



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

209251
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 07 H 3/02

(22) Přihlášeno 24 08 62
(21) (PV 4915-62)

(40) Zveřejněno

(45) Vydáno 01 05 83

(75)

Autor vynálezu

KULHÁNEK MILOŠ ing., PRAHA

(54) Způsob výroby L-sorbosy

Vynález se týká způsobu výroby L-sorbosy, důležitého meziprojektu syntézy kyseliny askorbové (vitaminu C).

L-sorbosa se vyrábí fermentačně-bakteriální dehydrogenací D-sorbitu vhodnými druhy octových bakterií, nejčastěji *Acetobacter suboxydans*.

Teoreticky má vzniknout ze 100 dílů sorbitu 98,9 dílu sorbosy. Při fermentaci se zpravidla posuzuje výtěžek podle obsahu sorbosy, vypočítaného na základě stanovení redukcujících cukrů, které jsou vyjádřeny v % sušiny přítomné ve vzorku a stanovené refraktometricky (vodné roztoky D-sorbitu a L-sorbosy o stejné koncentraci mají prakticky stejné indexy lomu). Při této metodě může být zjištěn uvedený teoretický výtěžek; nebere se při tom ovšem v úvahu ztráta sušiny cukrů, způsobená jednak totální disimilací sorbitu, jednak jeho spotřebou jako zdroje uhlíku pro růst bakterií. Tato ztráta se podle zkušeností pohybuje kolem 4–9 %, vztaženo na výchozí množství sorbitu.

Jak bylo prokázáno (Kulhánek, Ševčíková, *Folia microbiologica*, 1962, v tisku), vzniká při fermentaci vedle L-sorbosy v malých množstvích i D-fruktosa a v pokročilejších stadiích ještě i 5-keto-D-fruktosa (5-keto-L-sorbosa) jako vedlejší metabolity, které nežádoucím způsobem snižují výtěžek. Tyto vedlejší metabolity jsou při stanovení sorbosy (podle obsahu redukcujících cukrů) započít-

távány jako sorbosa, což je dalším zdrojem nepřesností při zjišťování výtěžku fermentace. Pro určení výtěžku při výrobě sorbosy je z uvedených důvodů směrodatné pouze množství izolované sorbosy, vztažené na výchozí množství sorbitu.

V souvislosti se studiem podmínek pro zvýšení výtěžků byl vypracován nový způsob výroby L-sorbosy mikrobiální dehydrogenací D-sorbitu v tekuté živné půdě na bázi dusíkatých živin a minerálních živných solí, enzymovým systémem mikroorganismů rodu *Acetobacter*, zejména *Acetobacter suboxydans*, podle vynálezu.

Podstata tohoto způsobu spočívá v tom, že se mikrobiální dehydrogenace provádí v přítomnosti inhibitorů, zabraňujících další enzymatické dehydrogenaci vzniklé sorbosy.

Jako inhibitorů enzymů lze používat fluoridu sodného, 2,4-dinitrofenolu nebo dithiokarbamatů, v koncentraci řádově $1 \cdot 10^{-3}$ až $1 \cdot 10^{-4}$, vztaženo na objem živné půdy.

Příznivý vliv přídavku inhibitorů na zvýšení výtěžku, prokázaný papírovou chromatografií, se projevuje potlačením vedlejších reakcí, zejména tvorby 5-keto-D-fruktosy (5-keto-L-sorbosy).

Při vhodné koncentraci inhibitoru není doba fermentace nepříznivě ovlivňována. Vhodnou koncentrací inhibitoru, u kterého je možná částečná inaktivace reakcí se složkami surovin použitých

k přípravě fermentační půdy, je nutno nalézt pro dané podmínky empiricky (např. u fluoridu sodného možnost reakce s vápenatými sloučeninami kukuřičného extraktu, vodovodní vody apod.). Inhibitory přecházejí při izolaci sorbosy krystalizací do matečných louhů a v izolované sorboze nebyly nalezeny.

Výhodou způsobu podle vynálezu je zvýšení výtěžku izolované sorbosy až o 10% proti kontrole, při minimálně zvýšených nákladech.

Příklady provedení

Příklad 1:

Do 750 ml Erlenmayerovy baňky umístěno 100 ml živné půdy tohoto složení: 0,3 g kukuřičného extraktu, 0,17 sekundárního fosforečnanu amonného, 18,3 g sorbitu a 16,8 mg fluoridu sodného (koncentrace $4 \cdot 10^{-3} \text{M}$). Po sterilizaci měla půda objem 94 ml (obsah sorbitu přepočítaný na 100 ml byl 19,4 g). Ochlazená půda zaočkována 10 ml kultury *Acetobacter suboxydans* 125 (sbírka Mikrobiol. ústavu ČSAV Praha), připravené na půdě stejného složení, ale bez fluoridu sodného, jednodenní stacionární kultivaci při 32 °C (inokulum obsahovalo původně 1,9 g sorbitu). Po 58 hodinách inkubace při 30 °C na reciproké třepačce činilo prokvašení 97%, přičemž obsah sušiny poklesl o 6%. Papírová chromatografie ukázala skvrnu sorbosy a velmi malého množství D-fruktosy. Z roztoku bylo po filtraci vrstvou křemeliny a po zahuštění ve vakuu při 20–25 °C izolováno krystalizací v několika frakcích celkem 17,4 g produktu, obsahujícího 17,0 g 100%ní sorbosy. V matečném louhu zbylo 0,7 g redukujících cukrů, počítáno jako sorbosa. Na analytickou kontrolu průběhu fermentace byly odebrány celkem 4 ml roztoku, obsahujícího 0,8 g výchozího sorbitu. Z celkového množství 19,3 g sorbitu ($18,2 \text{ g} + 1,9 \text{ g} - 0,8 \text{ g}$) bylo tedy izolováno 17,0 g 100%ní sorbosy, což odpovídá výtěžku 88%.

U současně provedeného slepého pokusu, při němž bylo použito živné půdy stejného složení, avšak bez přísady fluoridu sodného, stejného inokula a stejných kultivačních podmínek, činilo po 58 hodinách fermentace prokvašení 98%. Chromatografií dokázána přítomnost sorbosy, malého množství D-fruktosy a 5-keto-D-fruktosy. Pokles obsahu sušiny činil 9%. Isolováno celkem

15,7 g 100%ní sorbosy z 19,6 g výchozího sorbitu (odebrané vzorky obsahovaly 0,5 g sorbitu), tj. 80%. V posledním matečném louhu zbylo 1,2 g redukujících cukrů, počítáno jako sorbosa.

Zvýšení výtěžku izolované sorbosy činilo tedy s použitím fluoridu sodného 8%.

Příklad 2:

Obdobně jako v příkladě 1. provedena fermentace s přidavkem 2,9 mg 2,4-dinitrofenolu (výsledná koncentrace $1,7 \cdot 10^{-4} \text{M}$). Po 58 hodinách kultivace činilo prokvašení 98%, ztráta sušiny 7%. Chromatografií prokázána přítomnost sorbosy a velmi malého množství fruktosy. Isolováno 16,8 g 100%ní sorbosy, a to z 19,5 g výchozího sorbitu (se vzorky bylo odebráno 0,6 g z původního množství sorbitu). Výtěžek činil tedy 86%, vztaženo na sorbit, což odpovídá zvýšení o 6% proti současně provedenému slepému pokusu. V matečném louhu zůstalo 0,5 g redukujících cukrů, počítáno jako sorbosa.

Příklad 3:

100 ml živné půdy, obsahující 0,1 g kukuřičného extraktu, 19,0 g D-sorbitu a 4,2 g fluoridu sodného (koncentrace $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$) zaočkováno po sterilizaci 4 ml kultury *Acetobacter suboxydans* 125, kultivované 2 dny stacionárně při 32 °C na půdě obsahující 20 % sorbitu, 0,5 % pekařského droždí ve formě 20%ního autolyzátu, dále 0,2 % sekundárního fosforečnanu amonného, 0,1 % primárního fosforečnanu draselného a 0,02 % kryst. síranu hořečnatého. Po 65hodinách submersní fermentace bylo dosaženo prokvašení 96 %. Chromatografická analýza prokázala přítomnost sorbosy a malého množství D-fruktosy. Bylo izolováno celkem 16,7 g sorbosy, tj. 16,2 g 100%ní sorbosy z 19,1 g sorbitu ($19,0 \text{ g} + 0,8 \text{ g} - 0,7 \text{ g}$), tj. 85 % vztaženo na výchozí sorbit.

Při slepém pokusu za stejných podmínek činilo prokvašení 96 %. Chromatografií prokázána přítomnost sorbosy, 5-keto-D-fruktosy a malého množství D-fruktosy. Z 19,4 g sorbitu ($19,0 \text{ g} + 0,8 \text{ g} - 0,4 \text{ g}$) izolováno celkem 14,9 g sorbosy, tj. 14,6 g 100%ní sorbosy, což odpovídá výtěžku 75 %, vztaženo na výchozí sorbit. Zvýšení výtěžku izolované sorbosy při fermentaci s přísadou fluoridu sodného činilo tedy 10 %.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby L-sorbosy mikrobiální dehydrogenací D-sorbitu v tekuté živné půdě na bázi dusíkatých živin a minerálních živných solí, enzymovým systémem mikroorganismů rodu *Acetobacter*, zejména *Acetobacter suboxydans*, vyznačující se tím, že se mikrobiální dehydrogenace provádí v přítomnosti inhibitorů, zabraňujících

další enzymatické dehydrogenaci vzniklé sorbosy.

2. Způsob podle bodu 1. vyznačující se tím, že se jako inhibitorů enzymů používá fluoridu sodného, 2,4-dinitrofenolu nebo dithiokarbamatů, v koncentraci řádově $1 \cdot 10^{-3}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{M}$, vztaženo na objem živné půdy.