



Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 07.XI.1968 — (P 129 941)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 25.V.1972

Kl. 12 o, 15

MKP C 07 c 59/38

UKD

Współtwórcy wynalazku: Jadwiga Bełżecka, Stanisław Poradowski, Jerzy Schnayder, Anna Kulpa

Właściciel patentu: Krakowskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa” Przedsiębiorstwo Państwowe, Kraków (Polska)

Sposób wytwarzania kwasu 2-keto-l-gulonowego

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania kwasu 2-keto-l-gulonowego.

Znane są sposoby otrzymywania kwasu 2-keto-l-gulonowego prowadzone przy użyciu bakterii *Pseudomonas*, na przykład *Pseudomonas mildenbergii* (opis patentowy St. Zjedn. Am. 2.421.611).

Według znanych sposobów proces biologicznego utleniania prowadzony jest w roztworach mieszaniny kwasu l-idonowego i d-glukonowego w stosunku wagowym 1:1 o stężeniu substratu 10—20%, co w skali przemysłowej jest uciążliwe ze względu na konieczność operowania dużymi objętościami roztworów, które wymagają dodatkowych operacji zateżnienia w fazie wydzielania produktu końcowego.

Istotę wynalazku stanowi metoda otrzymywania kwasu 2-keto-l-gulonowego z mieszaniny o składzie l-idonian i d-glikonian wapnia w stosunku wagowym 1:1 przez poddanie tej mieszaniny biologicznemu utlenianiu przy pomocy szczepu *Pseudomonas ovalis* posiadającego zespół enzymów zdolnych do przeprowadzenia soli wapniowej kwasu l-idonowego w stężeniach 20—50%, w kwas 2-keto-l-gulonowy przy równoczesnym rozkładzie soli kwasu d-glikonowego.

Bakterie *Pseudomonas ovalis* wydzielane i oznaczane w znany sposób przed poddaniem ich zabiegom sposobem według wynalazku mają cechy odpowiadające danym taksonomicznym dla tego gatunku bakterii i nie posiadają właściwości utlenia-

2

nia mieszaniny kwasu l-idonowego i d-glikonowego w stężeniu 20—50% do kwasu 2-keto-l-gulonowego.

Istotnym elementem sposobu według wynalazku jest to, że w procesie stosuje się uaktywniony szczep *Pseudomonas ovalis*, co pozwala na utlenienie produktu w wysokich stężeniach sięgających do 50%.

Aktywację można stosować również do innych gatunków bakterii na przykład *Pseudomonas mildenbergii* zdolnych do utleniania tego samego produktu.

Aktywację szczepu *Pseudomonas ovalis* prowadzi się przez ich adaptację do podłoża zawierającego jako substrat mieszaninę o składzie l-idonian i d-glikonian wapnia w stosunku wagowym 1:1 i stężeniu 10—20%. Bakterie posiane na podłoże zawierające oba związki, wykorzystują najpierw d-glikonian wapnia, ponieważ dla niego posiadają gotowy aparat enzymatyczny. Po upływie kilku dni bakterie zużywają prawie cały zapas d-glikonianu.

W czasie prowadzenia hodowli przez 30 dni obumiera część osobników, a w hodowli gromadzą się bakterie zdolne do wykorzystania substancji odżywczej l-idonianu o wysokim stężeniu.

Przez wielokrotne pasażowanie na podłożu o wyżej podanym składzie, oraz przez odpowiednie prowadzenie hodowli, bakterie wytwarzają enzymy adaptacyjne, które pozwalają na utlenienie substratu o wysokich stężeniach od 20—50%. Po-

nadto zmodyfikowane szczepy odznaczają się zdolnością do przystosowania do tych wartości pH środowiska, jakie utrzymuje się w czasie trwania reakcji.

Sposób według wynalazku otrzymywania kwasu 2-keto-1-gulonowego polega na tym, że uaktywnione bakterie *Pseudomonas ovalis* zaszczepia się do mieszaniny o składzie 1-idonian i d-glikonian wapnia w stosunku wagowym 1:1, o stężeniu 20—50% otrzymanej po wysokociśnieniowej redukcji 5-keto-glikonianu wapnia.

Uaktywnione bakterie *Pseudomonas ovalis* utleniają substrat do soli wapniowej kwasu 2-keto-1-gulonowego przy równoczesnym rozkładzie obecnego kwasu 2-keto-d-glikonowego. PH pożywki ustala się na poziomie 6,5 i nie jest ono regulowane w czasie biologicznej reakcji utleniania.

Utlennianie prowadzi się metodą głębinową. Ilościowe utlenienie 1-idonianu wapnia do soli wapniowej kwasu 2-keto-1-gulonowego następuje po 38 do 72 godzinach hodowli, a kwas 2-keto-1-gulonowy izoluje się z płynu po utlenieniu przeprowadzając sól wapniową w wolny kwas działaniem kwasu siarkowego.

Stwierdzono, że w miarę wzrostu stężenia substratu w pożywce przedłuża się czas trwania reakcji, jednak przedłużenie tego czasu nie wzrasta proporcjonalnie ze wzrostem stężenia. Czas potrzebny do utlenienia pożywek 30% nie jest nawet dwukrotnie większy od czasu utlenienia substratu o stężeniu 10%.

Równocześnie wyizolowanie wolnego kwasu 2-keto-1-gulonowego jest łatwiejsze i następuje w znacznie skróconym czasie. Dla pożywek o stężeniu 30% czas potrzebny na wyizolowanie kwasu jest trzykrotnie krótszy niż dla pożywek 10%.

Przykład I. Wyizolowane znanymi sposobami bakterie *Pseudomonas ovalis* przeszczepia się na pożywkę agarową o następującym składzie: mieszanina 1-idonian i d-glikonian wapnia w stosunku wagowym 1:1 — 10%, sole mineralne: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,2%, KH_2PO_4 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,025%. Hodowlę bakterii prowadzi się przez trzy dni w temperaturze 30°C a następnie w temperaturze 18°C przez 27 dni.

Po dwóch przesiewach w odstępach 30-dniowych na pożywkę o wyżej wymienionym składzie i parametrach temperatury oraz czasu zwiększa się stężenie substratu w podłożu do 12%.

Po następnych trzech przesiewach zwiększa się stężenie substratu w podłożu do 18% i dokonuje czterech przesiewów.

W komórkach bakterii przesiewanych na podłożu zawierające 20% substratu gromadzi się już dostateczna ilość enzymów do wykorzystania substratu o stężeniu 20—50%.

Uzyskany na tej drodze szczep *Pseudomonas ovalis* MB 1252 o nowych właściwościach, powodujących utlenianie mieszaniny 1-idonianu i d-glikonianu wapnia w stosunku 1:1 o stężeniu 30% substratu, do soli wapniowej kwasu 2-keto-1-gulonowego, przy równoczesnym rozkładzie obecnego

kwasu 2-keto-1-glikonowego, przechowuje się na skosach z pożywką agarową zawierającą 20% mieszaniny 1-idonianu i d-glikonianu wapnia w stosunku wagowym 1:1.

Ze skosu przeszczepia się hodowlę na pożywkę płynną zawierającą 10% mieszaniny 1-idonianu i d-glikonianu wapnia w stosunku wagowym 1:1 oraz sole mineralne.

Hodowlę prowadzi się w termostacie w temperaturze 28°C, stacjonarnie przez 12 dni. Tak przygotowaną hodowlą zaszczepia się pożywkę w kolbach 500 ml stosując 10% inoculum i wytrząsa na wytrząsarce laboratoryjnej przez 72 godziny.

Zawartością kolb zaszczepia się tank fermentacyjny 10 l zawierający 5 l pożywki produkcyjnej zawierającej 30% mieszaniny 1-idonianu i d-glikonianu wapnia w stosunku wagowym 1:1 stosując 10% inoculum o gęstości 12,3 mg/ml pH początkowo ustala się na 6,5 i nie jest ono regulowane w czasie biologicznego utleniania. Do tanku wprowadza się sterylne powietrze w ilości jedna objętość powietrza/objętość pożywki na minutę i miesza z szybkością 240 obrotów na minutę.

Prowadząc w ten sposób proces utleniania przez 68 godzin otrzymuje się sól wapniową kwasu 2-keto-1-gulonowego z wydajnością 99% w stosunku do zawartego w pożywce 1-idonianu wapnia. Kwas 2-keto-1-gulonowy izoluje się z płynu po reakcji utleniania przez zadanie kwasem szczawowym w ilości 155,7 g. Wydzielony szczawian wapnia odsacza się, w próżni podgęszcza się filtrat w temperaturze 33°C do momentu pojawienia się pierwszych kryształów. Po 24 godzinach sący się wydzielony kwas 2-keto-1-gulonowy. Filtrat podgęszcza się jak wyżej i uzyskuje się drugi rzut kryształów. Razem otrzymuje się 570 g kwasu 2-keto-1-gulonowego o zawartości 98% czystej substancji o temperaturze topnienia 165—168°C. Wydajność 85% teorii.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania kwasu 2-keto-1-gulonowego przez biologiczne utlenianie mieszaniny soli kwasu 1-idonowego i d-glikonowego, **znamienny tym**, że stosuje się bakterie *Pseudomonas ovalis* uaktywnione przez adaptację do podłoża zawierającego 10—20% mieszaniny 1-idonianu i d-glikonianu wapnia w stosunku wagowym 1:1 polegającą na wielokrotnym pasażowaniu przy zwiększanych stopniowo stężeniach substratu w odstępach 30 dniowych, przy czym biosyntezę prowadzi się przy stężeniach substratu 20—50% i stosunku wagowym kwasu 1-idonowego do kwasu d-glikonowego 1:1, a uzyskany kwas 2-keto-1-gulonowy wyodrębnia się ze środowiska w znany sposób.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się bakterie uaktywnione i następnie przechowywane na pożywkach stałych lub płynnych zawierających 20% mieszaniny 1-idonianu i d-glikonianu wapnia w stosunku wagowym 1:1 w temperaturze 18°C przesiewając je w odstępach 30-dniowych.