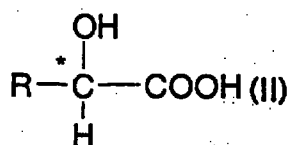
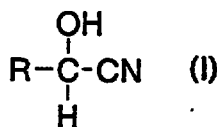


HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES 4-METHYLTHIOBUTYRONITRILE

La présente invention concerne l'utilisation d'une nitrilase comme catalyseur d'hydrolyse d'un groupe nitrile en groupe carboxylique. Elle concerne plus précisément l'utilisation de la nitrilase choisie parmi les nitrilases des micro-organismes du genre *Alcaligenes*, *Rhodococcus* ou *Gordona* et plus précisément d'*Alcaligenes faecalis* déposée sous le
5 numéro ATCC 8750, de *Rhodococcus sp.* HT 29-7 déposée sous le numéro FERM BP-3857 ou de *Gordona terrae* MA-1 déposée sous le numéro FERM BP-4535.

10 La nitrilase d'*Alcaligenes faecalis* est décrite par exemple dans les brevets européens et japonais publiés sous les numéros respectifs EP 348 901 et JP 03 224 496, tous deux appartenant à la société ASAHI. Dans ces brevets, et particulièrement dans le brevet européen, la nitrilase est utilisée pour produire à partir de nitriles racémiques des acides optiquement
15 actifs. Les nitriles préférés de départ sont α substitués et comportent une chaîne alkyle contenant de préférence 1 à 3 atomes de carbone ou un radical aromatique. L'exemple 11 du brevet européen sus mentionné décrit l'hydrolyse du mandélonitrile racémique par *Alcaligenes faecalis*, l'acide mandélique R-(-) est obtenu avec un excès énantiomérique de 91 %. Le
20 brevet européen 486 289 et son équivalent américain le brevet US 5 326 702 de la société NITTO CHEMICAL décrivent l'utilisation d'*Alcaligenes sp* BC35-2 (FERM No 11265 ou FERM-BP-3318) pour hydrolyser le mandélonitrile en présence d'un sulfite, l'acide mandélique est obtenu dans ce cas avec un excès énantiomérique d'environ 98%.

25 Le brevet JP 04 341 185 de la société ASAHI décrit encore la préparation et l'utilisation de la nitrilase d'*Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 pour résoudre les problèmes de préparation de composés optiquement purs à partir de leur nitrile racémique. La nitrilase énantiosélective décrite dans le brevet japonais ci-dessus référencé est capable plus préférentiellement
30 d'hydrolyser les 2-hydroxynitrile de formule générale (I) suivante en acide 2-hydroxycarboxylique de formule (II) suivante :



dans lesquelles R représente un groupe aryle éventuellement substitué ou un groupe hétérocyclique éventuellement substitué. Il est indiqué dans ce brevet
 5 que l'hydrolyse du nitrile de l'acide mandélique par ladite nitrilase permet d'obtenir 100 % d'excès énantiomérique en acide R-(-) mandélique. Il est indiqué dans l'exemple 5 que ladite nitrilase peut être utilisée pour hydrolyser des nitriles aliphatiques comme le valéronitrile, l'acrylonitrile, les
 2-halogénopropionitriles, le chloroacétonitrile. Rien n'est précisé en ce qui
 10 concerne l'énantiosélectivité de cette hydrolyse sur les nitriles aliphatiques ayant un centre d'asymétrie.

Ce texte précise aussi que la nitrilase d'*Alcaligenes faecalis* présente un optimum d'activité à un pH compris entre 6.5 et 8.0, la température de mise en oeuvre de la dite enzyme doit toujours, selon cette référence, être
 15 située en-dessous de 45°C.

Il est apparu de façon tout à fait étonnante que ladite enzyme d'*Alcaligenes faecalis* ATCC 8750, lorsqu'elle était utilisée pour hydrolyser le 4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile, réalisait cette hydrolyse sans aucune
 20 sélectivité du point de vue de la pureté optique. Cette enzyme hydrolyse ledit nitrile en produisant un mélange racémique des deux acides sans aucune prépondérance de l'un ou de l'autre des isomères.

La nitrilase de *Rhodococcus sp.* HT 29-7 déposée sous le numéro FERM BP-3857 est décrite par exemple dans les brevets européen et américain publiés sous les numéros respectifs EP 610 049 et US 5 296 373,
 25 tous deux appartenant à la société NITTO.

Dans ces brevets, et particulièrement dans le brevet américain, la nitrilase est utilisée pour produire à partir de nitriles racémiques porteur d'un groupe phényl des acides optiquement actifs. Les nitriles de départ

comportent tous un radical aromatique, il s'agit essentiellement de l'hydrolyse du mandélonitrile ou de ses dérivés substitués sur le noyau aromatique. L'exemple 1 du brevet américain sus mentionné décrit l'hydrolyse du mandélonitrile racémique par Rhodococcus sp. HT 29-7, l'acide mandélique R-(-) est obtenu avec un excès énantiomérique de 100 %. L'exemple 2 décrit l'hydrolyse des dérivés substitués du mandélonitrile sur le noyau, l'excès énantiomérique en dérivé de l'acide mandélique est aussi de 100 %, il en est de même lorsque l'hydrolyse est réalisée sur les nitriles du benzaldéhyde.

Le brevet européen 610 049 de la société NITTO CHEMICAL décrit l'utilisation de Rhodococcus sp. HT 29-7 (FERM BP-3857), d'Alcaligenes sp. BC35-2 (FERM BP-3318) ou de Brevibacterium acetyllicum IAM 1790 pour hydrolyser des α hydroxy nitriles substitués en position γ par un noyau aromatique en acide α hydroxycarboxylique substitué par un groupe phényle optiquement actif. Les acides obtenus avec Rhodococcus sp. HT 29-7 présentent toujours un excès énantiomériques variable selon le nitrile de départ et selon la présence ou l'absence d'acide phosphorique (pH fixé aux environs de 8,2).

Il est apparu de façon tout à fait étonnante que ladite enzyme de Rhodococcus sp. HT 29-7 (FERM BP-3318), lorsqu'elle était utilisée pour hydrolyser le 4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile, réalisait cette hydrolyse sans aucune sélectivité du point de vue énantiomérique. Cette enzyme hydrolyse ledit nitrile en produisant un mélange racémique des deux acides sans aucune prépondérance de l'un ou de l'autre des isomères.

La nitrilase de Gordona terrae MA-1 déposée sous le numéro FERM BP-4535 est décrite dans le brevet européen 0 610 048 pour hydrolyser des nitriles porteurs en γ d'un groupe phényle et en α d'un groupe hydroxy en acide correspondant optiquement actif. L'excès énantiomérique varie dans tous les exemples entre 92 et 100%.

Il est apparu de façon tout à fait étonnante que ladite enzyme de Gordona terrae MA-1 déposée sous le numéro FERM BP-4535, lorsqu'elle était utilisée pour hydrolyser le 4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile, réalisait cette hydrolyse sans aucune sélectivité du point de vue énantiomérique.

Cette enzyme hydrolyse ledit nitrile en produisant un mélange racémique des deux acides sans aucune prépondérance de l'un ou de l'autre des isomères.

La présente invention concerne donc un procédé de préparation d'acides 4-méthylthio butyrique α substitués racémiques par hydrolyse des
5 4-méthylthio butyronitrile α substitués racémiques par la nitrilase d'un des microorganismes suivants: Alcaligenes faecalis déposé sous le numéro ATCC 8750, Rhodococcus sp. HT 29-7 déposée sous le numéro FERM BP-3857 ou de Gordona terrae MA-1 déposée sous le numéro FERM BP-4535.

10 Selon le procédé de l'invention, le micro-organisme peut être utilisé tel quel ou immobilisé sur des supports bien connus de l'homme de l'art.

Par ailleurs l'information génétique qui code pour l'enzyme peut être transférée du micro-organisme parental (tel que *A. faecalis* ATCC8750...) vers un micro-organisme tel que *Bacillus subtilis*.

15 Une variante du procédé de l'invention consiste à mettre en oeuvre en quantité correspondante, à la place d'un micro-organisme, son enzyme libre ou immobilisée, celle-ci étant totalement ou partiellement purifiée.

On préfère parmi les 4-méthylthio butyronitriles α substitués utiliser le
20 4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile qui permet de préparer l'hydroxyanalogue de la méthionine racémique. Cette technologie de préparation des dérivés de la méthionine permet d'éviter la formation de produits secondaires minéraux en quantités importantes dont les rejets posent de plus en plus de problèmes à cause des contraintes en ce qui concerne la protection de l'environnement.

25 Ces enzymes présentent dans le cadre de la présente invention une activité nitrilase dans une zone de pH comprise entre 4 et 11 et un optimum d'activité à un pH compris entre 5 et 9. Leur température optimale de mise en oeuvre est comprise entre 30 et 60°C, on préfère néanmoins les utiliser entre 30 et 50°C.

30 On préfère travailler avec une concentration en nitrile dans la solution de départ comprise entre 10 mmoles et 400 mmoles par litre et de

préférence entre 50 et 200 mmoles par litre. La concentration en sel d'ammonium de l'acide obtenu a peu d'influence sur l'activité de l'enzyme lorsqu'elle est inférieure à 2 moles par litre et elle est de préférence comprise entre 0,1 et 1,5 mole par litre.

- 5 L'invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples suivants qui ne doivent pas être considérés comme limitatifs de l'invention.

EXEMPLE 1

Le micro-organisme Alcaligenes faecalis ATCC 8750 est cultivé dans le milieu suivant :

5	Acétate d'ammonium	10 g/l
	Extrait de levure	5 g/l
	Peptone	5 g/l
	K ₂ HPO ₄	5 g/l
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g/l
10	FeSO ₄ , 7H ₂ O	30 mg/l
	NaCl	1 g/l
	Benzonitrile	0,5 g/l
	pH 7,2	

La culture est réalisée à 30°C dans des fioles d'Erlenmeyer de 2 litres contenant 600 ml de milieu. Le tout est agité à 150 tours par minute durant 30 heures. Le culot cellulaire est récupéré, lavé avec une solution de NaCl à 9g/l puis congelé.

Conditions opératoires pour l'hydrolyse du butyronitrile :

20	4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile	50 mM
	Cellules	5 mg/ml
	Tampon phosphate	200 mM
	Température	30°C
	Durée	4 heures

L'étude cinétique d'hydrolyse du 4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile montre une production linéaire de 2,8 µmoles d'hydroxy analogue de la méthionine par heure et par mg de cellules sèches. L'excès énantiomérique de l'acide formé a été mesuré par chromatographie liquide, il est égal à 0 % pour un rendement en acide de 80 %.

EXEMPLE 2

On a évalué la stabilité de l'enzyme en suivant la cinétique de production de l'hydroxy analogue de la méthionine pendant 180 heures avec des cellules libres.

Les conditions opératoires sont les suivantes :

	4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile	100 mM
	Cellules	10 mg/ml
	Tampon phosphate 300 mM	5 ml
5	Température	25°C

Le nitrile est ajouté séquentiellement par ajout de 100mmoles de nitrile après épuisement. La formation de l'acide correspondant est indiqué dans le tableau I :

TEMPS	Acide Formé (mmoles/litre)	Activité (μ moles/h. mg de cell. s.)
O	0	0
2 h	39	1,7
17 h	230	1,3
24 h	312	1,7
47 h	466	1,2
70 h	556	0,4
172 h	860	0,6
180 h	940	0,6

10 L'activité initiale est de 2 μ moles/h.mg de cellules sèches. Cet exemple prouve la stabilité de l'enzyme malgré la présence de fortes concentrations en acide (0,9 mole d'hydroxy analogue de la méthionine)

EXEMPLE 3

La stabilité de l'enzyme en fonction de la quantité de substrat et de la quantité d'acide formé a aussi été mesurée dans les conditions suivantes :

15	Stabilité de l'enzyme en fonction de la quantité de substrat	
	Nitrile	cf Tableau résultats
	Cellules	10 mg/ ml
	Tampon phosphate 300 mM pH 7,0	5 ml
	Température	25°C
20	Durée	1 heure

Concentration en nitrile (mM)	Activité (μ moles/ h. mg de cell. s.)
50	2
100	2
150	2
200	2
500	0

Stabilité de l'enzyme en fonction de la quantité d'acide formé

Conditions opératoires:

Nitrile	50 mM
Cellules	2,5 mg/ ml
Tampon phosphate 100 mM pH 7,0	1 ml
Température	30°C
Durée	2 heures

Concentration en acide (mM)	Activité (μ moles/ h. mg de cell. s.)
0	3,2
100	4,5
200	3,8
300	4,1
400	4
500	4
600	3,4
700	2,8

EXEMPLE 4

Purification de la nitrilase

- 10 Les cellules d'*Alcaligenes faecalis* sont cultivées 24 heures à 30°C dans le milieu décrit à l'exemple 1.

Après centrifugation de la culture, le culot est repris dans le tampon pH 7,5 (25mM trisHCl, 10 % (p/v) glycérol). La suspension cellulaire est

traitée aux ultrasons puis centrifugée afin d'obtenir l'extrait brut. L'extrait brut est ensuite traité avec du sulfate d'ammonium jusqu'à 30 % de la saturation. Le précipité obtenu est resuspendu dans le tampon pH 7,5 puis dialysé contre 2 litres du même tampon durant une nuit.

- 5 La solution obtenue est ensuite déposée sur une colonne échangeuse d'anions Q Sepharose Fast Flow HR 26/10® préalablement équilibrée avec le tampon pH 7,5. L'activité est ensuite éluée avec un gradient de 0 à 1 M de NaCl.

- 10 Les fractions actives sont ensuite déposées sur une colonne échangeuse d'anions Mono Q HR 5/5® préalablement équilibrée avec du tampon pH 7,5. La nitrilase est éluée à l'aide d'un gradient de 0 à 1 M de NaCl.

- 15 Pour finir, les fractions contenant l'activité sont réunies, puis est ajouté 1 M de sulfate d'ammonium. Cette solution est déposée sur une colonne d'interactions hydrophobes Phényl sepharose HR 5/5® préalablement équilibrée avec le tampon pH 7,5 additionné de 1 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. L'activité est ensuite éluée avec un gradient de 1 à 0 M en sulfate d'ammonium.

- 20 Le poids moléculaire de la protéine est déterminé par gel filtration. Il est d'environ 260 kDa. Sur gel de SDS-PAGE, on observe une unique bande de 43 kDa (pureté de 95 %).

La cinétique d'hydrolyse du 4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile en hydroxy analogue de la méthionine par la nitrilase d'*A. faecalis* est linéaire

Temps (Heure)	Activité (μ moles/ h. mg de prot.)	RR (%)
0	0	1
0,5	150	3
1	171	5
21,5	150	68
24,8	150	77
29	150	87

EXEMPLE 5 Influence du pH

Conditions opératoires :

nitrile 50 mM
protéine 50 μ g/ml

5 tampon acétate 100 mM de pH 4 à 5
tampon phosphate 100 mM de pH 6 à 7 1 ml
tampon TRIS-HCl 100 mM de pH 8 à 9
tampon borate 100 mM de pH 10 à 11
température 30°C
10 Durée 1 à 2 heures

pH	Activité (μ moles/ h. mg de prot.)
4	0
5	42
6	232
7	272
8	405
9	412
10	158
11	0

EXEMPLE 6 Influence de la température

Conditions opératoires

nitrile 50 mM

protéine 50 µg/ml
 tampon phosphate 100 mM de pH 7,0
 températures variables de 4°C à 60°C
 durée 1 heure

5 La température optimale de fonctionnement de l'enzyme est de 50°C.

Température en °C	Activité (µmoles/ h. mg de prot.)
4	45
10	67
20	140
30	272
40	419
50	570
60	333

EXEMPLE COMPARATIF AVEC LE MANDELONITRILE

Conditions opératoires:

10 Mandélonitrile 7 mM
 Protéine 5 µg/ ml
 Tampon phosphate 100 mM pH 7,0 1 ml
 Température 30°C

Temps (minute)	Activité (µmoles/ h. mg de prot.)	ee
15	1000	1
60	1030	1

La nitrilase purifiée est donc énantiosélective sur le mandélonitrile mais pas sur le 4-méthylthio 2-hydroxybutyronitrile.

EXEMPLE 7

Hydrolyse du 4-méthyl thio 2-hydroxy butyronitrile par *Rhodococcus* HT 29-7 FERM BP-3857

Le micro-organisme *Rhodococcus* sp. HT 29-7 FERM BP-3857 est
5 cultivé dans le milieu suivant:

	Glycérol	20 g/l
	Extrait de levure (DIFCO)	3 g/l
	KH ₂ PO ₄	1 g/l
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	4,4 g/l
10	Na ₂ SO ₄	2,8 g/l
	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,85 g/l
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05 g/l
	MnSO ₄ .H ₂ O	0,033 g/l
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,013 g/l
15	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,005 g/l
	Benzonitrile	0,5 g/l
	pH 7,5	

La culture est réalisée à 30°C dans des fioles d'Erlenmeyer de 2 litres contenant 600 ml de milieu. Le tout est agité à 150 tours par minute
20 durant 140 heures. Le culot cellulaire est récupéré, lavé avec une solution NaCl à 9 g/l puis congelé.

Influence du pH pour l'hydrolyse :

Conditions opératoires:

	4-méthyl thio 2-hydroxy butyronitrile	100 mM
25	Densité Optique à 660nm	15
	Tampon acétate 100 mM de pH 4 à 5	
	Tampon phosphate 100 mM de pH 6,0 à 7,0	1 ml
	Tampon TRIS-HCl 100 mM de pH 8,0 à 9,0	
	Tampon Borate 100 mM de pH 10,0 à 11,0	
30	Température	30°C
	Durée	10 heures

pH	Rendement en acide
4	0%
5	100%
6	100%
7	100%
8	100%
9	100%
10	20%
11	0%

EXEMPLE 8 : Influence de la concentration en substrat.

La stabilité de l'enzyme en fonction de la quantité de substrat a aussi été mesurée dans les conditions suivantes:

5

4-méthyl thio 2-hydroxy butyronitrile cf Tableau résultats
 Densité Optique à 660nm 20
 Tampon phosphate 300 mM pH 7,0 5 ml
 Température 30°C
 Durée 2 heures

Concentration en nitrile (mM)	Rendement en acide
50	90%
100	44%
200	22%
300	10 %
400	0%
500	0%

EXEMPLE 9 Stabilité de l'enzyme en fonction de la quantité d'acide formé

Conditions opératoires:

5 4-méthyl thio 2-hydroxy butyronitrile 100 mM
 Densité Optique à 660nm 15
 Tampon phosphate 100 mM pH 7,0 1 ml
 Température 30°C
 Durée 6 heures

Concentration en acide (mM)	rendement en acide
0	100%
200	100%
400	100%
600	100%
800	100%
1000	100%

EXEMPLE 10

Excès énantiomérique.

10 4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile 140 mM
 Densité Optique à 660nm 14
 Tampon phosphate 100 mM pH 7,0 1 ml
 Température 20°C

Temps d'incubation	Rendement en acide	Pureté optique
2 h	15%	0
6 h	50%	0
24 h	100%	0

15 L'étude cinétique d'hydrolyse du 4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile
 montre une production linéaire d'hydroxy analogue de la méthionine par

heure par mg de cellules sèches. L'excès énantiomérique de l'acide formé a été mesuré par chromatographie liquide, il est égal à 0% pour un rendement en acide variant de 15% à 100%.

EXEMPLE 11 Influence de la température.

5 Conditions opératoires:

4-méthyl thio 2-hydroxy butyronitrile 100 mM
 Densité Optique à 660nm 15
 Tampon phosphate 100 mM pH 7,0 1 ml
 Température voir tableau
 Durée 6 heures

10

T. (°C)	rendement en acide
10	70%
20	100%
30	100%
40	100%
50	31%
60	15%

EXEMPLE 12 Hydrolyse du 4 méthylthio 2-aminobutyronitrile.

Conditions opératoires:

4-méthyl thio 2-hydroxy butyronitrile 23 mM
 Densité Optique à 660nm 15
 Tampon phosphate 100 mM pH 7,0 1 ml
 Température 30°C

15

Temps (heure)	rendement en acide	excès énantiomérique de l'acide
0,5	40%	n.d.
1	51%	0,12
2	62%	n. d.
5	78%	0,15

EXEMPLE 13

Les conditions de cultures utilisées pour *Gordona terrae* MA-1 (FERM BP-4535) sont les suivantes :

5	Glycérol	10 g/l
	Extrait de levure	0,4 g/l
	K ₂ HPO ₄	6,8 g/l
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	7,1 g/l
	Na ₂ SO ₄	2,8 g/l
10	MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,4 g/l
	CaCl ₂ . 2H ₂ O	40 mg/l
	MnSO ₄ . H ₂ O	4 mg/ml
	FeCl ₃	0,6 mg/l
	ZnSO ₄	0,3 mg/l
15	Benzonitrile	0,5 g/l
	pH 7,2	

Activité de l'enzyme

Les cellules cultivées sont ensuite lavées puis mises en présence de l'hydroxy méthylthio butyronitrile pour le dosage de l'activité

Conditions opératoires :

20	[nitrile] = 23 mM;
	[cellules] = 6,8 g/l;
	tampon phosphate 100 mM
	pH 7,0; 35°C

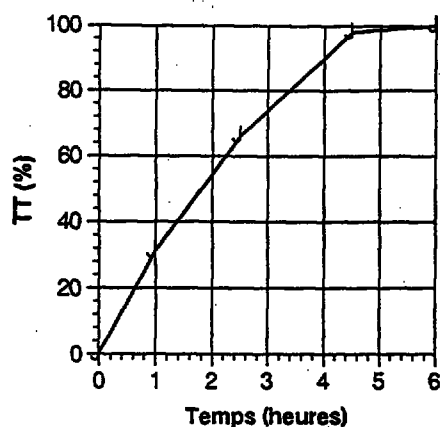


Figure 3: Hydrolyse de la cyanhydrine de l'AMTP par *Gordona terrae* MA-1.

La cinétique d'hydrolyse de l'hydroxy méthylthio butyro nitrile est linéaire. La vitesse initiale est estimée à 13 mmol/ h. g CS .

EXEMPLE 14 Influence de la concentration en cyanhydrine de l'AMTP sur l'activité nitrilase.

- 5 L'influence de la concentration initiale en hydroxy méthylthio butyronitrile sur l'activité nitrilase a été déterminée, les résultats sont indiqués dans le tableau suivant.

Conditions opératoires:

[cellules]=5,1 g/ l;

10 Tampon phosphate 100 mM

pH 7,0; 35°C.

La cinétique est réalisée sur 0,5, 1, 2 et 3 heures.

Concentration en nitrile (mM)	Activité (mmol/ h. g CS)
50	14
100	13
200	15
300	0
400	0

Jusqu'à 200 mM, l'activité varie peu avec la concentration en substrat.

EXEMPLE 15 Influence de la concentration en hydroxy analogue de la méthionine sur l'activité nitrilase.

Dans cet essai, nous avons étudié l'influence de la concentration en hydroxy-4 méthylthio-2 butanoate d'ammonium sur l'activité nitrilase.

5 Condition opératoire:

[cellules] = 5 g/ l;

[nitrile] = 100 mM;

tampon phosphate 100 mM pH 7,0;

35°C.

10 La concentration en carboxylate d'ammonium varie entre 0 et 1,5 M.

Concentration en acide (mole/ l)	Activité (μ mol/ h. mg de CS)
0	9,4
0,5	14
1	19
1,5	15

La concentration en hydroxy-4 méthylthio-2 butanoate d'ammonium ne modifie en rien l'activité initiale de la souche Gordona terrae HT29-7.

EXEMPLE 16 Influence du pH et de la température.

Conditions opératoires:

15 [nitrile]=100 mM;

[cellules]=7,5 g/ l;

Tampon acétate 100 mM pH 4 à 5;

tampon phosphate 100 mM pH 6 à 7;

tampon Tris-HCl 100 mM pH 8 à 9

20 tampon Borate 100 mM pH 10 à 11; 3

30°C; cinétique sur 1, 2, 4 et 6 heures.

pH	Activité (mmol/ h. g CS)
4	0,6
5	2,5
6	7,8
7	9,6
8	15,3
9	18
10	5,7
11	11

Le pH optimum se situe aux alentours de 8-9 dans nos conditions opératoires.

Influence de la température sur l'activité nitrilase de Gordona terrae MA-1.

Conditions opératoires:

- 5 [nitrile]=100 mM;
 [cellules]=7,5 g/ l;
 Tampon phosphate 100 mM pH 7,0;
 cinétique sur 1 heure.

T (°C)	Activité (mmol/ h. g CS)
10	0,6
20	2,3
30	3,2
40	3,4
50	3,5
60	1,9

La température optimale se situe vers 40-50°C.

REVENDICATIONS

- 1 - Procédé de préparation d'acides 4-méthylthio butyrique α substitués racémiques caractérisé en ce qu'on hydrolyse les 4-méthylthio butyronitrile α substitués racémiques par une nitrilase choisie parmi celles d'*Alcaligenes faecalis*, *Rhodococcus sp.* HT 29-7 ou de *Gordona terrae*.

- 2 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le 4-méthylthio butyronitrile α substitués racémiques est le 4-méthylthio 2-hydroxy butyronitrile

- 3 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le pH du milieu est compris entre 4 et 11 et de préférence entre 5 et 9.

- 4 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la température d'hydrolyse est comprise entre 30 et 60°C et de préférence 30 et 50°C.

- 5 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la concentration en 4-méthylthio butyronitrile α substitué dans la solution de départ est comprise entre 10 et 400 mmoles et de préférence entre 50 et 200 mmoles par litre.

- 6 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la concentration en acide 4 méthylthio butyrique α substitué dans la solution est comprise entre 10 et 2000 mmoles par litre et de préférence entre 100 et 1500 mmoles par litre.

- 7 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'on utilise une nitrilase appartenant à un micro-organisme du genre *Alcaligenes*.

- 8 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'on utilise une nitrilase appartenant à un micro-organisme du genre *Rhodococcus*.

- 9 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'on utilise une nitrilase appartenant à un micro-organisme du genre *Gordona*.



SG 9701145-6



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12P 11/00 // (C12P 11/00, C12R 1:01, 1:05)	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/09403
		(43) Date de publication internationale: 28 mars 1996 (28.03.96)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01196 ✓

(22) Date de dépôt international: 19 septembre 1995 (19.09.95) ✓

(30) Données relatives à la priorité:

94/11301 ✓	22 septembre 1994 (22.09.94) ✓	FR
95/02615 ✓	7 mars 1995 (07.03.95) ✓	FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE [FR/FR], 42, avenue Aristide-Briand, F-92160 Antony (FR). ✓

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): FAVRE-BULLE, Olivier [FR/FR]; 22, rue du Père-Chevier, F-69007 Lyon (FR). BONToux, Marie-Claude [FR/FR]; "Le Village", F-38200 Luzinay (FR). LARGEAU, Denis [FR/FR]; Résidence Les Coteaux, Route du Bâtard, F-69440 Taluyers (FR). ARIAGNO, André [FR/FR]; 11, allée des Jardins-des-Hespérides, F-69340 Francheville (FR).

(74) Mandataire: LE PENNEC, Magali; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).

(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) Title: ENZYMATIC HYDROLYSIS OF 4-METHYLTHIOBUTYRONITRILES

(54) Titre: HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES 4-METHYLTHIOBUTYRONITRILE

(57) Abstract

A novel method for the enzymatic hydrolysis of 4-methylthiobutyronitriles into racemic 4-methylthiobutyric acid using a nitrilase of *Alcaligenes faecalis*, *Rhodococcus sp.* HT 29-7 or *Gordona terrae*.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un nouveau procédé d'hydrolyse enzymatique des 4-méthylthiobutyronitrile en acide 4-méthylthiobutyrique racémique à l'aide d'une nitrilase d'*Alcaligenes faecalis*, *Rhodococcus sp.* HT 29-7 ou de *Gordona terrae*.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovenie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

970 1 145 -6

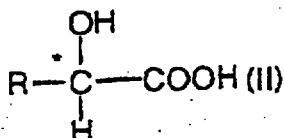
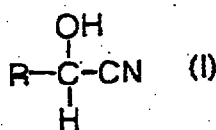
ENZYMATIC HYDROLYSIS OF 4-METHYLTHIOBUTYRONITRILE

The present invention relates to the use of a nitrilase as a catalyst for hydrolysing a nitrile group into a carboxylic group. The invention relates more
5 precisely to the use of the nitrilase chosen from nitrilases of microorganisms of the genus *Alcaligenes*, *Rhodococcus* or *Gordona* and more precisely of *Alcaligenes faecalis* filed under the number ATCC 8750, *Rhodococcus* sp. HT 29-7 filed under the number FERM BP-
10 3857 or *Gordona terrae* MA-1 filed under the number FERM BP-4535.

The nitrilase of *Alcaligenes faecalis* is described, for example, in the European and Japanese patents published under the numbers EP 348,901 and
15 JP 03 224 496 respectively, both belonging to the Asahi company. In these patents, and more particularly in the European patent, the nitrilase is used to produce optically active acids from racemic nitriles. The preferred starting nitriles are α -substituted and
20 contain an alkyl chain preferably containing 1 to 3 carbon atoms or an aromatic radical. Example 11 of the abovementioned European patent describes the hydrolysis of racemic mandelonitrile with *Alcaligenes faecalis*; the R-(-)-mandelic acid is obtained in an enantiomeric
25 excess of 91%. European patent 486,289 and its equivalent American patent US 5,326,702 from the company Nitto Chemical describe the use of *Alcaligenes*

sp. BC35-2 (FERM No. 11265 or FERM-BP-3318) to hydrolyse mandelonitrile in the presence of a sulphite; in this case, mandelic acid is obtained in an enantiomeric excess of about 98%.

5 Patent JP 04 341 185 from the company Asahi also describes the preparation and use of the nitrilase from *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 to solve the problems of preparation of optically pure compounds from their racemic nitrile. The enantioselective
10 nitrilase described in the Japanese patent referred to above is more preferably capable of hydrolysing the 2-hydroxynitrile of general formula (I) below into 2-hydroxycarboxylic acid of formula (II) below:



in which R represents an optionally substituted aryl
15 group or an optionally substituted heterocyclic group. It is mentioned in that patent that hydrolysis of the nitrile of mandelic acid by the said nitrilase makes it possible to obtain a 100% enantiomeric excess of
R-(-)-mandelic acid. It is mentioned in Example 5 that
20 the said nitrilase may be used to hydrolyse aliphatic nitriles such as valeronitrile, acrylonitrile, 2-halopropionitriles and chloroacetonitrile. Nothing is

specified as regards the enantioselectivity of this hydrolysis on aliphatic nitriles having an asymmetric centre.

The said text also specifies that the
5 nitrilase of *Alcaligenes faecalis* is of optimum activity at a pH between 6.5 and 8.0; the working temperature of the said enzyme should, according to that reference, always be below 45°C.

It appeared to be entirely surprising that
10 the said enzyme of *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750, when used to hydrolyse 4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile, carried out this hydrolysis without any selectivity from the point of view of the optical purity. This enzyme hydrolyses the said nitrile producing a racemic
15 mixture of the two acids with no preponderance of either of the isomers.

The nitrilase of *Rhodococcus* sp. HT 29-7 filed under the number FERM BP-3857 is described, for example, in the European and American patents published
20 under the numbers EP 610,049 and US 5,296,373 respectively, both belonging to the company Nitto.

In these patents, and particularly in the American patent, the nitrilase is used to produce optically active acids from racemic nitriles bearing a
25 phenyl group. The starting nitriles all contain an aromatic radical; this essentially involves hydrolysis of mandelonitrile or of derivatives thereof substituted on the aromatic ring. Example 1 of the abovementioned

American patent describes the hydrolysis of racemic mandelonitrile with *Rhodococcus* sp. HT 29-7; the R-(-)-mandelic acid is obtained in an enantiomeric excess of 100%. Example 2 describes the hydrolysis of substituted mandelonitrile derivatives on the ring; the enantiomeric excess of mandelic acid derivative is also 100% and this is likewise the case when the hydrolysis is carried out on benzaldehyde nitriles.

European patent 610 049 from the company Nitto Chemical describes the use of *Rhodococcus* sp. HT 29-7 (FERM BP-3857), of *Alcaligenes* sp. BC35-2 (FERM BP-3318) or of *Brevibacterium acetylicum* IAM 1790 to hydrolyse α -hydroxynitriles substituted in the γ position with an aromatic ring into α -hydroxycarboxylic acid substituted with an optically active phenyl group. The acids obtained with *Rhodococcus* sp. HT 29-7 always have a variable enantiomeric excess depending on the starting nitrile and on the presence or absence of phosphoric acid (pH set at about 8.2).

It appeared to be entirely surprising that the said enzyme of *Rhodococcus* sp. HT 29-7 (FERM BP-3318), when used to hydrolyse 4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile, carried out this hydrolysis without any enantiomeric selectivity. This enzyme hydrolyses the said nitrile producing a racemic mixture of the two acids without any preponderance of either of the isomers.

The nitrilase of *Gordona terrae* MA-1 filed

under the number FERM BP-4535 is described in European patent 0,610,048 to hydrolyse nitriles bearing a γ -phenyl group and an α -hydroxy group into the corresponding optically active acid. The enantiomeric excess ranges in all the examples between 92 and 100%.

It appeared to be entirely surprising that the said enzyme of *Gordona terrae* MA-1 filed under the number FERM BP-4535, when used to hydrolyse 4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile, carried out this hydrolysis without any enantiomeric selectivity. This enzyme hydrolyses the said nitrile producing a racemic mixture of the two acids without any preponderance of either of the isomers.

The present invention thus relates to a process for the preparation of racemic α -substituted 4-methylthiobutyric acids by hydrolysis of racemic α -substituted 4-methylthiobutyronitriles with the nitrilase of one of the following microorganisms: *Alcaligenes faecalis* filed under the number ATCC 8750, *Rhodococcus* sp. HT 29-7 filed under the number FERM BP-3857 or *Gordona terrae* MA-1 filed under the number FERM BP-4535.

According to the process of the invention, the microorganism may be used as it is or immobilized on supports which are well known to those skilled in the art.

Moreover, the genetic information which codes for the enzyme may be transferred from the parent

microorganism (such as *A. faecalis* ATCC8750, etc.) into a microorganism such as *Bacillus subtilis*.

One variant of the process of the invention consists in using, in place of a microorganism, a
5 corresponding amount of its free or immobilized enzyme, this enzyme being totally or partially purified.

Among the α -substituted 4-methylthiobutyronitriles, it is preferred to use 4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile, which makes it
10 possible to prepare the hydroxy analogue of racemic methionine. This technique for the preparation of methionine derivatives makes it possible to avoid the formation of large amounts of inorganic side products whose disposal causes ever-increasing problems on
15 account of environmental protection constraints.

In the context of the present invention, these enzymes have a nitrilase activity in a pH range between 4 and 11 and optimum activity at a pH of between 5 and 9. Their optimum working temperature is
20 between 30 and 60°C; it is preferred, however, to use them between 30 and 50°C.

It is preferred to work with a nitrile concentration in the starting solution of between 10 mmol and 400 mmol per litre and preferably between 50
25 and 200 mmol per litre. The concentration of ammonium salt of the acid obtained has little influence on the activity of the enzyme when it is less than 2 mol per litre and it is preferably between 0.1 and 1.5 mol per

litre.

The invention will be described more fully with the aid of the examples which follow, which should not be considered as limiting the invention.

5 EXAMPLE 1

The microorganism *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 is cultured in the following medium:

	ammonium acetate	10 g/l
	yeast extract	5 g/l
10	peptone	5 g/l
	K ₂ HPO ₄	5 g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g/l
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	30 mg/l
	NaCl	1 g/l
15	benzonitrile	0.5 g/l
	pH 7.2	

Culturing is carried out at 30°C in 2 litre conical flasks containing 600 ml of medium. The whole mixture is stirred at 150 revolutions per minute for 30 hours. The cell pellet is recovered, washed with 9 g/l NaCl solution and then frozen.

Operating conditions to hydrolyse the butyronitrile:

	4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile	50 mM
25	cells	5 mg/ml
	phosphate buffer	200 mM
	temperature	30°C
	duration	4 hours

Study of the kinetics of hydrolysis of 4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile shows a linear production of 2.8 μ mol of hydroxy analogue of methionine per hour and per mg of dry cells. The

5 enantiomeric excess of the acid formed was measured by liquid chromatography; it is equal to 0% for a yield of acid of 80%.

EXAMPLE 2

The stability of the enzyme was evaluated
10 according to the kinetics of production of the hydroxy analogue of methionine over 180 hours with free cells.

The operating conditions are as follows:

4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile	100 mM
cells	10 mg/ml
15 phosphate buffer	300 mM
	5 ml
temperature	25°C

The nitrile is added sequentially by addition of 100 mmol of nitrile after depletion. The formation of the corresponding acid is indicated in Table I

TIME	Acid formed (mmol/litre)	Activity ($\mu\text{mol/h}\cdot\text{mg}$ of cell $\cdot\text{s}$)
0	0	0
2 h	39	1.7
17 h	230	1.3
24 h	312	1.7
47 h	466	1.2
70 h	556	0.4
172 h	860	0.6
180 h	940	0.6

10 The initial activity is 2 $\mu\text{mol/h}\cdot\text{mg}$ of dry cells. This example proves the stability of the enzyme despite the presence of high concentrations of acid (0.9 mol of hydroxy analogue of methionine).

EXAMPLE 3

15 The stability of the enzyme as a function of the amount of substrate and of the amount of acid formed was also measured under the following conditions:

20 Stability of the enzyme as a function of the amount of substrate

nitrile	cf table of results
cells	10 mg/ml
phosphate buffer	300 mM
pH 7.0	5 ml
25 temperature	25°C

duration

1 hour

Nitrile concentration (mM)	Activity ($\mu\text{mol/h}\cdot\text{mg}$ of cell $\cdot\text{s}$)
50	2
100	2
150	2
200	2
500	0

5

Stability of the enzyme as a function of the

10 amount of acid formed

operating conditions:

nitrile 50 mM
 cells 2.5 mg/ml
 phosphate buffer 100 mM
 pH 7.0 1 ml
 temperature 30°C
 duration 2 hours

15

Acid concentration (mM)	Activity ($\mu\text{mol/h}\cdot\text{mg}$ of cell $\cdot\text{s}$)
0	3.2
100	4.5
200	3.8
300	4.1
400	4
500	4
600	3.4
700	2.8

EXAMPLE 4**Purification of the nitrilase**

The cells of *Alcaligenes faecalis* are cultured for 24 hours at 30°C in the medium described in Example 1.

After centrifuging the culture, the pellet is taken up in pH 7.5 buffer (25 mM trisHCl, 10% (w/v) glycerol). The cell suspension is treated with ultrasound and then centrifuged in order to obtain the crude extract. The crude extract is then treated with ammonium sulphate up to 30% of saturation. The precipitate obtained is resuspended in pH 7.5 buffer and then dialysed against 2 litres of the same buffer overnight.

The solution obtained is then loaded onto a Q Sepharose Fast Flow HR 26/10° anion-exchange column pre-

equilibrated with the pH 7.5 buffer. The activity is then eluted with a gradient of 0 to 1 M NaCl.

The active fractions are then loaded onto a Mono Q HR 5/5[°] anion-exchange column pre-equilibrated with pH 7.5 buffer. The nitrilase is eluted using a gradient of 0 to 1 M NaCl.

Lastly, the fractions containing the activity are combined and 1 M ammonium sulphate is then added. This solution is loaded onto a Phenyl Sepharose HR 5/5[°] hydrophobic-interaction column pre-equilibrated with the pH 7.5 buffer, to which is added 1 M (NH₄)₂SO₄. The activity is then eluted with a gradient of 1 to 0 M ammonium sulphate.

The molecular weight of the protein is determined by gel filtration. It is about 260 kDa. A single band of 43 kDa is observed on SDS-PAGE (purity of 95%).

The kinetics of hydrolysis of the 4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile into the hydroxy analogue of methionine with the nitrilase of *A. faecalis* is linear.

Time (hour)	Activity ($\mu\text{mol/h}\cdot\text{mg}$ of prot.)	RY (%)
0	0	1
0.5	150	3
1	171	5
21.5	150	68
24.8	150	77
29	150	87

EXAMPLE 5 Influence of the pH

10

Operating conditions:

nitrile

50 mM

protein

50 $\mu\text{g/ml}$

acetate buffer, 100 mM of pH 4 to 5

phosphate buffer 100 mM of pH 6 to 7 1 ml

15

Tris-HCl buffer 100 mM of pH 8 to 9

borate buffer 100 mM of pH 10 to 11

temperature

30°C

duration

1 to 2 hours

pH	Activity ($\mu\text{mol/h}\cdot\text{mg}$ of prot.)
4	0
5	42
6	232
7	272
8	405
9	412
10	158
11	0

10 **EXAMPLE 6 Influence of the temperature**

Operating conditions:

nitrile 50 mM

protein 50 $\mu\text{g/ml}$

phosphate buffer 100 mM

15 of pH 7.0

variable temperatures

from 4°C to 60°C

duration 1 hour

The optimum working temperature of the enzyme is 50°C.

Temperature in °C	Activity ($\mu\text{mol/h}\cdot\text{mg}$ of prot.)
4	45
10	67
20	140
30	272
40	419
50	570
60	333

10 COMPARATIVE EXAMPLE WITH MANDELONITRILE

Operating conditions:

mandelonitrile	7 mM
protein	5 $\mu\text{g/ml}$
phosphate buffer 100 mM, pH 7.0	1 ml
temperature	30°C

Time (minute)	Activity ($\mu\text{mol/h}\cdot\text{mg}$ of prot.)	ee
15	1000	1
60	1030	1

20 The purified nitrilase is thus enantioselective on mandelonitrile but not on 4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile.

EXAMPLE 7

Hydrolysis of 4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile with *Rhodococcus* HT 29-7 FERM BP-3857

5 The microorganism *Rhodococcus* sp. HT 29-7 FERM BP-3857 is cultured in the following medium:

	glycerol	20 g/l
	yeast extract (DIFCO)	3 g/l
	KH_2PO_4	1 g/l
10	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	4.4 g/l
	Na_2SO_4	2.8 g/l
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.85 g/l
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05 g/l
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.033 g/l
15	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.013 g/l
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.005 g/l
	benzonitrile	0.5 g/l
	pH 7.5	

The culturing is performed at 30°C in 2 litre
 20 conical flasks containing 600 ml of medium. The whole mixture is stirred at 150 revolutions per minute for 140 hours. The cell pellet is recovered, washed with 9 g/l NaCl solution and then frozen.

Influence of the pH on the hydrolysis:

25 Operating conditions:

4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile	100 mM
optical density at 660 nm	15
acetate buffer 100 mM of pH 4 to 5	

phosphate buffer 100 mM of pH 6.0

to 7.0

1 ml

Tris-HCl buffer 100 mM of pH 8.0

to 9.0

5

borate buffer 100 mM of pH 10.0

to 11.0

temperature

30°C

duration

10 hours

10

pH	Yield of acid
4	0%
5	100%
6	100%
7	100%
8	100%
9	100%
10	20%
11	0%

15

EXAMPLE 8 Influence of the concentration of substrate

The stability of the enzyme as a function of

20 the amount of substrate was also measured under the

following conditions:

4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile cf Table

of results

optical density at 660 nm

20

25

phosphate buffer 300 mM, pH 7.0

5 ml

temperature

30°C

duration

2 hours

5

10

Nitrile concentration (mM)	Yield of acid
50	90%
100	44%
200	22%
300	10%
400	0%
500	0%

EXAMPLE 9 Stability of the enzyme as a function of the amount of acid formed

Operating conditions:

15

4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile 100 mM

optical density at 660 nm 15

phosphate buffer 100 mM, pH 7.0 1 ml

temperature 30°C

duration 6 hours

Acid concentration (mM)	Yield of acid
0	100%
200	100%
400	100%
600	100%
800	100%
1000	100%

EXAMPLE 10

10 Enantiomeric excess

4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile 140 mM
 optical density at 660 nm 14
 phosphate buffer 100 mM, pH 7.0 1 ml
 temperature 20°C

15

Incubation time	Yield of acid	Optical purity
2 h	15%	0
6 h	50%	0
24 h	100%	0

20

Study of the kinetics of hydrolysis of the
 4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile shows a linear
 production of hydroxy analogue of methionine per hour
 per mg of dry cells. The enantiomeric excess of the
 acid formed was measured by liquid chromatography; it

is equal to 0% for a yield of acid ranging from 15% to 100%.

EXAMPLE 11 Influence of the temperature.

Operating conditions:

5 4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile 100 mM
 optical density at 660 nm 15
 phosphate buffer 100 mM, pH 7.0 1 ml
 temperature see table
 duration 6 hours

10

T(°C)	Yield of acid
10	70%
20	100%
30	100%
40	100%
15 50	31%
60	15%

EXAMPLE 12 Hydrolysis of 4-methylthio-2-aminobutyronitrile

Operating conditions:

20 4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile 23 mM
 optical density at 660 nm 15
 phosphate buffer 100 mM, pH 7.0 1 ml
 temperature 30°C

5	Time (hours)	Yield of acid	Enantiomeric excess of the acid
	0.5	40%	n.d.
	1	51%	0.12
	2	62%	n.d.
	5	78%	0.15

EXAMPLE 13

Culture conditions used for *Gordona terrae*

MA-1 (FERM BP-4535) are as follows:

10	glycerol	10 g/l
	yeast extract	0.4 g/l
	K_2HPO_4	6.8 g/l
	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	7.1 g/l
	Na_2SO_4	2.8 g/l
15	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.4 g/l
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	40 mg/l
	$MnSO_4 \cdot H_2O$	4 mg/ml
	$FeCl_3$	0.6 mg/l
	$ZnSO_4$	0.3 mg/l
20	benzonitrile	0.5 g/l
	pH 7.2	

Activity of the enzyme

The cultured cells are next washed and then placed in contact with the

25 hydroxymethylthiobutyronitrile in order to assay the activity.

Operating conditions:

[nitrile] = 23 mM;

[cells] = 6.8 g/l;

phosphate buffer 100 mM

pH 7.0, 35°C

5

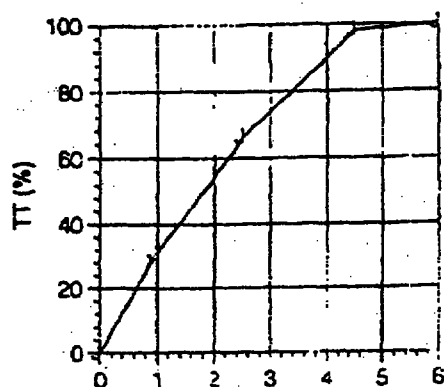


Figure 3: Hydrolysis of the cyanohydrin of AMTP by *Gordona terrae* MA-1.

Time (hours)

10

The kinetics of hydrolysis of the hydroxymethylthiobutyronitrile are linear. The initial rate is estimated at 13 mmol/h·g dry cells.

EXAMPLE 14 Influence of the concentration of cyanohydrin of AMTP on the nitrilase activity.

15

The influence of the initial concentration of hydroxymethylthiobutyronitrile on the nitrilase activity was determined, and the results are indicated in the following table.

Operating conditions:

20

[cells]=5.1 g/l;

phosphate buffer 100 mM

pH 7.0; 35°C.

The kinetics are effected over 0.5, 1, 2 and 3 hours.

Nitrile concentration (mM)	Activity (mmol/h·g dry cells)
50	14
100	13
200	15
300	0
400	0

Up to 200 mM, the activity varies little with the concentration of substrate.

EXAMPLE 15 Influence of the concentration of hydroxy analogue of methionine on the nitrilase activity.

In this test, we studied the influence of the concentration of ammonium 4-hydroxy-2-methylthiobutanoate on the nitrilase activity.

Operating conditions:

[cells] = 5 g/l;
[nitrile] = 100 mM;
phosphate buffer 100 mM, pH 7.0;
35°C.

The concentration of ammonium carboxylate varies between 0 and 1.5 M.

Acid concentration (mol/l)	Activity (μ mol/h·mg of dry cells)
0	9.4
0.5	14
1	19
1.5	15

The concentration of ammonium 4-hydroxy-2-methylthiobutanoate does not at all modify the initial activity of the strain *Gordona terrae* HT29-7.

10 EXAMPLE 16 Influence of the pH and of the temperature.

Operating conditions:

[nitrile]=100 mM;

[cells]=7.5 g/l;

acetate buffer 100 mM, pH 4 to 5;

15 phosphate buffer 100 mM, pH 6 to 7;

Tris-HCl buffer 100 mM, pH 8 to 9

borate buffer 100 mM, pH 10 to 11; 3

30°C; kinetics over 1, 2, 4 and 6 hours.

pH	Activity (mmol/h·g dry cells)
4	0.6
5	2.5
6	7.8
7	9.6
8	15.3
9	18
10	5.7
11	11

10 The optimum pH is at about 8-9 under our
operating conditions.

Influence of the temperature on the nitrilase activity
of *Gordona terrae* MA-1.

Operating conditions:

15 [nitrile]=100 mM;
 [cells]=7.5 g/l;
 phosphate buffer 100 mM, pH 7.0;
 kinetics over 1 hour.

T(°C)	Activity (mmol/h·g dry cells)
10	0.6
20	2.3
30	3.2
40	3.4
50	3.5
60	1.9

The optimum temperature is about 40-50°C.



WO 96/09403

27

PCT/FR95/01196

CLAIMS

1. Process for the preparation of racemic α -substituted 4-methylthiobutyric acids, characterized in that the racemic α -substituted

5 4-methylthiobutyronitriles are hydrolysed by a nitrilase chosen from those of Alcaligenes faecalis, Rhodococcus sp. HT 29-7 or Gordona terrae.

2. Process according to claim 1, characterized in that the racemic α -substituted

10 4-methylthiobutyronitrile is 4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile.

3. Process according to claim 1, characterized in that the pH of the medium is between 4 and 11 and preferably between 5 and 9.

15 4. Process according to claim 1, characterized in that the hydrolysis temperature is between 30 and 60°C and preferably 30 and 50°C.

5. Process according to claim 1, characterized in that the concentration of

20 α -substituted 4-methylthiobutyronitrile in the starting solution is between 10 and 400 mmol and preferably between 50 and 200 mmol per litre.

6. Process according to claim 1, characterized in that the concentration of

25 α -substituted 4-methylthiobutyric acid in the solution is between 10 and 2000 mmol per litre and preferably between 100 and 1500 mmol per litre.

7. Process according to claim 1,





characterized in that a nitrilase belonging to a
microorganism of the genus *Alcaligenes* is used.

8. Process according to claim 1,
characterized in that a nitrilase belonging to a
5 microorganism of the genus *Rhodococcus* is used.

9. Process according to claim 1,
characterized in that a nitrilase belonging to a
microorganism of the genus *Gordona* is used.



PCT: WORLD ORGANISATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY
International Office
INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International patent classification⁶ : C12P 11/00 // (C12P 11/00, C12R 1:01, 1:05)	A1	(11) International publication number: WO 96/09403 (43) International publication date: 28 March 1996 (28.03.96)
(21) International application number: PCT/FR95/01196 (22) International filing date: 19 September 1995 (19.09.95) (30) Data relating to the priority: 94/11301 22 September 1994 (22.09.94) FR 95/02615 7 March 1995 (07.03.95) FR (71) Applicant (for all designated States except US): RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE [FR/FR]; 42, avenue Aristide-Briand, F-92160 Antony (FR). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (US only): Olivier FAVRE-BULLE [FR/FR]; 22, rue du Père-Chevier, F-69007 Lyon (FR). Marie-Claude BONTUUX [FR/FR]; "Le Village", F-38200 Luzinay (FR). Denis LARGEAU [FR/FR]; Résidence Les Conteaux, Route du Bâtard, F-69440 Taluyers (FR). André ARIAGNO [FR/FR]; 11, allée des Jardins-des-Hespérides, F-69340 Francheville (FR). (74) Representative: Magali LE PENNEC; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Patent Directorate, 20 avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).	(81) Designated States: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, US, UZ, VN, European Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). ARIPO Patent (KE, MW, SD, SZ, UG). Published With the International Search Report. Before expiry of the period provided for amending the claims, will be republished if such amendments are received	
As printed		
(54) Title: ENZYMATIC HYDROLYSIS OF 4-METHYLTHIOBUTYRONITRILES (54) Titre: HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES 4-METHYLTHIOBUTYRONITRILE (57) Abstract A novel method for the enzymatic hydrolysis of 4-methylthiobutyronitriles into racemic 4-methylthiobutyric acid using a nitrilase of <i>Alcaligenes faecalis</i>, <i>Rhodococcus sp.</i> HT 29-7 or <i>Gordona terrae</i>. (57) Abrégé La présente invention concerne un nouveau procédé d'hydrolyse enzymatique des 4-méthylthiobutyronitrile en acide 4-méthylthiobutyrique racémique à l'aide d'une nitrilase d'<i>Alcaligenes faecalis</i>, <i>Rhodococcus sp.</i> HT 29-7 ou de <i>Gordona terrae</i>.		

ONLY FOR INFORMATION

Codes used to identify the PCT member States on the flyleaves of the brochures in which international applications made under the PCT are published.

AT	Austria	KR	Republic of Korea
AU	Australia	KZ	Kazakhstan
BB	Barbados	LI	Liechtenstein
BE	Belgium	LK	Sri Lanka
BF	Burkina Fasso	LU	Luxembourg
BG	Bulgaria	LV	Latvia
BJ	Benin	MC	Monaco
BR	Brazil	MD	Republic of Moldova
BY	Belarus	MG	Madagascar
CA	Canada	ML	Mali
CF	Central African Republic	MN	Mongolia
CG	Congo	MR	Mauritania
CH	Switzerland	MW	Malawi
CI	Ivory Coast	NE	Niger
CM	Cameroon	NL	Netherlands
CN	China	NO	Norway
CS	Czechoslovakia	NZ	New Zealand
CZ	Czech Republic	PL	Poland
DE	Germany	PT	Portugal
DK	Denmark	RO	Romania
ES	Spain	RU	Russian Federation
FI	Finland	SD	Sudan
FR	France	SE	Sweden
GA	Gabon	SI	Slovenia
GB	United Kingdom	SK	Slovakia
GE	Georgia	SN	Senegal
GN	Guinea	TD	Chad
GR	Greece	TG	Togo
HU	Hungary	TJ	Tajikistan
IE	Ireland	TT	Trinidad and Tobago
IT	Italy	UA	Ukraine
JP	Japan	US	United States of America
KE	Kenya	UZ	Uzbekistan
KG	Kyrgyzstan	VN	Vietnam
KP	Democratic People's Republic of Korea		

CLAIMS

1. Process for the preparation of racemic α -substituted 4-methylthiobutyric acids, characterized in that the racemic α -substituted
5 4-methylthiobutyronitriles are hydrolysed by a nitrilase chosen from those of Alcaligenes faecalis ATCC-8750, Rhodococcus sp. HT 29-7 FERM BP-3857 or Gordona terrae FERM BP-4535.
2. Process according to claim 1,
10 characterized in that the racemic α -substituted 4-methylthiobutyronitrile is 4-methylthio-2-hydroxybutyronitrile.
3. Process according to claim 1, characterized in that the pH of the medium is between 4
15 and 11 and preferably between 5 and 9.
4. Process according to claim 1, characterized in that the hydrolysis temperature is between 30 and 60°C and preferably 30 and 50°C.
5. Process according to claim 1,
20 characterized in that the concentration of α -substituted 4-methylthiobutyronitrile in the starting solution is between 10 and 400 mmol and preferably between 50 and 200 mmol per litre.
6. Process according to claim 1,
25 characterized in that the concentration of α -substituted 4-methylthiobutyric acid in the solution is between 10 and 2000 mmol per litre and preferably

AMENDED SHEET



between 100 and 1500 mmol per litre.

AMENDED SHEET

