



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

202 743

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 24 05 78

(21) FV 3365-78

(51) Int. Cl.³ C 12 P 7/58

(40) Zverejnené 30 05 80

(45) Vydané 01 06 83

(75)

Autor vynálezu LINEK KAZIMÍR ing. CSc., KUČÁR ŠTEFAN RNDr. CSc., BRATISLAVA,
KULHÁNEK MILOŠ ing. CSc. a TADRA MILAN ing., PRAHA

(54) Spôsob fermentačnej prípravy kyseliny 2-deoxy-D-galaktónovej

1

Vynález sa týka fermentačného spôsobu prípravy kyseliny 2-deoxy-D-galaktónovej /2-deoxy-D-lyxo-hexónovej/.

Kyselina 2-deoxy-D-galaktónová bola dosiaľ pripravená len chemickými metódami. Oxidáciou 2-deoxy-D-galaktózy brómom pripravili W. G. Overend, F. Shafizadeh a M. Stacey /j. Chem. Soc., 1950, 671/ α -laktón kyseliny 2-deoxy-D-galaktónovej. Pri chemickom spôsobe oxidácie aldóz používané oxidačné činidlo - bróm spôsobuje komplikácie pri jeho použití vo výrobe a príprava kyseliny 2-deoxy-D-galaktónovej je ekonomicky nevýhodná.

Uvedené nevýhody prípravy kyseliny 2-deoxy-D-galaktónovej odstraňuje vynález, ktorého podstata spočíva v tom, že 2-deoxy-D-galaktóza sa biochemicky dehydrogenuje na kyselinu 2-deoxy-D-galaktónovú pôsobením dehydrogenázových systémov buniek baktérií rodu *Gluconobacter*, s výhodou kmeňom *Pseudomonas aeruginosa* IEM Ps 5/40 za prítomnosti kyslíka, pričom sa buňky získajú aeróbnym rastom na živnej pôde obsahujúcej okrem 2-deoxy-D-galaktózy fyziologický cukor, s výhodou D-glukózu, alebo sa narastlé a izolované buňky aeróbne inkubujú s roztokom 2-deoxy-D-galaktózy v prítomnosti konzervačného činidla pH pôdy alebo roztoku 2-deoxy-D-galaktózy sa udržiava v rozmedzí 4 až 8, s výhodou 5 až 6 priebežnou neutralizáciou vznikajúcej kyseliny 2-deoxy-D-galaktónovej.

Experimentálne sa zistilo, že 2-deoxy-D-galaktóza nie je vhodná ako zdroj uhlíka

202 743

pre rast použitých mikroorganizmov. Pri fermentačnom postupe, t.j. rastom buniek za prítomnosti 2-deoxy-D-galaktózy, je treba pridať do živnej pôdy malé množstvo fyziologického, t.j. dobre asimilovateľného cukru. Fermentáciu je nutné viesť asepticky. Pri transformačnom postupe sa buňky /biomasa/ pripraví kultiváciou na vhodnej pôde, izolujú sa odstreďovaním a po premytí sa dehydrogenácia prevedie inkubáciou roztoku 2-deoxy-D-galaktózy s prísadou D-chloramfenikolu alebo iného konzervačného prostriedku. Vznikajúcu kyselinu je treba v oboch prípadoch neutralizovať prísadou nerozpustného uhličitanu, automatickým dávkovaním hydroxidu alebo rozpustného uhličitanu a pod.

V pokusoch prevedených za účelom výberu vhodného mikroorganizmu sa zistilo, že z troch skúšaných kmeňov /*Aspergillus niger*, *Acetomonas oxydans*, *Pseudomonas aeruginosa*/ je pre prípravu kyseliny 2-deoxy-D-galaktónovej najvhodnejší *Pseudomonas aeruginosa*.

Výhodou fermentačného spôsobu prípravy kyseliny 2-deoxy-D-galaktónovej oproti doteraz používaným chemickým metódam je

- fermentačný spôsob výroby je ekonomickejší než chemický,
- získava sa kryštalický β -laktón kyseliny 2-deoxy-D-galaktónovej o vysokej čistote a 62,7 % -ným výťažkom,
- pri chemickom spôsobe oxidácie aldóz sa používa bróm a toto agresívne oxidačné činidlo spôsobuje komplikácie pri jeho použití vo výrobe; pri fermentačnom spôsobe výroby tieto problémy nevznikajú.

Kyselina 2-deoxy-D-galaktónová má uplatnenie ako vzácna chemikália v chémii a biochémii sacharidov.

Príklad 1

Aspergillus niger NRRL 3 /zbierka USA-Northern Utilization Research and Development Division, US. Department of Agriculture, Peoria, III., USA/ sa udržiaval na sladidinových šikmých agaroch. *Acetomonas oxydans* CCM 2370 a CCM 1784 /čs. zbierka mikroorganizmov, Universita J. E. Purkyně, Brno, Obránců míru 10/ a *Pseudomonas aeruginosa* IEM Ps 5/40 /čs. zbierka mikroorganizmov, Epidemiologický a mikrobiologický institut, Praha/ sa udržiavali a pripravovali k fermentácii spôsobom popísaným v literatúre /M. Kulhánek, Chem. Listy, 47 /1953/ 1081; M. Kulhánek, M. Tarda, J. Pacák, H. Trejbalová, M. Černý, Folia Microbiol., 22 /1977/ 295/. 2-deoxy-D-galaktóza sa pripravila z D-galaktálu /F. Shafizadeh, Methods Carbohydr. Chem., 1 /1962/ 190/.

Pri výbere mikroorganizmu sa použilo 2 ml pôdy, ktorá obsahovala v 100 ml 2 g 2-deoxy-D-galaktózy, 0.02 až 0.05 g D-glukózy, autolyzát z 2.5 pekárskeho droždia a 0.7 g uhličitanu vápenatého. Pôdy boli v 15 ml kónických baňkách s kovovými uzávermi.

Preparačné pokusy sa uskutočnili v objemoch 100 až 1000 ml a to buď fermentačne /rastom kultúry v živnej pôde rovnakého zloženia ako bola použitá k výberu kmeňom/ alebo pôsobením biomasy.

V prípade pôsobenia biomasy bola zo šikmých agarov zaočkovaná pôda o objeme 2500 ml

/obsahujúca v 100 ml 5 g D-glukonanu vápenatého a autolyzát z 2.5 g pekárskeho droždía/ umiestnená v 10 l varnej baňke s vatovým uzáverom. Po 2 dňoch inkubácie na trepačke sa biomasa odstredila /cca 4000 ot./min., laboratórna odstredivka Chirana o objeme kyviet 200 ml/ a 2 razy premyla rovnakým objemom sterilnej demineralizovanej vody. Izolovaná biomasa sa pridala do roztoku /1000 ml/ obsahujúceho 21.4 g 2-deoxy-D-galaktózy, 50 mg D-chloramfenikolu a 7 g uhličitanu vápenatého; roztok bol umiestnený vo varnej baňke /6 l/ s vatovým uzáverom.

Príklad 2

K izolácii 2-deoxy-D-galaktónovej kyseliny sa spracovali spojené pokusy, v ktorých sa sfermentovalo celkovo 23.4 g 2-deoxy-D-galaktózy. Spojené sfermentované pôdy sa sfiltrovali filtračnou doskou Carlson/Ford EK 3824. Vápnik sa zachytil na katexe /Wofatit KPS 200 /H⁺// a roztok sa za zníženého tlaku odparil do sucha; odparok sa rozpustil za zahrievania v acetóne /100 ml/. Ochladením sa vylúčili balastné látky, ktoré sa odfiltrovali a filtrát sa znovu odparil do sucha. Vzniklý sirup sa rozpustil za zahrievania v acetóne /10 ml/, ochladil, zaočkoval a uložil na 3 dni do chladničky. Vykryštalizovaný μ -laktón kyseliny 2-deoxy-D-galaktónovej mal t. t. 94 - 95 °C a $[\alpha]_D^{20}$ -33.7° /c 1.6; voda/.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Spôsob fermentačnej prípravy kyseliny 2-deoxy-D-galaktónovej vyznačujúci sa tým, že 2-deoxy-D-galaktóza sa biochemicky dehydrogenuje na kyselinu 2-deoxy-D-galaktónovú pôsobením dehydrogenázových systémov buniek baktérií rodu Gluconabacter, s výhodou kmeňom Pseudomonas aeruginosa IEM Ps 5/40 za prítomnosti kyslíka, pričom sa buňky získajú aeróbnym rastom na živnej pôde obsahujúcej okrem 2-deoxy-D-galaktózy fyziologický cukor, s výhodou D-glukózu, alebo sa narastlé a izolované buňky aeróbne inkubujú s roztokom 2-deoxy-D-galaktózy v prítomnosti konzervačného činidla.
2. Spôsob podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa pH pôdy alebo roztoku 2-deoxy-D-galaktózy udržiava v rozmedzí 4 až 8, s výhodou 5 až 6 priebežnou neutralizáciou vznikajúcej kyseliny 2-deoxy-D-galaktónovej.