

(19) DANMARK



(12) PATENTSKRIFT

(11) 171744 B1

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 5474/88

(22) Indleveringsdag: 30 sep 1988

(41) Alm. tilgængelig: 02 apr 1989

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 28 apr 1997

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 01 okt 1987 DE 3733157

(51) Int.Cl.6

C 12 P 7/40

/(C 12 P 7/40,

C 12 R 1:02)

(73) Patenthaver: *BASF Aktiengesellschaft; Carl-Bosch-Strasse 38; D-W 6700 Ludwigshafen, DE

(72) Opfinder: Bryan *Cooper; DE

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard, Lehmann & Ree A/S

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af pyrodruesyre

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

5474-88

Fremgangsmåde til fremstilling af pyrodruesyre ved mikrobiologisk oxidation af D-(-)-mælkesyre.

Fremgangsmåden er let og økonomisk at gennemføre.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af pyrodruesyre og salte heraf.

5 Pyrodruesyre er et værdifuldt mellemprodukt ved kemiske synteser f.eks. til fremstilling af farmaceutika, plante- beskyttelsesmidler, polymere og levnedsmidler. Det er derfor naturligt, at der har været foretaget adskillige forsøg på at finde tekniske fremstillingsmetoder. Da py-
10 rodruesyre er en central metabolit i alle mikroorganis- mers stofskifte, kan det ikke undre, at man først og fremmest har rettet interessen mod enzymatiske metoder og forgæringsmetoder.

15 Mange af de beskrevne bioteknologiske fremstillingsmeto- der sigter på at omdanne en egnet carbonkilde til pyro- druesyre. Det har længe været velkendt, at forskellige mikroorganismer kan danne pyrodruesyre. Således beskriver Biquet et al., (Chem. Abstr. 58, 14463 e (1963)) dannelsen af pyrodruesyre ved hjælp af forskellige gær-
20 svampe af slægten *Candida*. En lignende iagttagelse blev gjort af Kretovich et al., med en stamme af svampen *Candida tropicalis* (Chem. Abstr. 62, 6832 a (1965)). Anven- delsen af en stamme af arten *Acetobacter suboxydans* til direkte fremstilling af pyrodruesyre ud fra D-glucose
25 blev beskrevet af Abe og Seito (Chem. Abstr. 63, 12285 b (1965)). Anvendelsen af svampestammer af slægten *Mucor* til fremstilling af pyrodruesyre ud fra glucose er lige- ledes velkendt (J. Exptl. Botany 16, 487 (1965)). Omdan- nelsen af paraffiner til pyrodruesyre og 2-oxoglutarsyre
30 med forskellige mycobacterium-stammer er angivet (Chem. Abstr. 64, 16312 b (1966)). Anvendelsen af en corynebac- terium-stamme til fremstilling af pyrodruesyre ud fra D- gluconsyre er beskrevet (Chem. Abstr. 70, 86273 w (1969)). Omdannelsen af kortkædede fedtsyrer til pyro-
35 druesyre ved hjælp af forskellige stammer af slægten *No- cardia*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* eller *Candida* er beskrevet af Maeyashiki og

Okada (Chem. Abstr. 82, 123305 d (1975)). En lignende opfindelse under anvendelse af kortkædede fedtsyreamider med stammer af samme slægt er beskrevet (Chem. Abstr. 82, 153737 p (1975)). En fremgangsmåde til fremstilling af pyrodruesyre ud fra D-gluconsyre med stammen *Nocardia fumifera* eller *Pseudomonas tabati* er beskrevet af Uchio og Hirose (Chem. Abstr. 83, 204815 t (1975)). En fremgangsmåde til fremstilling af pyrodruesyre ud fra D-glucose med en thiamin- og L-methionin-afhængig mutant af *Candida lipolytica* er beskrevet af Uchio et al., (Chem. Abstr. 84, 178212 t (1976)). En fremgangsmåde til fremstilling af pyrodruesyre ud fra glycerol med en stamme af arten *Xanthomonas campestris* blev beskrevet af Behrens og Fiedler (DD 135 213 (1979)). Omdannelsen af citrusfrugtskalleaffald til pyrodruesyre ved hjælp af svampen *Debaryomyces coudertii* er beskrevet af Moriguchi (Agric. Biol. Chem. 46, 955 (1982)). Dannelsen af pyrodruesyre ud fra D-glucose ved hjælp af basidiomyceten *Schizophyllum commune* blev beskrevet af Takao og Tanida (J. Ferment. Technol. 60, 277 (1982)). En fremgangsmåde til fremstilling af pyrodruesyre ud fra D-glucose med *Agaricus campestris* er beskrevet af Takao (Chem. Abstr. 98, 15498 r (1983)). Izumi og Matsumura beskriver acinetobacterstammer, der omdanner 1,2-propandiol til pyrodruesyre (Agric. Biol. Chem. 46, 2653 (1982)). Omsætningen af vinsyre til pyruvat med *Pseudomonas putida* er beskrevet af Miyata et al. (Chem. Abstr. 104, 205568 d (1986)).

Alle disse mikroorganismer er imidlertid hverken tilgængelige for offentligheden eller egner sig kun dårligt til teknisk produktion, da de kun frembringer pyrodruesyre i små koncentrationer eller med ringe udbytte, udover at der hyppigt dannes en eller flere andre syrer. Derfor er en økonomisk fremstilling ikke mulig.

Det er ligeledes beskrevet, at man ved hjælp af mikroorganismer kan overføre racemisk mælkesyre oxidativt til

pyrodruesyre. Abe og Saito (Chem. Abstr. 58, 5737 d (1963), 6760 (1963)) beskriver anvendelsen af ikke offentligt tilgængelige bakteriestammer til oxidation af racemisk mælkesyre. Disse egner sig imidlertid dårligt til fremstilling af pyrodruesyre, da de kun danner det ønskede slutprodukt i utilstrækkelige mængder (mellem 27% og 52%). Herudover er betydelige mængder glucose, pepton og kødekstrakt nødvendig for at kunne opnå den nødvendige cellemasse til omsætningen. Sådanne kostbare bestanddele forhindrer en økonomisk fremstilling af pyrodruesyre.

En teknisk metode til fremstilling af pyrodruesyre er ikke tidligere blevet beskrevet.

Der er derfor et behov for en økonomisk, teknisk anvendelig fremgangsmåde til fremstilling af pyrodruesyre.

Man har nu fundet en mikroorganisme, der er i stand til med højt rum-tidsudbytte at overføre optisk ren D-(-)-mælkesyre kvantitativt til pyrodruesyre i et billige næringssubstrat.

Opfindelsen tilvejebringer således en fremgangsmåde til fremstilling af pyrodruesyre og salte heraf der er ejendommelig ved at man dyrker bakterien *Acetobacter spec. ATCC 21409* under aerobe betingelser i nærvær af D-(-)-mælkesyre.

D-(-)-mælkesyre kan let på i og for sig kendt måde fremstilles ud fra glucose.

Acetobacter spec. ATCC 21409 er deponeret i American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA og er frit tilgængeligt.

For at gennemføre den omhandlede fremgangsmåde podes stammen *Acetobacter spec. ATCC 21409* på et D-(-)-mælke-

syreholdigt næringssubstrat og inkuberes deri. Forgæringen kan ske kontinuert eller diskontinuert. Man lader stammens celler direkte indvirke på substratet. Der kan anvendes passende velkendte inkubationsmetoder, særligt foretrukken er anvendelsen af fermentorer i form af dybe, gennemluftede og omrørte tanke. Særlige gode resultater opnås ved anvendelse af et flydende næringssubstrat.

Udvælgelsen af næringssubstratet til dyrkning af mikroorganismen er ikke kritisk, dog bør af hensyn til forbedret økonomi særligt anvendes prisbillige substratbestanddele. Velegnede næringssubstrater indeholder carbonkilder, nitrogenkilder, uorganiske salte og eventuelt ringe mængder sporstoffer og vitaminer. Som nitrogenkilder kan anvendes uorganiske eller organiske nitrogenkilder eller materialer, der indeholder sådanne forbindelser. Eksempler herpå er ammoniumsalte, majsstøbevæske, ølgærautolysat, sojabønnehydrolysat, hvedegluten, gærekstrakt, gær, urinstof og katoffelprotein. Særligt fordelagtig er anvendelsen af majsstøbevæske. Som carbonkilder kan anvendes D-glucose, mannose eller galactose, polyalkoholer som mannit eller alkoholer som ethanol.

Eksempler på uorganiske salte er salte af calcium, magnesium, mangan, kalium, zink, kobber, jern og andre salte. Som anion af saltene skal specielt nævnes phosphationen. Eventuelt tilsættes næringssubstratet vækstfaktorer som f.eks. pantotensyre, p-aminobenzosyre og thiamid. Blandingsforholdet af nævnte næringsstoffer afhænger af forgæringens art og fastlægges i hvert enkelt tilfælde.

Sædvanligvis egner en D-(-)-mælkesyrekoncentration på ca. 1-100 g/l fortrinsvis på 10-50 g/l sig til gennemførelse af den omhandlede fremgangsmåde.

Dyrkningsbetingelserne fastlægges således, at man opnår de bedst mulige udbytter. Foretrukne dyrkningstemperatu-

rer ligger fra 24 til 32 °C, fortrinsvis fra 26 til 30 °C. pH-værdien ligger i området fra 5 til 8, fortrinsvis 6-8. Sædvanligvis er en inkubationstid på fra 8 til 48 timer tilstrækkelig. I løbet af dette tidsrum opnås den maksimale mængde af det ønskede slutprodukt i substratet. Det er en fordel at følge mængden af den dannede pyrodruesyre i dyrkningssubstratet og afbryder reaktionen, når mængden af pyrodruesyre har nået maksimum.

10 Der skal sørges for en tilstrækkelig gennemluftning, da reaktionen kun ved tilstrækkelig tilførsel af oxygen forløber med stor hastighed og med godt udbytte.

15 Den nødvendige mængde D-(-)-mælkesyre kan tilsættes substratet fra begyndelsen eller tilsættes under dyrkningen i flere portioner. Det som substrat nævnte D-(-)-mælkesyre tilsættes substratet som salt. Til dette formål kan f.eks. anvendes natrium-, calium-, ammonium- og calciumsalte af D-(-)-mælkesyre. Specielt fordelagtigt er anvendelsen af calciumsaltene.

25 Den dannede og i substratet udskildte pyrodruesyre kan herefter måles på i og for sig kendt måde. Til dette formål er en enzymatisk påvisningsmetode fordelagtig. Pyrodruesyren eller saltet heraf kan fraskilles på i og for sig kendt måde og renses. Til dette formål egner sig f.eks. basiske ionbyttere. Alternativt kan forgæringsbouillonnen inddampes i vakuum, og slutproduktet kan bringes til ukrySTALLISATION ved afkøling. De således opnåede krystaller kan fraskilles ved centrifugering og tørres.

35 I det tilfælde hvor pyrodruesyren skal anvendes uden oparbejdning,, er det tilstrækkeligt, at dræbe mikroorganismen *Acetobacter spec. ATTC 21409* i reaktionsblandingen for at forhindre en yderligere omsætning af slutproduktet. Dette kan f.eks. ske ved tilsætning af 0,1% n-oc-

tanol og opvarmning til 45 °C i 30 min. Alternativt kan
forgæringsbouillon beries for mikroorganismer ved
almindelig sterilfiltrering. Disse forgæringsbouilloner
bør ved passende foranstaltninger som f.eks. afkøling
beskyttes mod mikrobiel kontamination.

Følgende eksempler belyser opfindelsen nærmere:

EKSEMPEL 1

Fremstilling af en stamkultur

Der fremstilledes et fast næringssubstrat (substrat A),
der indeholdt følgende bestanddele:

D-(-)-mannit	10	g/l
ammoniumsulfat	5	g/l
magnesiumsulfat-7-hydrat	0,5	g/l
mangansulfat-1-hydrat	0,05	g/l
gærekstrakt	0,05	g/l
pepton	0,05	g/l
kaliumdihydrogenphosphat	1,5	g/l
dikaliumhydrogenphosphat	3,6	g/l
agar	20	g/l
vand	ad	1 liter

Phosphatsaltene steriliseres separat fra resten af sub-
stratet (20 min. ved 121 °C) og tilsættes efter afkøling.
Substratet pH-værdi er 7.

Celler af mikroorganismen *Acetobacter spec.* ATTC 21409
blev fortyndet decimalt og spredt på fast næringssub-
strat. Efter 48 timers inkubation med 28 °C forekom ved
tilsvarende fortynding enkeltkolonier. Enkelte kloner
blev udtaget og hver dyrket i 20 ml (i sterilt 100 ml Er-
lenmeyerkolber) forkultursubstrat (= substrat B):

D-(-)mannit	10 g/l
gærekstrakt	5 g/l
magnesiumsulfat-7-hydrat	0,5 g/l
vand	ad 1 liter

5

Ingen pH-regulering, sterilisering i 20 min. ved 121 °C.

Inkubationen af denne forkultur blev foretaget ved 28 °C i en almindelig tilgængelig rysteinkubator ved 250 omrystninger pr. min. i 16 timer.

10

For at undersøge biotransformationsevnen blev 20 ml af substrat C fyldt i sterile 100 ml Erlenmeyerkolber med vatpropper.

15

Substrat C:

D-(-)mannit	10 g/l
majsstøbevæske	40 g/l
D-(-)mælkesyre (calciumsalt)	10 g/l
	(beregnet som frie syrer)

20

pH 7 med 5 M NaOH

Sterilisering ved 121 °C i 40 min.

25

2 ml af forkulturene blev podet på dette substrat. Blandingen blev inkuberet under rystning ved 28 °C og 250 omrystninger pr. min. Koncentrationen af D-(-)-mælkesyre og pyrodruesyre blev bestemt ved hjælp af en almindelig tilgængelig enzymatisk forsøgsmetode. Efter 5 timers forløb var som regel 100% af det tilsatte D-laktat omsat. Koncentrationen af pyrodruesyre var mindst 10 g/l. En koloni, der var i stand til dette, blev dyrket yderligere og lyophiliseret på i og for sig kendt måde. Dette materiale tjente som podemateriale til alle yderligere forsøg.

30

35

EKSEMPEL 2Forgæring i rystekolber

5 100 ml af substrat C fyldtes i en 1000 ml Erlenmeyerkolbe med vatprop og steriliseredes. Som kontrol anvendes 100 ml af det samme næringssubstrat dog med 10 g/l L-(+)-mælkesyre (natriumsalt, beregnet som syre). Begge kulturer blev podet med 10 ml af en forkultur således som beskrevet i eksempel 1. Inkubationen skete ved 28 °C og 250 omrystninger pr. min. i en rysteinkubator. Med 60 min. mellemrum blev udtaget prøver, og indholdet af pyrodruesyre bestemtes. Resultaterne er angivet i nedenstående tabel.

15 Pyrodruesyrekoncentration (g/l)

Tid (timer)	Blanding med tilsætning af D-laktat	Blanding med tilsætning af L-laktat
20	0,0	0,0
	1,0	0,8
	2,0	1,4
	3,0	1,2
25	4,0	0,9
	5,0	0,7

30 Analysen af forgæringsbouillon efter 5 timers forløb viste, at D-(-)-mælkesyren var fuldstændig omsat. L-(+)-mælkesyren var derimod stadig fuldstændig tilstede. Den i blandingen dannede pyrodruesyrer stammer fra oxidationen af den med majsstøbevæskens tilførte D-mælkesyre. Dette forklarer også den næsten for høje koncentration af pyrodruesyre i blandingen med D-(-)-mælkesyre.

EKSEMPEL 3Pyrodruesyredannelse i fermentor

- 5 En 1 liters fermentor blev fyldt med 900 ml af substrat C, dog med 20 g/l D-mælkesyre (calciumsalt) og steriliseret. Som forkultur anvendtes 100 ml af en 12 timer gammel kultur af stammen *Acetobacter spec.* ATCC 21409 på substrat B, hvis fremstilling er beskrevet i eksempel 1.
- 10 Forgæringen blev foretaget ved 28 °C med en beluftningsgrad på 0,5 rumfang/minut og en omrøringshastighed på 1000 omdrejninger pr. minut. Der anvendtes intet skumdæpende middel.
- 15 Efter 9 timers forløb var koncentrationen af pyrodruesyre (bestemt enzymatisk) 19,6 g/liter.

20

25

30

35

P a t e n t k r a v :

5 Fremgangsmåde til fremstilling af pyrodruesyre og salte
heraf, k e n d e t e g n e t ved, at man dyrker bakteri-
en Acetobacter spec. ATCC 21409 under aerobe betingelser
i nærværelse af D-(-)-mælkesyre.

10

15

20

25

30

35