

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

48784

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 04. I. 1964 (P 103 394)

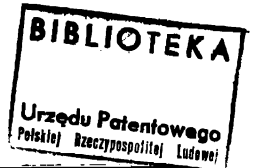
Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 7. MAJA 1966

Kl. 6 b, 16/02

MKP C 12 d 3/00

UKD



Współtwórcy wynalazku: mgr inż. Bogdan Rakowski, mgr inż. Kazimierz Samuła, mgr inż. Franciszek Ulak, dr Arnold Adamiec, mgr inż. Danuta Tomaszewska, mgr inż. Zbigniew Miłkowski, mgr inż. Mieczysław Wośko, mgr inż. Mirosław Zyner

Właściciel patentu: Kutnowskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa”
Przedsiębiorstwo Państwowe, Kutno (Polska)

Sposób otrzymywania kwasów giberelinowych za pomocą fermentacji

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania kwasów giberelinowych drogą fermentacji, za pomocą grzyba *Gibberella fujikuroi*.

Gibereliny, wytwarzane przez mutanty szczepu grzyba *Gibberella fujikuroi*, przyspieszają wzrost kwitnienie i owocowanie wielu roślin oraz przyspieszają kiełkowanie nasion, np. jęczmienia. Z tego też względu, preparaty zawierające kwasy giberelinowe znajdują szerokie zastosowanie w rolnictwie, ogrodnictwie, przemyśle fermentacyjnym i innych.

Znane sposoby biochemicznego otrzymywania kwasów giberelinowych polegają na prowadzeniu procesu fermentacji na pożywkach o różnym składzie. Tak np. według austriackiego opisu patentowego nr 209839 stosuje się pożywkę, zawierającą glukozę, azotan amonu, fosforan potasu, siarczan magnezu oraz dodatek mieszaniny, składającej się z siarczanu żelazawego, siarczanu miedziowego, siarczanu cynku, siarczanu manganawego oraz molibdenianu potasu. Według opisu patentowego, Niemieckiej Republiki Federalnej nr 1081402 jako pożywkę stosuje się odciek melasy cukrowej, zawierający w 1 litrze 18 g substancji redukującej, w przeliczeniu na glukozę, 4,2 g azotu oraz 0,14 g P_2O_5 , przy czym pożywka ta ma pH = 4,9.

Sposób według wynalazku umożliwia przyspieszenie przebiegu procesu otrzymywania kwasów giberelinowych drogą fermentacji, uzyskiwanie większej wydajności procesu, przy równoczesnym

2

obniżeniu jednostkowego zużycia energii w porównaniu ze znanymi sposobami.

Zgodnie z wynalazkiem zarówno do fermentacji dla przygotowania materiału szczepiennego, jak i do fermentacji głównej, jako jeden ze składników pożywki, będącej źródłem węgla, stosuje się przemysłowe odpadki dekstranu o dużej zawartości fruktozy, a jako źródło azotu stosuje się częściowo zhydrolizowaną grzybnię grzyba *Gibberella fujikuroi* oraz związki amonowe, zwłaszcza siarczany amonowe lub amoniaki. Przemysłowe odpadki dekstranu zawierają średnio około 10 g suchej substancji w 100 ml. a w tym około 8,2 g fruktozy 1,5 g dekstranu, 0,3 g soli mineralnych oraz substancje białkowe, przy czym zawartość azotu wynosi około 0,047 g, zaś pH odpadów = około 4,8.

Dalszą podstawową cechą sposobu według wynalazku jest to, że początkowe pH pożywki w obu fazach fermentacji nastawia się przez dodanie substancji buforowej tak, aby zawierało się w granicach 2,5—6,5, a najlepiej około 4,3—4,4. Jako substancję buforową stosuje się mieszaninę kwasu organicznego, zwłaszcza kwasu winowego, kwasu mlekowego lub kwasu octowego, z wodorotlenkiem amonowym. Stosunek ilościowy obu składników mieszaniny buforowej zależy od początkowej wartości pH, przygotowywanej brzożki. Dalsza fermentacja odbywa się przy zmien-

nym pH, zależnie od rodzaju pożywki i stopnia napowietrzania brzezki.

W początkowej fazie procesu temperatura brzezki wynosi około 27–28°C, jednakże zgodnie z wynalazkiem, w celu właściwego przygotowania materiału szczepiennego do fermentacji głównej, fermentację materiału szczepiennego prowadzi się regulując temperaturę w poszczególnych fazach rozwoju grzybni. Szczególnie korzystne okazało się dwukrotne, skokowe obniżanie temperatury fermentacji, a mianowicie o 8–10°C, gdy pH pożywki wzrosło o około 0,6 ponad pH początkowe oraz o 4–6°C, gdy temperatura brzezki podniesie się ponownie do temperatury wyjściowej, to jest 27–28°C.

Rozpoczynając fermentację materiału szczepiennego, do brzezki wprowadza się powietrze jałowe w ilości przeważnie około 0,6 litra na 1 litr brzezki, zaś na początku fermentacji głównej — około 0,33 litra powietrza na 1 litr brzezki, przy czym zgodnie z wynalazkiem w miarę postępu obu faz procesu zwiększa się ilość doprowadzanego powietrza tak, aby pod koniec każdej fazy była dwukrotnie większa niż na początku. Fermentację główną prowadzi się w kilku tankach, połączonych szeregowo, przy czym powietrze wypływające z jednego tanku wykorzystuje się do napowietrzania następnego. Pozwala to na znaczne obniżenie jednostkowego zużycia energii.

Sposób według wynalazku jest bliżej wyjaśniony w poniższym przykładzie.

Przykład. Przygotowanie materiału szczepiennego. Do aparatu o pojemności 300 litrów, wykonanego z kwasoodpornej stali, wprowadzono 250 litrów pożywki o następującym składzie w procentach do ciężaru brzezki:

skrobia	— 4%
wyciąg namoku kukurydzy	— 1,25%
zhydrolizowana grzybnia grzyba <i>Gibberella fujikuroi</i>	— 0,1%
przemysłowe odpady dekstranu	— 0,625%
siarczan amonowy	— 0,1%
ortofosforan jednopotasowy	— 0,05%
smalec	— 0,1%
olej sojowy	— 0,15%
woda	do 250 litrów

Do tak przygotowanej pożywki, mającej pH = 4,1, dodano następnie mieszaninę buforową w postaci wodnego roztworu kwasu winowego i wody amoniakalnej, mającego pH = 4,7. W celu doprowadzenia pH brzezki do 4,3 dodano tyle mieszaniny buforowej, że zawartość kwasu winowego w gotowej brzezce wynosiła 0,067% w stosunku do ciężaru brzezki. Przygotowaną w ten sposób brzezke sterylizowano przez 45 minut w temperaturze 115–120°C, a następnie ochłodzono do temperatury 27°C i zaszczerpiono dwoma litrami uprzednio przygotowanego „inoculum” grzyba *Gibberella fujikuroi*. Fermentację prowadzono 30 godzin, przy ciągłym przepływie powietrza przez brzezke i intensywnym mieszaniu. W ciągu pierwszych sześciu godzin wprowadzano 150 litrów powietrza na minutę, w ciągu dalszych sześciu — 175 l/min,

a następnie zwiększano stopniowo do 300 l/min. Po 17 godzinach fermentacji pH wzrosło o 0,5 i wówczas oziębiono szybko zawartość aparatu do 18°C. Po wypuszczeniu czynnika chłodzącego z płaszcza aparatu temperatura grzybni wzrastała samoistnie i następował dalszy, powolny wzrost pH. Po około 23 godzinach od początku fermentacji temperatura w aparacie wzrosła do około 25°C, zaś pH pożywki do 6,8 i wówczas ponownie ochłodzono zawartość aparatu do 21°C, co spowodowało dalszy, powolny wzrost pH przy intensywnym gęstnieniu grzybni. Po 30 godzinach zakończono proces, otrzymując gęstą grzybnę *Gibberella fujikuroi* o pH około 7,3, stanowiącą materiał szczepienny do fermentacji głównej.

Fermentacja główna. Proces fermentacji głównej prowadzono w dwóch tankach o pojemności po 6000 litrów, sprzężonych rurociągiem powietrznym, łączącym króciec powietrza, wychodzącego z pierwszego fermentatora z belkotką drugiego fermentatora. Do pierwszego tanku wprowadzono 4500 litrów, a do drugiego 4000 litrów pożywki o wyżej podanym składzie i o pH = 4,3. Pożywkę w obu tankach sterylizowano przez 45 minut w temperaturze około 115°C i następnie ochłodzono do 28°C i zaszczerpiono uprzednio przygotowanym materiałem szczepiennym w ilości około 120 litrów na każdy tank, po czym otwarto dopływ jałowego powietrza i uruchomiono mieszadło. Przez pierwsze 12 godzin fermentacji wprowadzono 1500 litrów powietrza na minutę, przez dalsze 12 godzin 2250 l/min, a następnie 3000 l/min tak, że pH pożywki ulegało następującym zmianom:

po 10–16 godzinach fermentacji	pH wyniosło 4,0–4,2
po 17–19 „ „ „ „	4,3–4,5
po 20–22 „ „ „ „	3,2–3,1
ponad 22 godziny „ „ „ „	3,1–2,9.

Fermentację zakończono po 105 godzinach od momentu zaszczerpienia tanków i zawartość fermentatorów odsączono na prasach filtracyjnych. Otrzymano 1,1 g kwasów giberelinowych na litr brzezki, oznaczonych metodą fluorometryczną. Kwasy te wyodrębniono w znany sposób przez adsorpcję na węglu aktywnym, elucję i krystalizację. Odsączoną grzybnę poddano częściowej hydrolizie i stosowano jako jeden ze składników do następnej fermentacji.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania kwasów giberelinowych na drodze fermentacji za pomocą grzyba *Gibberella fujikuroi*, znamienny tym, że podczas fermentacji w celu przygotowania materiału szczepiennego dla fermentacji głównej, jak i podczas fermentacji głównej, jako jeden ze składników pożywki, będącej źródłem węgla, stosuje się przemysłowe odpadki dekstranu,

a zwłaszcza odpadki zawierające w 100 ml roztworu około 8 g fruktozy, a jako pożywkę azotową stosuje się częściowo zhydroli-zowaną grzybnię grzyba *Gibberella fujikuroi* oraz związki amonowe, najlepiej siar-czan amonowy lub amoniak, przy czym po-czątkowe pH brzezki w obu fazach fermentacji nastawia się przez dodatek substancji bu-forowej w postaci mieszaniny organicznego kwasu, zwłaszcza kwasu winowego, kwasu mle-kowego lub kwasu octowego, z wodorotlenkiem amonowym tak, aby zawierało się w granicach 2,5—6,5, a najlepiej około 4,3—4,4 i obie fazy fermentacji prowadzi się przy zmiennym pH, a temperaturę brzezki, wynoszącą w obu fazach początkowo około 27—28°C, zmienia się w posz-czególnych fazach rozwoju grzybni podczas fer-mentacji materiału szczepiennego, zwłaszcza ob-

niżając ją skokowo raz o około 8—10°C, gdy pH pożywki wzrośnie o około 0,6 powyżej początko-wego i drugi raz o około 4—6°C, gdy temperatu-ra brzezki podniesie się ponownie do tempera-tury początkowej, przy czym ilość wprowadza-nego powietrza jałowego, wynosząca na począt-ku fermentacji materiału szczepiennego najle-piej około 0,6 litra, zaś na początku fermentacji głównej około 0,33 litra na 1 litr brzezki, zwiększa się w miarę postępu procesu tak, aby pod koniec każdej fazy była dwukrotnie więk-sza niż na początku.

2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że fermentację główną prowadzi się w kilku fer-mentatorach połączonych szeregowo, przy czym powietrze, wypływające z jednego fermentato-ra, wykorzystuje się do napowietrzania następ-nego.

BIBLIOTEKA
Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej (Ludowej)