

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

289 404

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2000 - 4105

(22) Přihlášeno: 06.11.2000

(40) Zveřejněno: 16.01.2002
(Věstník č. 1/2002)

(47) Uděleno: 15.11.2001

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 16.01.2002
(Věstník č. 1/2002)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 1/20

//(C 12 N 1/20, C 12 R 1:365)

(73) Majitel patentu:

BCS ENGINEERING A.S., Brno, CZ;

(72) Původce vynálezu:

Rosenberg Michal, Brno, CZ;
Hronská Helena, Povážská Bystrica, SK;
Krištofiková Ľudmila, Bratislava, SK;

(74) Zástupce:

Sedlák Zdeněk Ing., Mendlovo nám. 1a, Brno,
60300;

(54) Název vynálezu:

Kmen mikroorganismu Nocardia sp.

(57) Anotace:

Nový kmen mikroorganismu Nocardia sp. produkující
kyselinu L(+)-vinnou zvýšenou rychlostí.

CZ 289404 B6

Kmen mikroorganismu Nocardia sp.Oblast techniky

5

Vynález se týká nového kmene mikroorganismu Nocardia sp, produkujícího kyselinu L(+)-vinnou.

10

Dosavadní stav techniky

Kyselina vinná (kyselina 2,3-dihydroxybutandiová, $C_4H_6O_6$, $M_r=150,09$) se v současnosti připravuje izolací z vinného kamene působením silných minerálních kyselin. Množství takto získané kyseliny vinné je však omezeno dodávkami základního materiálu, které jsou nestálé a omezené. Jiné chemické postupy umožňují připravit jen D,L-formu kyseliny vinné, která má však menší rozpustnost v porovnání s přírodní L-formou kyseliny vinné, což brání jejímu širšímu využití. Navíc, izolace L-formy z racemické směsi běžnými technikami je velmi nákladná. Kyselina vinná se přirozeně nachází v různých druzích ovoce, hlavně v hroznech a je nejdůležitější kyselinou v moštích a ve víně. Z komerčního hlediska patří tato kyselina mezi atraktivní produkty, což dokazuje široké spektrum jejího použití v nerozmanitějších průmyslových odvětvích, nejvíce však v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Přibližně 50 % z celkového množství se používá v potravinářském průmyslu jako okyselovadlo do nealkoholických nápojů a šumivých prášků, ochucovadlo v cukrovinkách, želatině, kandovaném ovoci a podobně. V pekařském průmyslu se při výrobě chleba a pečiva přidávají do těsta jako emulgátory směsné acylglyceroly s kyselinou diacetylvinnou, čímž se prodlužuje jejich trvanlivost. Svoje uplatnění má také v lékařství jako složka některých preparátů, například Etanbutol, Naproxen, Metaprolol, šumivé prášky na pročištění organismu apod. Technická kyselina vinná, směs opticky aktivních a inaktivních forem, se využívá hlavně ve fotografickém, keramickém, metalurgickém a textilním průmyslu. Kyselina vinná se vyskytuje ve čtyřech různých modifikacích. Kyseliny D- a L-vinné vykazují optickou aktivitu, racemická kyselina (D,L)-vinná a kyselina mezovinná jsou opticky inaktivní.

35

Chemicky je možno připravit kyselinu (D,L)-vinnou například oxidací kyseliny fumarové nebo maleinové za přítomnosti katalyzátoru, kterým může být například palladium, vanad nebo wolfram. (Petritsch, K., Korl, P.: Pat. DE. 2555699, Lewis, D. F., Rodriguez, P.A.B.: Pat. GB 1442748).

40

Biotechnologické postupy odstraňují nedostatky chemické syntézy a umožňují přípravu přírodní L(+)-formy kyseliny vinné. V současnosti je známa mikrobiální příprava kyseliny L(+)-vinné prostřednictvím bakterií, přičemž jako substrát mohou být použity sacharidy, kyselina 5-keto-D-glukanová nebo kyselina epoxyjantarová. V bakteriálních fermentacích se sacharidickými substráty dominují kmeny z rodu Acetobacter (Bhat H. K., Qazi, G. N.: Research and Industry 31, 1986, s. 148-152). Kyselina 5-keto-D-glukanová je vhodným substrátem pro přípravu kyseliny vinné pomocí bakterií Pseudomonas fluorescens (Miall, L. M.: Organic acids 2, 1. ed. London, Academic Press, 1978). Kontinuální fermentace, využívající tyto kmeny, nepřinesla očekávané výsledky, protože výsledné koncentrace kyseliny vinné byly nízké a kromě hlavního produktu vznikaly i produkty vedlejší, zejména kyselina glykolová, která má inhibiční účinek na růst bakterií.

50

Schopnost produkce L(+)-formy kyseliny vinné biokonverzí z kyseliny cis-epoxyjantarové byla popsána u některých kmenů z rodu Achromobacter, Alcaligenes, Acinetobacter, Rhizobium a Nocardia. Pat. JP 140683/75 a Pat. DE 2517941 pojednávají o schopnosti bakterií patřících do rodů Achromobacter a Alcaligenes produkovat enzym, který konvertuje kyselinu cis-epoxy-

jantarovou na kyselinu L(+)-vinnou. Byly vyvinuty tři podobné postupy biochemické konverze kyseliny cis-epoxyjantarové, resp. jejích solí na kyselinu L(+)-vinnou, využitím bakteriálních kmenů z rodu *Nocardia*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* a *Pseudomonas* (Miura, I. a kol.: Pat. DE 2605921, Kamatani, Y. a kol.: Pat. DE 2600589, Kamatani, Y. a kol.: Pat. DE 2619311). Dobré výtěžky kyseliny L(+)-vinné byly dosaženy především použitím bakterií z rodu *Nocardia*. Zjistilo se, že některé kmeny rodu *Nocardia* jsou schopny produkovat enzym cis-epoxyjantarohydrolázu, který dokáže konvertovat kyselinu cis-epoxyjantarovou na kyselinu vinnou, přičemž má tento enzym vyšší katalytickou aktivitu při štěpení a hydrolýze epoxidového kruhu v porovnání s izolovanými hydrolázami rodu *Alcaligenes* a *Achromobacter*. Dobré produkční schopnosti byly popsány u kmene *Nocardia tartaricans* ATCC 31191, jejichž výsledkem byla biokonverze takřka bez vzniku vedlejších produktů za použití volných, vysušených nebo imobilizovaných buněk, bezbuňkových extraktů z těchto buněk, případně použitím purifikované cis-epoxyjantarohydrolázy. U inaktivních buněk byl popsán pozitivní účinek povrchově aktivních látek na rychlost biokonverze cis-epoxyjantar - vinan (Miura, Y. a kol., Pat. US 4017362).

Kyselina cis-epoxyjantarová se lehce připraví chemickou syntézou například epoxidací malein-anhydridu, kyseliny maleinové, resp. jejích derivátů účinkem peroxidu vodíku a za přítomnosti wolframu nebo molybdenanu jako katalyzátoru (Olupide J. O. a kol.: J. Chem. Tech. Biotechnol. 55, 1992, strany 103 až 109). Na indukcii cis-epoxyjantarohydrolázy v buňkách se přidávají do kultivačního média soli cis-epoxyjantarů v koncentraci 0,1 až 5 hmotn. %, max. 10 hmotn. %. Vyšší koncentrace způsobují inhibici růstu bakterií, ale je možné je použít v případě, že buňky budou přeneseny do nerůstových podmínek, kde probíhá konverze cis-epoxyjantarů na kyselinu L(+)-vinnou.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je nový kmen mikroorganismu *Nocardia* sp. NT 24, produkující kyselinu L(+)-vinnou, uložený v České sbírce mikroorganismů v Brně, ČR pod označením CCM 4837/A.

Uvedený nový kmen byl připraven z rodičovského kmene *Nocardia tartaricans* ATCC 31191 nejprve chemickou mutací vegetativních buněk pomocí N-nitro-N-nitrozoguanidinu a následně pak pasážováním takto získaných mutantů v tekutých a na tuhých kultivačních médiích s vyšší koncentrací kyseliny cis-epoxyjantarové. Tento cyklus pasážování na tuhých a tekutých médiích byl u producenta s nejvyšší specifickou aktivitou cis-epoxyjantarohydrolázy vícenásobně opakován, až byl získán producent se standardními produkčními schopnostmi, označený jako *Nocardia* sp. NT 24 (producent). Tento kmen je uložen v České sbírce mikroorganismů v Brně, ČR pod označením CCM 4837/A.

Hlavní výhodou nového kmene je překvapivá vysoká rychlost produkce kyseliny L(+)-vinné, která je způsobena alespoň dvojnásobnou a vyšší specifickou aktivitou cis-epoxyjantarohydrolázy v buňkách *Nocardia* sp. NT 24 ve srovnání se specifickou aktivitou téhož enzymu v buňkách rodičovského kmene *Nocardia tartaricans* ATCC 31191 za analogických reakčních podmínek. Další výhodou je získání maximální objemové výtěžnosti nosiče při imobilizaci producenta na nosič, což umožňuje snížit fermentační objemy potřebné pro přípravu biomasy bakterií při použití volných buněk a podobně. Další výhodou je vícenásobné použití buněk *Nocardia* sp. NT 24 v opakovaných konverzích, při šetrné permeabilizaci buněk, což náklady na přípravu producenta ještě snižuje.

Nový kmen *Nocardia* sp. NT 24 roste dobře na běžných tuhých kultivačních médiích, jako jsou MPA, GTKA. Na YG agaru (R. Atlas: Handbook of microbial media. 2. vydání CRC Press, 1997) tvoří po 48 hodinách kultivace (28 °C) kolonie s nepravidelným zoubkovitým okrajem.

Kolonie je zbarvená oranžově, neprůsvitná s jemně granulovaným povrchem, starší kolonie jsou zabarveny intenzivněji. Mladé buňky tvoří tyčinky (2 až 10 μm), tvoří vzdušné mycelium, u starších buněk jsou tyčinky kratší až kokoidního tvaru. Buňky tvoří spory a jsou gram-pozitivní.

5

V průběhu přípravy buněk se využívají míchané reaktory umožňující aeraci média. Kultivace se provádí 20 až 48 hodin a po fermentaci se buňky odseparují pro vlastní biokonverzi. K biokonverzi se použije médium s obsahem 5 až 40 hmotn. % kyseliny cis-epoxyjantarové anebo jejích solí. Produktem biokonverze je pak kyselina L(+)-vinná ve formě odpovídajících solí. Po skončení biokonverze se produkt izoluje z reakční směsi například odstraněním buněk odstředěním a zahuštěním filtrátu. Kyselinu L(+)-vinnou je možné například vysrážet po přidavku vápenatých iontů ve formě vlnanu vápenatého a následně připravit kyselinu L(+)-vinnou po přidavku minerálních kyselin standardními postupy. Základní charakteristiky kyseliny L(+)-vinné je možné například ověřit Rf papírovou chromatografií, měřením IČ spektra, NMR-spektra, stupně otáčivosti a elementární analýzou.

15

Příklady provedení vynálezu

20

Příklad 1

Připraví se 50 ml kultivačního média v 500 ml kultivační baňce (sterilizace 20 minut při 121 °C). Kultivační médium obsahuje v 1 litru destilované vody masový extrakt 3 g, pepton 5 g, NaCl 3 g, KH_2PO_4 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g (pH 7,0). Takto připravené médium se zaočkuje kulturou bakterií *Nocardia tartaricans* ATCC 31191, která byla připravena 48-hodinovou kultivací na pevném kultivačním médiu při 28 °C (YG agar: kvasničný extrakt 5 g/l, glukóza 10 g/l, pepton 5 g/l, agar 20 g/l, pH 7,0). Po 24 hodinové kultivaci na závěsné rotační třepačce při teplotě 30 °C se biomasa bakterií oddělí od kultivačního média odstředěním (6000 ot/min., 10 min.), promyje se jedenkrát fyziologickým roztokem (0,85 % NaCl) a tímto roztokem se naředí na koncentraci buněk 10^5 buněk/ cm^3 . K buňkám se přidá 1-metyl-3-nitro-1-nitrozoguanidín (NTG) na výslednou koncentraci 1 mg/ cm^3 . Inkubace probíhá 5, 10, 20 a 30 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci se buňky scentrifugují (5600 g, 10 min) a promyjí se sterilním fyziologickým roztokem. Promyté buňky se naočkují na tuhou agarovou půdu (kvasničný extrakt 5 g/ dm^3 , pepton 5 g/ dm^3 , glukóza 10 g/ dm^3 , cis-epoxyjantaran sodný 10 g/ dm^3 , agar 20 g/ dm^3) a inkubují se 4 dny při teplotě 30 °C.

30

35

Vyrostlé kolonie se očkují na YG agar s přidavkem 5 g/l cis-epoxyjantaranu sodného a kultivují se při 30 °C po dobu 48 hod. Takto vyrostlá kultura se naočkuje do 50 ml kultivačního média v 500 ml kultivační baňce (médium obsahuje v 1 litru destilované vody masový extrakt 5 g, pepton 5 g, cis-epoxyjantaran sodný 10 g, NaCl 3 g, KH_2PO_4 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g, pH 7,0) a kultivuje se na závěsné rotační třepačce 24 hod. při 30 °C. Aktivita cis-epoxyjantaranhydrolázy se u mutantních kmenů stanovila následujícím postupem:

40

45

Buňky se scentrifugují (5600 g, 10 min) a promyjí sterilním fyziologickým roztokem. Enzymová aktivita cis-epoxyjantaranhydrolázy v buňkách se stanoví za následujících experimentálních podmínek: 1M cis-epoxyjantaran sodný s obsahem deoxycholátu sodného 0,02 hmotn. %, pH 7,8, teplota 35 °C. 1 unit (IU) se definuje jako množství cis-epoxyjantaranhydrolázy, která vytvoří 1 μmol kyseliny vinné za 1 hodinu v experimentálních podmínkách. Specifická aktivita cis-epoxyjantaranhydrolázy v buňkách se vztahuje na 1 mg suchých buněk. Množství kyseliny cis-epoxyjantarové, resp. kyseliny vinné, je možno stanovit například izotachoforetickou metodou s použitím systému β -alanin - HCl, pH 3,0 a kyseliny octové jako koncového iontu podle

50

postupu Polonský J. a kol. (J. Chromatogr. 320, 1985, strany 11 až 118). Na stanovení těchto organických kyselin je však možno použít i jiné standardní postupy, například HPLC a podobně.

Buňky s nejvyšší specifickou aktivitou cis-epoxyjantarohydrolázy se kultivují střídavě na tekutém a tuhém kultivačním médiu (složení a podmínky kultivace byly uvedeny výše) s rostoucí koncentrací kyseliny cis-epoxyjantarové (5 až 15 g/dm³). Tento cyklus pasážování na tuhých a tekutých médiích se u producenta s nejvyšší specifickou aktivitou cis-epoxyjantarohydrolázy vícenásobně opakuje, až se získá producent se standardními produkčními schopnostmi, označený jako *Nocardia* sp. NT 24. Při konverzi 1M cis-epoxyjantaranu sodného s přidavkem deoxycholátu sodného (0,02 hmotn. %), pH 7,8 a teplotě 35 °C vyprodukoval 1 gram buněk *Nocardia* sp. NT 24 za 10 hodin biokonverze 102 g kyseliny L(+)-vinné, což odpovídá specifické aktivitě buněk 67,9 U/mg. 1 gram původního rodičovského kmenu vyprodukoval v analogických podmínkách za 10 hodin 45 g kyseliny L(+)-vinné, což odpovídá specifické aktivitě buněk 29,9 U/mg.

15

Příklad 2

Připraví se 50 ml kultivačního média v 500 ml kultivační baňce (sterilizace 20 min při 121 °C). Kultivační médium obsahuje v 1 l destilované vody masový extrakt 3 g, pepton 5 g, NaCl 3 g, KH₂PO₄ 3 g, MgSO₄·7H₂O 2 g, FeSO₄·7H₂O 0,01 g, CaCl₂·2H₂O 0,03 g, MnSO₄·4H₂O 0,03 g (pH 7,0) s přidavkem cis-epoxyjantaranu sodného na výslednou koncentraci 0,6 hmotn. %. Médium se zaočkuje kulturou bakterií *Nocardia* sp. NT 24, která byla připravena 48-hodinovou kultivací na tuhém kultivačním médiu při 28 °C (YG agar) a kultivuje se 24 hodin na závěsné rotační třepačce při teplotě 30 °C. Takto připravené vegetativní inokulum se použije na zaočkování 4 l kultivačního média ve fermentoru v množství 2 obj. %. Složení média bylo analogické. Po 24 hodinách kultivace za analogických podmínek se biomasa bakterií ze 4 litrů média odseparuje odstředěním (6000 ot/min, 10 min) a buňky (6,0 g vztaženo na sušinu) se rozsuspenderují v 1000 ml 1M roztoku cis-epoxyjantaranu sodného s přidavkem deoxycholátu sodného na výslednou koncentraci 0,02 hmotn. %. V průběhu biokonverze, která probíhá při teplotě 35 °C a pH 7,8, se do reakční směsi postupně přidává 1M roztok cis-epoxyjantaranu sodného (pH 7,8) do výsledného objemu 20 l. Po 68 hodinách biokonverze bylo připraveno 2,97 kg kyseliny L(+)-vinné, což je 98,9 % teoretického výtěžku. Biomasa se následně odseparuje odstředěním (6000 ot/min, 10 min) a znovu se použije na konverzi 20 litrů 1M roztoku cis-epoxyjantaranu sodného (pH 7,8) při teplotě 35 °C. Po 80 hodinách biokonverze bylo připraveno 2,94 kg kyseliny L(+)-vinné, což je 98,0 % teoretického výtěžku.

40

Nový kmen podle vynálezu je využitelný při výrobě kyseliny L(+)-vinné nebo jejích solí, které mají široké použití v potravinářství, farmacii, chemickém průmyslu a dalších oblastech.

PATENTOVÉ NÁROKY

45

1. Kmen mikroorganismu *Nocardia* sp. NT 24, CCM 4837/A, produkující kyselinu L(+)-vinnou.

50

Konec dokumentu
