

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

209 917 B

(21) A bejelentés száma: 8344/90
(22) A bejelentés napja: 1990. 12. 19.
(30) Elsőbbségi adatok:
04555/89 1989. 12. 20. CH
(83) Letétbe helyezés: DSM 2783, DSM 4746

(51) Int. Cl.⁵

C 12 P 17/10

C 12 P 33/06

(40) A közzététel napja: 1992. 12. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1994. 11. 28. SZKV 94/11

(72) Feltalálók:

Hoeks, Frans, Naters/Wallis (CH)
Venetz, Daniel, Brig/Wallis (CH)

(73) Szabadalmas:

LONZA Ag., Gampel/Wallis (CH)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54)

Egyfermentoros eljárás 6-hidroxi-nikotinsav előállítására

(57) KIVONAT

A találmány tárgya egyfermentoros eljárás 6-hidroxi-nikotinsav előállítására nikotinsav enzimes hidroxilezése útján. A találmány szerinti eljárásra jellemző, hogy *Achromobacter xylosoxydans* vagy *Pseudomonas acidovorans* termelőmikroorganizmus tenyésztéséhez a nikotinsavat vagy vízben oldható sóját vagy a nikotinsav vizes oldatát segédanyagokkal együtt fo-

lyamatosan vagy adagonként olyan ütemben adagolják, hogy a tenyészetben a nikotinsav koncentrációja adagolás alatt mindig nullánál nagyobb, de 10 g/l-nél kevesebb legyen, így a mikroorganizmus szaporodása és a 6-hidroxi-nikotinsav képződése egyetlen eljárási lépésben történik.

A találmány tárgya egyfermentoros eljárás 6-hidroxi-nikotinsav előállítására nikotinsav enzimes hidroxilezése útján.

Ismert, hogy a 6-hidroxi-nikotinsav *Pseudomonas*, *Bacillus* vagy *Achromobacter* nemzetségbeli élő mikroorganizmusok segítségével állítható elő (658 866 és 658 867 sz. svájci szabadalmi leírás). Az eljárások során a megfelelő mikroorganizmusokból készített biomasz-szuszpenziót használnak, amelyet külön eljárási lépésben, indítókultúra szaporításával állítanak elő. Maga a hidroxilezés vagy szakaszos eljárásban, a nikotinsav nátriumsója alakjában történő egyszeri adagolásával megy végbe (batch eljárás, 658 866 sz. svájci szabadalmi leírás), vagy folyamatos eljárásban valósul meg, ahol a nikotinsavat (jól oldódó) magnézium- vagy báriumsóként adagolják és a 6-hidroxi-nikotinsavat nehezen oldódó magnézium- vagy báriumsóként elkülönítik (658 867 sz. svájci szabadalmi leírás). Tekintettel arra, hogy az eljárásban alkalmazott nikotinsav-koncentrációja a mikroorganizmusok szaporodását gátolja, az eljárás velejárója, hogy a hatásos biomasz egész mennyiségét külön kell előállítani. A 6-hidroxi-nikotinsav enzimes úton történő előállítását megvalósító eljárásoknak azonban egyéb hátrányai is vannak. A 658867 sz. svájci szabadalmi leírás szerinti folyamatos eljárás magnézium- vagy báriumsót szolgáltat, amelyből a 6-hidroxi-nikotinsavat sav adagolásával szabadítják fel. Ennek során az adagolt sav magnézium-, illetve báriumsója keletkezik, amelyet hulladékként deponálni vagy ártalmatlanítani kell. Különösen az oldható báriumsók a magasabb rendű szervezetek számára erősen toxikusak. Hosszabb folyamatos üzem során a kikristályosodó sók lerakódásokat okozhatnak, és idegen mikroflóra is telepedhet le a berendezésekben.

A találmány feladata ezért egy egyszerű eljárás kidolgozása volt, amellyel a fenti hátrányok kiküszöbölésével 6-hidroxi-nikotinsav nagy koncentrációban és jó hozammal állítható elő.

A fenti feladatot úgy oldottuk meg, hogy *Achromobacter xylosoxydans* vagy *Pseudomonas acidovorans* termelő mikroorganizmus tenyésztéséhez a nikotinsavat vagy vízben oldható sóját vagy a nikotinsav vizes oldatát segédanyagokkal együtt folyamatosan vagy adagként olyan ütemben adagoljuk, hogy a tenyésztésben a nikotinsav koncentrációja adagolás alatt mindig nullánál nagyobb, de 10 g/l-nél kevesebb legyen, így a mikroorganizmus szaporodása és a 6-hidroxi-nikotinsav képződése egyetlenegy eljárási lépésben történik.

Meglepő módon ugyanis azt találtuk, hogy a biomasz elkülönített előállítására nincs szükség, ha önmagában ismert módon nyert indítókultúrából kiindulva a nikotinsavat olyan ütemben adagoljuk, hogy koncentrációja lényegében a mikroorganizmusok szaporodását gátló koncentrációnál kisebb legyen. A „lényegében” kifejezésen itt azt értjük, hogy a kritikus koncentrációnál nagyobb koncentráció érték legfeljebb csak rövid időre és/vagy helyileg, különösen az adagolás helyén a teljes átkeverés előtt, fordulhat elő. Várható volt, hogy ilyen körülmények között biomasz képződik, a meglepő az volt, hogy a növekedési fázisban is termelődik 6-hidroxi-

nikotinsav, ez nem metabolizálódik, így a nikotinsav adagolása, majd teljes elfogyása után a 6-hidroxi-nikotinsav gyakorlatilag kvantitatív hozammal ismert módon elkülöníthető. A nikotinsav adagolása során emelkedő 6-hidroxi-nikotinsav-koncentráció növekvő mértékben gátolja a sejtnövekedést, de a növekedés teljes leállása csak elég nagy 6-hidroxi-nikotinsav koncentráció esetén következik be. Az alkalmazott törzstől függően a megállás koncentrációja 50 g/l körüli vagy ennél nagyobb. Meglepő módon a 6-hidroxi-nikotinsav további lebontása nem következik be. A nikotinsav-hidroxiláz enzim gátlása csak még nagyobb koncentrációknál következik be, ez – 100%-os hozam mellett – korlátozza az elérhető termék-koncentrációt. A találmány szerinti eljárás szempontjából lényeges, hogy a nikotinsav koncentrációja a sejtnövekedés fázisában mindig nullánál nagyobb legyen, mert máskülönben a már képződött 6-hidroxi-nikotinsav lebontása következik be. Csak amikor majdnem elértük a 6-hidroxi-nikotinsav maximális koncentrációját, leáll a lebontása, így a nikotinsav adagolásának befejeztével nyugodtan lehet várni, míg az adagolt nikotinsav el is fogyott, hozamvesztéstől nem kell tartani. A nikotinsavat hidroxilező mikroorganizmusként előnyösen *Pseudomonas*, *Bacillus* vagy *Achromobacter* nemzetségbeli mikroorganizmusokat alkalmazunk. Előnyben részesítjük a *Pseudomonas putida* és *Achromobacter xylosoxydans* fajtákat, különösen előnyös az *Achromobacter xylosoxydans* DSM 2783 sz. törzs. Az előnyös mikroorganizmusokat a 658 866 sz. svájci szabadalmi leírás ismerteti. A mikroorganizmusok szuszpenziójában a nikotinsav koncentrációja adagolás közben 10 g/l-nél kisebb. A nikotinsavat kis adagokban vagy folyamatosan adagolhatjuk, a folyamatos adagolás előnyösebb.

A nikotinsavat szilárd halmazállapotban vagy oldatként adagolhatjuk, vagy szabad sav vagy vízben oldódó só alakjában. A vizes oldat formájában történő adagolást előnyben részesítjük, a legelőnyösebb a nátrium- vagy káliumsó vizes oldatának adagolása.

A mikroorganizmusok szuszpenzióját célszerűen keverjük és levegőztetjük, lehetséges az is, hogy a szükséges keverő hatást a befűjt levegő szolgáltatja. Az oldott oxigén parciális nyomása (pO_2) előnyösen 100 Pa és $20 \cdot 10^3$ Pa közötti, előnyösen 4000 és 8000 Pa közötti érték. A mechanikai keverő alkalmazása előnyös. A mikroorganizmusok szaporítása és a 6-hidroxi-nikotinsav képződése előnyösen 20–40 °C-on, 5,5 és 9 közötti pH mellett történik.

Előnyös, ha a nikotinsav mellett további tápanyagokkal segítjük elő a biomasz növekedését. Az ilyenek lehetnek: szénforrások, így glicerín vagy glükóz, nitrogénforrások, így ammóniumsók vagy glutaminsav, valamint ásványi sók, nyomelemek és vitaminok.

Az adalékokat előnyösen úgy adagoljuk, hogy koncentrációjuk nem esik sem a limitáló, sem a gátló tartományba. Ez azonban szakember számára ismert. A tápanyagokat egyenként, de komplex formában, természetes vagy mesterséges keverékek alakjában is adagolhatjuk. Különösen előnyös komplex tápanyag az élesztőkivonat.

A találmány szerinti eljárást folyamatos eljárásként is

valósíthatjuk meg. Ez esetben miután a 6-hidroxi-nikotinsav koncentrációja saját lebontását megakadályozó értékre emelkedett, a terméket folyamatosan elválasztjuk, és a sejteket egyidejűleg visszavezetjük a folyamatba. E folyamatos eljárás megvalósítására alkalmas berendezést például a 664 374 sz. svájci szabadalmi leírás ismertet. Célszerűen a nikotinsav adagolásának sebessége a termék elkülönítésének sebességével azonos, így a termék koncentrációja azonos marad a rendszerben.

Az alábbi példákkal a találmányt közelebből ismertetjük.

1. Példa

a) A kiinduló tenyészet előállítása

5,19 g dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrát, 2,00 g kálium-dihidrogén-foszfát, 0,25 g élesztőkivonat, 1,00 g nikotinsav és 500 ml víz felhasználásával tápoldatot készítünk, és a tápoldatot 120 °C-on 20 percen át sterilizáljuk. A 30 °C-ra lehűlt oldathoz nyomelem-oldatot adunk olyan mennyiségben, hogy a tápközegekben az alábbi koncentrációk jöjjenek létre:

kalcium-klorid-dihidrát	20 mg/l
mangán(II)-szulfát	10 mg/l
vas(II)-szulfát-heptahidrát	5 mg/l
kobalt(II)-szulfát-hexahidrát	0,1 mg/l
réz (II)-szulfát-pentahidrát	0,1 mg/l
cinkszulfát-heptahidrát	0,1 mg/l
nátrium-molibdát-dihidrát	0,1 mg/l

A tápközeget az *Achromobacter xylosoxydans* DSM 2783 törzs kultúrájával beoltjuk, majd 30 °C-on pH 7 mellett 24 órán át tenyésztjük.

b) 6-hidroxi-nikotinsav előállítása

Keverővel, levegőztetővel és pH-szabályozóval felszerelt 20 literes fermentorban 90 g nikotinsav, 19,44 g nátriumhidroxid, 90 g élesztőkivonat, 12 g kálium-szulfát, 9,6 g magnézium-klorid-hexahidrát, 1,92 g kalcium-klorid, 2,4 ml polipropilén-glikol-2000, 180 g L-glutaminsav és 300 g glükóz 12 liter vízzel készített oldatát 121 °C-on 30 percen át sterilizáljuk. A 30 °C-ra lehűlt oldathoz adagoljuk a kiinduló tenyészetet, és a közeget levegőztetés és keverés közben pH 7 mellett 10 órán át inkubáljuk. Ez alatt az idő alatt a nikotinsav koncentrációja (amelyet nagynyomású folyadék kromatográfián követünk) 7,5 g/l-ről 2 g/l-re csökkent, és a biomassa koncentrációja 10 g/l szárazanyagra nőtt. Most kezdjük az 1,13 kg nikotinsav és 0,365 kg nátrium-hidroxid 3,00 liter vízzel készített, 121 °C-on 20 percen át sterilizált oldatának az adagolását. Az adagolás sebességét úgy választjuk meg, hogy adagolás közben a fermentorban mérhető nikotinsavkoncentráció 1 g/l és 9 g/l között legyen. 11 óra elteltével az adagolás befejeződött, a glutaminsav és a glükóz teljesen elfogyott, és a biomassa koncentrációja 15 g/l (szárazanyag) értékre nőtt. További 4 órával később, azaz a beoltástól számított 25. óra után a fermentálást megszakítjuk. A 6-hidroxi-nikotinsav koncentrációja a fermentáléban 74 g/l, ami azt jelenti, hogy a nikotinsav gyakorlatilag kvantitatíve átalakult 6-hidroxi-nikotinsavvá. A feldolgozás a 658 866 sz. svájci szabadalmi leírás 1. és 3. kiviteli példájában leírtak szerint történik.

2. példa

a) A kiinduló tenyészet előállítása

Az 1a) példa szerint tápoldatot állítunk elő, ezt a *Pseudomonas acidovorans* DSM 4746 sz. törzsszel beoltjuk és 30 °C-on pH 7 mellett 24 órán át inkubáljuk.

b) 6-hidroxi-nikotinsav előállítása

Az 1b) példában leírt 20 literes fermentort az 1 példa szerinti tápközegekkel töltjük, amely azonban nem tartalmazott glükózt. A tápközeget sterilizáljuk.

Miután a közeg 30 °C-ra lehűlt, adagoljuk a kiinduló tenyészetet, és a fermentort pH 7, levegőztetés és keverés mellett 8 órán át inkubáljuk. Ez alatt az idő alatt a nikotinsav-koncentráció 7,5 g/l értékről 2,5 g/l értékre csökkent (HPLC), és a biomassa koncentrációja 9,5 g/l szárazanyagra emelkedett. Most kezdődik az 1b) példa szerint elkészített nátrium-nikotínát-oldat adagolása olyan sebességgel, hogy a fermentálé nikotinsav-koncentrációja 1 g/l és 9 g/l közötti érték legyen. 12 óra elteltével az adagolás befejeződött, a glutaminsav teljesen elfogyott, és a biomasszakoncentráció 14 g/l (szárazanyag) értékre emelkedett.

További 4 óra elteltével, tehát az inokulációt követő 24. óra után a fermentálást megszakítjuk. A 6-hidroxi-nikotinsav végkoncentrációja 73 g/l, ami a nikotinsav majdnem kvantitatív átalakulását jelenti. A feldolgozást az 1. példa szerint végezzük.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egyfermentoros eljárás 6-hidroxi-nikotinsav-nikotinsav aerob körülmények mellett végzett mikrobiológiai hidroxilezése útján, *azzal jellemezve*, hogy *Achromobacter xylosoxydans* vagy *Pseudomonas acidovorans* mikroorganizmustermelő tenyészetéhez a nikotinsavat vagy vízben oldható sóját vagy a nikotinsav vizes oldatát segédanyagokkal együtt folyamatosan vagy adagonként olyan ütemben adagoljuk, hogy a tenyészetben a nikotinsav koncentrációja adagolás alatt mindig nullánál nagyobb, de 10 g/l-nél kevesebb legyen.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az *Achromobacter xylosoxydans* DSM 2783 sz. törzset alkalmazzuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a *Pseudomonas acidovorans* DSM 4746 sz. törzset alkalmazzuk.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a nikotinsavat vizes oldat alakjában folyamatosan a mikroorganizmus kevert és levegőztetett tenyészetéhez adagoljuk.

5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a mikroorganizmus szaporítását és a 6-hidroxi-nikotinsav termelését 20–40 °C-on, 5,5 és 9 közötti pH-érték mellett végezzük.

6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a nikotinsavat nátriumsójának vizes oldata alakjában, glükóz és glutaminsav segédanyagokkal együtt alkalmazzuk.