorom sa vychádza napríklad z furfurylglyoxalu (J. Heterocyclic Chem. 19, 1982, str. 402). Nevýhoda tohto postupu však spočíva v tom, že je nevhodný pre priemyselné využitie.

Mikrobiologický spôsob výroby kyseliny 5-hydroxypyrazínkarboxylovej nie je až dosiaľ známy.

Podstata vynálezu

Úlohou predloženého vynálezu je dať k použitiu jednoduchý, hospodárny a ekologický spôsob výroby kyseliny 5-hydroxypyrazínkarboxylovej.

Úloha bola vyriešená novým spôsobom podľa patentového nároku 1.

Podľa vynálezu sa kyselina pyrazínkarboxylová ako substrát premení pomocou mikroorganizmov, ktoré rastú s kyselinou nikotínovou ako jediným zdrojom uhlíka, dusíka a energie, na kyselinu 5-hydroxypyrazínkarboxylovú. Táto kyselina sa akumuluje v médiu.

Pre tento postup sú vhodné v podstate všetky mikroorganizmy, ktoré odbu-
rávajú kyselinu nikotínovú cez kyselinu 6-hydroxynikotínovú. Tieto mikroorganizmy
je možné izolovať obvyklými mikrobiologickými postupmi napríklad z čistiacich
zariadení pomocou kyseliny nikotínovej ako rastového substrátu. Napríklad je
možné použiť také mikroorganizmy rodu Pseudomonas, Achromobacter, Bacillus,
Azorhizobium, Sarcina a Mycobacterium, ktoré sú už popísané v EP-A 152 948.
Reakciu je možné uskutočniť ako so zmesami, tak aj s čistými izolátmi týchto
mikroorganizmov, sterilne alebo nesterilne.

Postup sa uskutočňuje účelne s mikroorganizmami druhu

Pseudomonas acidovorans DSM 4746

Achromobacter xylosoxydans DSM 2402

Achromobacter xylosoxydans DSM 2783

Pseudomonas putida NCIB 10521

Pseudomonas putida NCIB 8176

ako i s ich descendentami a mutantami, výhodne s Pseudomonas acidovorans
DSM 4746.

Mikroorganizmy druhu Pseudomonas acidovorans DSM 4746 boli uložené
25. júla 1988 do Nemeckej zbierky mikroorganizmov a bunkových kultúr s. r. o.
(DSM), Mascheroderweg 1b, D-3300 Braunschweig.

Mikroorganizmy druhu Achromobacter xylosoxydans DSM 2402 a DSM
2783 sú tiež uložené u vyššie menovanej inštitúcie a sú už popísané v EP-A 152
948.

Mikroorganizmy druhu Pseudomonas putida NCIB 10521 a NCIB 8176 sú
uložené v Národnej zbierke priemyselných baktérií, Torry Research Station, 135
Abbey Road, Aberdeen AB98DC, Scotland.

Zvyčajne sa pred vlastnou reakciou uskutočňuje ako kultivácia tak aj
indukcia ^{enzymát} mikroorganizmov pomocou kyseliny nikotínovej. Výhodne sa kultivácia a
indukcia uskutočňujú pomocou kyseliny nikotínovej ako jediného zdroja uhlíka,
dusíka a energie.

Pred pridaním substrátu kyseliny pyrazínkarboxylovej môžu sa mikro-
organizmy získať buď pomocou obvyklých deliacich postupov a resuspendovať v
čerstvom médiu, alebo sa substrát kyselina pyrazínkarboxylová pridáva priamo k
mikroorganizmom v pôvodnom rastovom médiu. Pre vlastný postup sa potom
bunková suspenzia účelne upraví na hodnotu optickej hustoty pri 650 nm od 1 do
100, výhodne od 10 do 30.

Ako médiá sa ako pre kultiváciu, a aj pre vlastnú reakciu používajú médiá
obvyklé v odbore. Výhodne sa používa médium, ktorého zloženie je uvedené v
tabuľke 1. Substrát kyselina pyrazínkarboxylová sa pridáva jednorázovo alebo

kontinuálne. Substrát sa účelne pridáva tak, aby ^{jeho} koncentrácia substrátu nepresiahla 20 % hmotnostných, výhodne 5 % hmotnostných. Zvyčajne sa premena kyseliny pyrazínkarboxylovej a/alebo jej solí na kyselinu 5-hydroxypyrazínkarboxylovú a/alebo jej solí uskutočňuje s bunkami v klúde.

Reakcia sa účelne uskutočňuje za aeróbných podmienok pri hodnote pH od 4 do 10, výhodne pri hodnote pH od 6 do 8. Teplota je účelne medzi 10 a 60 °C, výhodne medzi 15 a 45 °C. Po zvyčajnej dobe reakcie od 4 do 100 hodín sa produkt vyzráža okyslením bezbunkového roztoku a získa sa pomocou v odbore bežne používaných metód spracovania. V prípade sodnej soli kyseliny 5-hydroxypyrazínkarboxylovej sa produkt vyzráža už v priebehu reakcie.

Priklady uskutočnenia vynálezu

Priklad 1

Pseudomonas acidovorans DSM 4746 sa pestuje v médiu obsahujúcom minerálne soli (tabuľka 1) za kontinuálneho pridávania nikotínátu sodného (0,6 g/l/h), vo fermentore pri pH 7,0 a pri teplote 30 °C až ^{do} k optickej hustote 10 pri 650 nm. Potom sa bunky odstredia a resuspendujú v 2 l roztoku, ktorý obsahuje 1 mol (146 g) sodnej soli kyseliny pyrazínkarboxylovej, pH 7,0. Hodnota optickej hustoty pri 650 nm je potom 20. Po 16 hodinovej inkubačnej dobe za aeróbných podmienok pri pH 7,0 a teplote 30 °C sa už ~~nedá dokázať~~ ^{nie dá dokázať} pomocou UV-spektroskopie žiadny edukt. Časť vytvorenej sodnej soli kyseliny 5-hydroxypyrazínkarboxylovej vykryštalizuje už za týchto podmienok pokusu. Vyzrážaný produkt sa odstredí spolu s biomasou. Vytvorený sediment sa potom resuspenduje v 500 ml vody a znovu odstredí. Bezbunkové supernatanty sa spoja a zahustia až na 300 ml pomocou rotačného odparovacieho zariadenia a ochladia na 0 °C. Vytvorené kryštály sa sfiltrujú a vysušia. Celkove sa získa 0,67 mol (108 g) sodnej soli kyseliny 5-hydroxypyrazínkarboxylovej. To zodpovedá výt'ážku 67 %, vzťahované na vnesenú soľ kyseliny pyrazínkarboxylovej.

Priklad 2

Pseudomonas acidovorans DSM 4746 sa pestuje v médiu obsahujúcom minerálne soli (tabuľka 1) za kontinuálneho pridávania nikotínátu sodného (0,6 g/l/h) vo fermentore pri pH 7,0 a pri teplote 30 °C až k optickej hustote 10 pri 650 nm. Potom sa bunky odstredia a resuspendujú v 100 ml roztoku, ktorý obsahuje 0,056 mol (7,9 g) amónnej soli kyseliny pyrazínkarboxylovej, pH 7,0. Hodnota

optickej hustoty pri 650 nm je potom 20. Po 24 hodinovej inkubačnej dobe za aerobných podmienok pri pH 7,0 a teplote 30 °C sa už ~~nedá dokázať~~ pomocou UV-spektroskopie ^{došlo} žiadny edukt. Potom sa bezbunkový supernatant okysaľí koncentrovanou kyselinou sírovou až na pH 2,0, aby sa vyzrážala kyselina 5-hydroxypyrazínkarboxylová. Potom sa suspenzia ochladí na 4 °C a filtruje. Zvyšok po filtrácii sa dvakrát premyje 10 ml vody a vysuší. Celkove sa získa 0,054 mol (7,56 g) kyseliny 5-hydroxypyrazínkarboxylovej. To zodpovedá ^{sa už} výťažku 96 % vztážené na vnesenú amonnú soľ kyseliny pyrazínkarboxylovej. Obsah kyseliny 5-hydroxypyrazínkarboxylovej je pomocou HPLC väčší ako 90 %.

Príklad 3

Achromobacter xylosoxydans DSM 2738 sa pestuje v štyroch 500 ml Erlenmeyerových bankách, obsahujúcich ~~každá~~ 200 ml média s minerálnymi soľami (tabuľka 1), na trepacom zariadení pri teplote 30 °C. Ako zdroj uhlíka a energie sa k médiu pridajú 2 g/l (13,7 mmol na liter) nikotínátu sodného. Po 36 hod. sa biomasu odstredí a jedenkrát sa premyje v rovnakom médiu bez kyseliny nikotínovej. Potom sa bunky resuspendujú v 100 ml rovnakého média, ktoré obsahuje 35,3 g/l (24,2 mmol) sodnej soli kyseliny pyrazínkarboxylovej. Hodnota optickej hustoty ^{kr} bunej suspenzie je 20 pri 650 nm. Po ďalšej 16 hod. inkubácii pri 30 °C na trepacom zariadení sa v bezbunec ^{kr} ^{sa už} supernatante spektrofotometricky nedokáže ~~zistiť~~ kyselina pyrazínkarboxylová. Koncentrácia kyseliny 5-hydroxypyrazínkarboxylovej je 36 g/l (25,7 mmol) pomocou UV-spektroskopie, ^{čo} zodpovedá kvantitatívnemu výťažku, vztiahnuté ^{mu} na vnesenú kyselinu pyrazínkarboxylovú. Pre výpočet koncentrácie kyseliny 5-hydroxypyrazínkarboxylovej sa použije molárny extinkčný koeficient $5 \cdot 603 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pri 308 nm, H₂O, PH 7,0.

Tabuľka 1: Zloženie média obsahujúceho minerálne soli

-	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,8	g/l
-	CaCl ₂	0,16	g/l
-	Na ₂ SO ₄	0,25	g/l
-	KH ₂ PO ₄	0,4	g/l
-	Na ₂ HPO ₄	0,9	g/l
-	SLF	1	ml/l
-	FeEDTA	15	ml/l

Zloženie stopových prvkov (SLF) v médiu obsahujúcom minerálne soli

-	KOH	15	g/l
-	EDTANa ₂ · 2 H ₂ O	100	g/l
-	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	9	g/l
-	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	4	g/l
-	H ₃ BO ₃	2,7	g/l
-	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	1,8	g/l
-	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	1,5	g/l
-	NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0,18	g/l
-	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,2	g/l

Zloženie FeEDTA:

-	EDTA Na ₂ · 2 H ₂ O	5	g/l
-	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	2	g/l

(pH roztoku sa upraví na hodnotu 7,0)

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob mikrobiologickej výroby kyseliny 5-hydroxypyrazínkarboxylovej a/alebo jej solí, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa kyselina pyrazínkarboxylová a/alebo jej soli ako substrát premenia pomocou mikroorganizmov rodov Pseudomonas a/alebo Achromobacter, ktoré rastú s kyselinou nikotínovou a/alebo jej soľami ako jediným zdrojom uhlíka, dusíka a energie, na kyselinu 5-hydroxypyrazínkarboxylovú a/alebo jej soli, ktoré sa akumulujú v médiu.
2. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa premena uskutočňuje s mikroorganizmami rodu Pseudomonas acidovorans DSM 4746 a/alebo s ich spontánnymi mutantami, ktoré si zachovávajú funkčné schopnosti materského mikroorganizmu.
3. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa premena uskutočňuje s mikroorganizmami druhu Pseudomonas putida NCIB 10521 a/alebo s mikroorganizmami druhu Pseudomonas putida NCIB 8176 a/alebo s ich spontánnymi mutantami, ktoré si zachovávajú funkčné schopnosti materského mikroorganizmu.
4. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa premena uskutočňuje s mikroorganizmami druhu Achromobacter xylosoxydans DSM 2402 a/alebo s mikroorganizmami druhu Achromobacter xylosoxydans DSM 2783 a/alebo s ich spontánnymi mutantami, ktoré si zachovávajú funkčné schopnosti materského mikroorganizmu.
5. Spôsob podľa aspoň jedného z nárokov 1 až 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa premena uskutočňuje pri jednorázovom alebo kontinuálnom pridávaní substrátu, tak aby koncentrácia substrátu nepresiahla 20% hmotnostných.
6. Spôsob podľa aspoň jedného z nárokov 1 až 5, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa premena uskutočňuje za aeróbných podmienok pri hodnote pH od 4 do 10 a pri teplote od 10 do 60 °C.