

433764

13 ENE. 1975

P - 59.479

232463

Case 5561

Memoria descriptiva

para solicitar PATENTE DE INVENCION

à nombre de PFIZER INC.

entidad norteamericana

Int. Cl.:

C12D

con domicilio en 235 East 42nd Street, Nueva York,
Nueva York, Estados Unidos de América.

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR L-FENILALANINA"
(Clase Internacional C07c)

La L-fenilalanina es un aminoácido esencial importante. Comercialmente, se aísla de proteínas como la ovoalbúmina, la lactoalbúmina, la zeína y la fibrina. La DL-fenilalanina puede sintetizarse de la azolactona o del ácido alfa-benzoilaminocinámico o del ácido alfa-acetaminocinámico, como se reporta en Org. Syn. 2, 489 (1943) o del ácido alfa-bromo-beta-fenilpropiónico, como se describe en Ber. 37, 3064 (1904).

La patente estadounidense 2.973.304 describe un procedimiento de fermentación que utiliza un mutante auxotrófico de la Escherichia coli, que requiere de L-tirosina para su desarrollo, y que acumula cantidades considerables de L-fenilalanina cuando se cultiva en ciertos medios nutritivos.

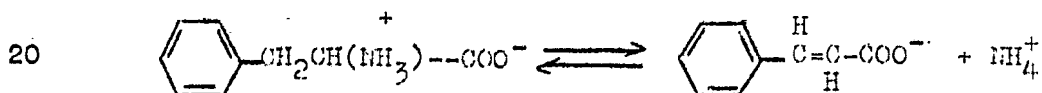
El presente invento se refiere a un procedimiento para producir L-fenilalanina, el cual consiste en propagar aerobicamente un microorganismo productor de amoníacoliase de fenilalanina en un medio nutriente acuoso, hasta que se obtienen cantidades considerables de amoníacoliase de fenilalanina; poner en contacto todo el caldo de cultivo, o células separadas de éste, o la enzima aislada, con un exceso de iones de amonio, a una temperatura de 30-40°C. y a un pH de 8 a 10,5, hasta obtener cantidades considerables de L-fenilalanina. La L-fenilalanina puede separarse y recuperarse en esa naturaleza o como su clorhidrato de

éster metílico.

Una cantidad considerable de información hay disponible por lo que se refiere al amoníaco-liasa de fenilalanina que se encuentra en plantas: Phytochem. 7, 441 (1968); Pflanzphysiol. 56, 203 (1967); Plant Physiol. 40, 779 (1965); Planta 75, 207 (1967); J. Biochem. 57, 678 (1965); Phytochem. 5, 1121 (1966).

Se ha comunicado la producción de amoníaco-liasa de fenilalanina por varios microorganismos, en particular, por una variedad de la especie de los Rhodotorula, como se describe en Ferment. Technol. 49, No. 3, 222-229 (1971) y del Sporobolomyces roseus en Phytochemistry 8, 1407-1413 (1969).

Estos reportes detallan estudios practicados sobre la función catalítica del amoníaco-liasa de fenilalanina en la conversión de éste en ácido trans-cinámico, como sigue:



La patente japonesa 7.324.748 describe un procedimiento para cultivar un microorganismo del género Trichosporon productos de amoníaco-liasa de L-fenilalanina, y para

utilizar el amoniaco-liasa de fenilalanina con el fin de desaminar la fenilalanina en la alimentación que se da a niños que padecen fenilcetonuria.

5 Los efectos del amoniaco-liasa de fenilalanina y de la privación de fenilalanina en linfoblastos leucémicos de murina, in vitro, se reporta en Cancer Research 33 966-971 (1973).

10 Así pues, todos los reportes actuales sobre la actividad del amoniaco-liasa de fenilalanina se han limitado a su función en la desaminación de la fenilalanina. Ni en patentes ni en la bibliografía aparecen reportes sobre la utilización del amoniaco-liasa de fenilalanina para producir L-fenilalanina mediante la conversión enzimática del ácido trans-cinámico, en presencia de iones de amonio.

15 El presente invento suministra un método económico y práctico para producir L-fenilalanina utilizando el amoniaco-liasa de fenilalanina producido por microbios.

20 La fermentación consiste esencialmente en un procedimiento de tres etapas: a) preparación del inóculo, b) producción del amoniaco-liasa de fenilalanina y c) conversión del ácido trans-cinámico en L-fenilalanina, en presencia de iones de amonio.

25 Debe entenderse que todos los microorganismos producidos de amoniaco-liasa de fenilalanina son adecuados al procedimiento del presente invento. Los organismos representen

tativos son los siguientes:

	<u>Cultivo</u>	<u>Número de Depósito Público</u> *
	<u>Rhodotorula rubra</u>	IFO 0001
		IFO 0696
5		IFO 0709
		IFO 0870
		IFO 0889
		IFO 0892
		IFO 0900
10		IFO 0911
		IFO 1100
		IFO 1101
		OMI 38784
	<u>Rhodotorula gracilis</u>	IFO 0389
15		IFO 0413
		IFO 0415
		IFO 0559
		IFO 0688
		IFO 0871
20		NRRL Y1091
	<u>Rhodotorula texensis</u>	IFO 0387
		IFO 0920
		IFO 0932
		IFO 1102
25	<u>Rhodotorula marina</u>	IFO 0879

<u>Cultivo</u>	<u>Número de Depósito Público</u>
<u>Rhodotorula minuta</u>	NRRL Y1589
<u>Fusarium oxisporum</u>	ATCC 20395

* IFO - Institute for Fermentation, Osaaka, Japón.

5 ATCC = American Type Culture Collection, Rockvile, Md.
E.U.A.

NRRL = Northern Regional Research Laboratories, Peoria,
Illinois, E.U.A.

10 CMI = Commonwealth Microbiological Institute, Kew, Surrey,
Inglaterra.

15 El medio de inóculo para que se desarrollen las
células del microorganismo productos del amoniaco-liasa
de la fenilalanina no constituye un factor crítico, y pue-
de seleccionarse de entre una variedad de medios adecuados
para el crecimiento del organismo. Un medio preferido con-
tiene un digesto enzimático de caseína (N-Z-Amine B, de la
Sheffield Chemical Co., de Norwich, N.Y., E.U.A.), un auto
20 lisado de levadura soluble en agua (Amber BYF-300, de Amber
Laboratories, de Juneau, Wisconsin, E.U.A.), lactosa y li-
cor de maíz macerado. El medio de inóculo (800 ml contenidos
en un matraz Fernbach de 5 litros) se ajusta a un pH de 6,8,
se esteriliza y se inocular con células que se desarrollan
25 a 24°C, sobre una placa inclinada de agar nutriente, de pre-
ferencia, un agar de extracto de levadura de Pridham. El me

dio se sacude en un vibrador giratorio durante 24 horas, aproximadamente, a 24°C.

5 Aproximadamente una parte alícuota de 10% v/v de este cultivo de inóculo se incorpora a un medio de fermentación esterilizado, contenido en un fermentador agitado, para producir el amoniaco-liasa de fenilalanina.

10 El medio de fermentación para producir amoniaco-liasa de fenilalanina no se limita de un modo riguroso. Buenos niveles de amoniaco-liasa de fenilalanina se obtienen en un medio de extracto de malta, o en otros medios de cultivo normales que contienen una fuente de nitrógeno asimilable, una fuente de carbono asimilable y sales minerales. Un medio preferido contiene KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, glucosa, extracto de levadura, urea, N-Z-Amina B y, si es necesario, un agente antiespumante (Pluronic L-61, de la Wyandotte Chemical Co., de Wyandotte, Michigan, E.U.A.).
15 El pH se ajusta a 6,8-7,0 antes de la esterilización.

20 De preferencia, una pequeña cantidad de fenilalanina o de tirosina se incorpora al medio, para que actúe como inductor de la enzima, y para proteger ésta en presencia de los iones de cinamato que se agregan.

25 El desarrollo y la producción del amoniaco-liasa de fenilalanina pueden obtenerse en una escala de temperaturas de 20 a 40°C., siendo la temperatura óptima la de alrededor de 24°C. La aereación se depara a un volumen de

aire por volumen del medio por minuto, y el caldo se agita con un agitador mecánico a alrededor de 1620 revoluciones por minuto. La producción del amoniaco-liasa de fenilalanina se comprueba mediante un experimento enzimático, y la fermentación se desarrolla hasta que se obtienen niveles considerables de enzima (de 3 a 4 unidades por ml). En general, el tiempo de fermentación es de 24 horas, aproximadamente.

En la etapa final o de conversión, el ácido trans-cínámico y los iones de amonio se incorporan al caldo de cultivo que contiene amoniaco-liasa de fenilalanina, o a las células separadas de éste o a la enzima aislada. Los iones de amonio pueden suministrarse de cualquier fuente conveniente, por ejemplo, la sal de amonio de un ácido orgánico, la sal de amonio de un ácido mineral o hidróxido de amonio. La fuente de amonio que se prefiere es una mezcla de cloruro de amonio e hidróxido de amonio.

Unos métodos para preparar el amoniaco-liasa de fenilalanina purificado, a partir de varias fuentes, se describen en: J. Biochem. 57, 678 (1965), Agr. Biol.Chem. 31, 600 (1967), Biochemistry 7, 1915 (1968), J. Biol.Chem. 236, 2692 (1961), Phytochem. 1, 1 (1961), Can. J. Biochem. 45, 1863 (1967) y Phytochem. 5, 1121 (1966). La enzima cruda puede elaborarse triturando las células microbianas separadas con alúmina pulverizada, y extrayecto con un tamponador

tris 0,05 M, a un pH de 8,0. La mezcla se centrifuga a 10.000 x g por 20 minutos, y el flotante se usa como la enzima cruda (Phytochemistry 8, 1407-1413 (1969)).

5 Las características críticas del procedimiento del presente invento residen en que se opera a una eficiencia máxima dentro de los parámetros de la reacción de conversión. La reacción normal ácido trans-cinámico \rightleftharpoons L-phenilalanina representa un equilibrio de 80:20 en favor del ácido trans-cinámico. La estabilidad del amoníaco-liasa de fenilalanina es afectada perjudicialmente al aumentar 10 las concentraciones del ácido trans-cinámico. A una baja concentración de ácido trans-cinámico, aproximadamente de 0,1% p/v, puede obtenerse la conversión teórica al 20% de la L-fenilalanina. Al nivel práctico de producción de 5 a 15 10% p/v de ácido cinámico, puede obtenerse un rendimiento de fenilalanina de alrededor del 20%, empleando una gran masa de células microbianas colectadas y un exceso de iones de amonio, habiendo una proporción molar, entre los iones de amonio y los iones de trans-cinamato, de 2:1, cuando 20 menos y, de preferencia, de 8:1. Estas proporciones y concentraciones se mantienen independiente de la cantidad de amoníaco-liasa de fenilalanina que haya presente. El ácido trans-cinámico que no ha reaccionado puede recuperarse y reciclar a través del procedimiento.

25 La conversión del ácido trans-cinámico en L-fe-

nilalanina se efectúa a un pH de 8-10,5 y, de preferencia, de 8,5-9,7, y a una temperatura comprendida entre 30° y 40°C y, de preferencia, entre 35 y 37°C. El tiempo de conversión común es de alrededor de 24 horas.

5 La L-fenilalanina puede aislarse, mediante precipitación, como el aminoácido libre, en su punto isoeléctrico de un pH de 5,5, o por procedimientos normales como son los métodos de intercambio de iones. Por ejemplo, la L-fenilalanina puede recuperarse ajustando el pH del medio a
10 alrededor de 2 con ácido clorhídrico, filtrando y pasando el filtrado a través de una resina concentrada de intercambio catiónico. La L-fenilalanina se eluye con hidróxido de amonio diluido, el eluato se libera del amoniaco mediante calentamiento y la L-fenilalanina se obtiene evaporando el
15 eluato. El aminoácido puede purificarse ulteriormente por métodos normales de recristalización.

De manera conveniente y eficaz, la L-fenilalanina se separa y recupera de la mezcla de reacción enzimática en forma de un clorhidrato de éster, de preferencia, el
20 clorhidrato del éster metílico. El medio de reacción clarificado se ajusta a un pH de 2 con ácido clorhídrico. El ácido trans-cinámico no convertido que ha precipitado se separa por filtración o centrifugación y el filtrado se lava con éter para separar el ácido cinámico residual. El filtrado
25 clarificado se ajusta a un pH de 3 con hidróxido de sodio,

se concentra hasta la desecación y el agua residual se se para por destilación azeotrópica con benceno. El benceno se separa y se substituye con metanol. La solución resul tante se enfría, se incorpora gas HCl y la mezcla se agi ta a temperatura ambiente hasta que se completa la esteri ficación (de 2 a 5 horas). Alternativamente, pueden usarse el SOCl_2 o el POCl_3 (1,2 moles por mol de fenilalanina), a temperatura de reflujo, en lugar del HCl. La mezcla se en fría y los insolubles se separan por filtración o centrfu gación. La solución metanólica se concentra hasta la deseca ción y el sólido se disuelve en acetonitrilo caliente. El material insoluble se separa y en la solución clara crista liza el clorhidrato del éster metílico de L-fenilalanina.

Gran parte de la eficiencia del procedimiento del presente invento se obtiene aplicando y desarrollando méto dos analíticos correctos, especialmente, empleando un méto do experimental para determinar la fenilalanina en muestras de fermentación, en las cuales hay una interferencia mínima por la presencia del ácido trans-cinámico que se incorpora.

20 Métodos Analíticos

Acido Cinámico Residual

Cromatogramas en capa delgada sobre gel de síli ce, revelados con benceno, metanol y ácido acético glacial (45:8:4); el ácido cinámico se ubica en 2600 mu mediante luz ultravioleta.

Amoníaco-liasa de Fenilalanina

Agr. Biol. Chem. 31, No. 2, 200-206 (1967).

Fenilalanina

a) Cromatografía en Capa Delgada

5 Cromatogramas en gel de sílica revelados con acetato de etilo, piridina, ácido acético glacial y agua (5:5:1:3), rociados con ninhidrina y calentados a 38°C., hasta que se produce un color púrpura.

b) Determinación Fluorométrica Automatizada

10 Modificación del método de McCaman y Robins, J. Lab. Clin. Med. 59, 885 (1962).

Los ejemplos siguientes son meramente ilustrativos y no tratan de limitar el invento, cuyo alcance se de limita en las cláusulas anexas.

15 EJEMPLO I

A. Preparación del Inóculo

	<u>Gramos por Litro</u>
N-Z-Amine B	5,0
Amber BYF-300	1,0
20 Lactosa	5,0
Licor de maíz macerado	2,0

25 El medio se ajusta a un pH aproximado de 6,8, se introduce en porciones de 800 ml en matraces Fernbach de 5 litros de capacidad, se esteriliza por autoclave, se enfría y se inocular con células de Rhodotorula rubra CMI

38784 (Pfizer F.D. 14397), que han crecido en placas inclinadas de agar con extracto de levadura Pridham. Los matra- ces se sacuden durante 24 horas en un vibrador giratorio, a una temperatura de alrededor de 24°C.

5 B. Preparación del Amoníaco-liasa de Fenilalanina

	<u>Gramos por Litro</u>
Glucosa	2,0
N-Z-Amine B	0,5
Urea	0,5
10 Extracto de levadura	0,2
Fenilalanina o tirosina	0,5
KH_2PO_4	1,0
K_2HPO_4	2,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
15 Antiespumante (Pluronic L-61)	0,25 ml.

El medio, contenido en un fermentador agitado, se ajusta a pH de 6,8-7,0, se esteriliza, se enfría y se inocula con 10% v/v del inóculo, como se describe antes. La fermentación se desarrolla durante 24 horas, aproximada-
 20 mente, sin controlar el pH. Durante este tiempo, se introduce aire a un volumen por volumen del medio por minuto, y se agita a 1620 revoluciones por minuto.

C. Conversión del Acido Trans-Cinámico en L-Fenilalanina

25 50 gramos del ácido trans-cinámico y 150 gramos de cloruro de amonio se incorporan por litro del caldo de

cultivo integral, y el pH se ajusta a alrededor de 9,7 con hidróxido de amonio. La proporción entre los iones de amonio y los iones de cinamato es de 8:1. La fermentación se desarrolla durante 24 horas a una temperatura de 35-37°C.
5 El caldo dio 2,48 gramos de L-fenilalanina por litro.

EJEMPLO II

Se repite el método del Ejemplo I con Rhodotorula gracilis NRRL Y1091 (Pfizer F.D. 6521) para dar una concentración final de L-fenilalanina de 2,48 gramos por litro.

10

EJEMPLO III

Se repite el método del Ejemplo I con Rhodotorula minuta NRRL Y1589 (Pfizer F.D. 101), con resultados comparables, a una concentración de ácido cinámico de 10% p/v y a una concentración molar de iones de amonio, con respecto a los iones de cinamato, de 2:1, y en condiciones de conversión de 30°C. y un pH de 8,0.

15

EJEMPLO IV

Se repite el método del Ejemplo I, con resultados comparables, con el Fusarium oxysporum ATCC 20395 (Pfizer F.D. 5242), a una temperatura de conversión de 40°C. y un pH de 10,5.

20

EJEMPLO V

A una solución de 30 g de ácido trans-cinámico, 8,56 g de cloruro de amonio, 44 ml de hidróxido de amonio concentrado y 600 mg de L-fenilalanina (que se incorpora

25

para el amoníaco-liasa de fenilalanina contra la desacti-
vación del ácido cinámico, en 600 ml de agua, se agregan
40 g de células colectadas de Rhodotorula gracilis NRRL
Y1091, separadas por centrifugación o filtración del caldo
5 de cultivo que se prepara como se describe en la Etapa B
del Ejemplo I. La suspensión resultante se ajusta a un pH
de 9,5 y se sacude a 37°C. durante 20 horas, dando lugar a
520 mg (conversión del 2%) de L-fenilalanina. La mezcla de
reacción se calienta a 70°C. y el material coagulado se se-
10 para por centrifugación. En seguida, el flotante se mezcla
con 10 g de bentonina (silicato de aluminio hidratada), se
recalienta a 70°C. y se filtra a través de una almohadilla
de supercel. La solución clara se enfría y se ajusta a un
pH de 2 con HCl. El ácido trans-cinámico que precipita se
15 colecta por filtración y el filtrado se lava con éter di-
etilico para separar el ácido cinámico residual. El filtra-
do clarificado se ajusta a un pH de 3 con NaOH, se concen-
tra hasta la desecación y el agua residual se separa por
destilación azeotrópica con benceno. El benceno se separa
20 por evaporación y se substituye con metanol. La solución
resultante se enfría y se satura con gas HCl. La mezcla se
agita a temperatura ambiente hasta que se completa la este-
rificación (2 a 5 horas). La mezcla se enfría y los insolu-
bles se separan por filtración. La solución metanólica se
25 concentra casi hasta la desecación y el sólido se disuelve

en acetonitrilo caliente. La cristalización en reposo produce 0,91 gramos (77% de rendimiento por aislamiento) del clorhidrato del éster metílico de la L-fenilalanina.

EJEMPLO VI

5 Se repite el método del Ejemplo V, con resultados comparables, con amoniaco-liasa de fenilalanina que se extrae de las células colectadas de Rhodotorula gracilis NRRL Y1091, triturando con alúmina pulverizada, extrayendo con un tamponador tris 0,05 M, a un pH de 8,0, centrifugando a 10.000 x g durante 20 minutos y empleando el flotante como enzima cruda. La L-fenilalanina puede separarse y recuperarse mezclando con bentonita, calentando y filtrado para separar la proteína coagulada. La solución clarificada se enfría y se ajusta a un pH de 2 con HCl. El ácido cinámico que precipita se separa por filtración y el filtrado se lava con éter para separar el ácido cinámico residual. La solución clarificada se concentra y se ajusta para que precipite la L-fenilalanina en su punto isoeléctrico.

10

15

20 Esta solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 22 de Febrero de 1.974, bajo el N° 444.763, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

REIVINDICACIONES

5 Los puntos de invención propia y nueva que se pre
sentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de
Invención en España, son los que se recogen en las reivindi
caciones siguientes:

10 1ª.- Un procedimiento para preparar L-fenilalani-
na, que se caracteriza por: a) propagar aerobiamente un mi-
croorganismo productor de amoniaco-liasa de fenilalanina, en
un medio nutriente acuoso, hasta que se obtienen cantidades
considerables de amoniaco-liasa de fenilalanina; b) poner
en contacto las células del microorganismo productor de amo
niaco-liasa de fenilalanina de la etapa (a) con iones de
15 amonio y con iones de trans-cinamato, en una proporción mo
lar de 2:1, cuando menos, en una mezcla de reacción, siendo
la concentración de los iones de cinamato de 0,5 a 10% p/v,
con respecto a la mezcla de reacción, dejando que la reac-
ción prosiga a una temperatura de 30 a 40°C. y a un pH de
20 8,0 a 10,5, hasta que materialmente concluye la conversión
a la L-fenilalanina y c) separar y recuperar la L-fenilala-
nina de la mezcla de reacción.

25 2ª.- El procedimiento que se describe en la reivin
dicación 1ª, caracterizado por el hecho de que las células
del microorganismo productor de amoniaco-liasa de fenilala

nina se contienen en el caldo de cultivo integral.

5 3ª.- El procedimiento que se describe en la reivindicación 1ª, caracterizado por el hecho de que las células del microorganismo productor de amoniaco-liasa de fenilalanina se separan del caldo integral.

4ª.- El procedimiento que se describe en la reivindicación 3ª, caracterizado por el hecho de que el amoniaco-liasa de fenilalanina se aísla de dichas células.

10 5ª.- El procedimiento que se describe en las reivindicaciones 1ª a 4ª, caracterizado por el hecho de que el microorganismo productor de amoniaco-liasa de fenilalanina es el Rhodotorula gracilis NRRL Y1091, el Rhodotorula rubra CMI 38784, el Rhodotorula minuta NRRL Y1589 o el Fusarium oxysporum ATCC 20395.

15 6ª.- El procedimiento que se describe en las reivindicaciones 1ª a 4ª, caracterizado por el hecho de que la L-fenilalanina se separa y recupera como el clorhidrato del éster metílico.

20 7ª.- Un procedimiento para preparar L-fenilalanina. Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de diez y nueve hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,
P.A.

13 ENE. 1975

Fernando de Elizaburo

Por su poder

