

Warszawa, dnia 15 lutego 1952 r.



C12 d 1/10

RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ OPIS PATENTOWY

Nr 34661

Kl. 6 b, 16/02

Spolek pro chemickou a hutni výrobu, narodni podnik

(Praga, Czechosłowacja)

Sposób otrzymywania soli kwasów 2-ketohexonowych drogą fermentacji

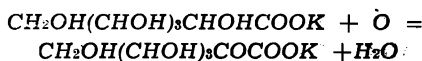
Udzielono z mocą od dnia 26 kwietnia 1949 r.
Pierwszeństwo: 13 maja 1948 r. (Czechosłowacja)

Jest rzeczą znaną, że do biologicznego otrzymywania kwasu 2-keto-*d*-glukonowego i jego soli z glukozy lub z kwasu *d*-glukonowego nadają się następujące mikroorganizmy: *Bacterium gluconicum* (Bernhauer, Görlich, Biol. Z. 280, 367/1935/), *Acetobacter suboxydans* (Bernhauer, Knobloch, Biol. Z. 303, 308/1940/), *Pseudomonas fluorescens* (Knobloch, Tietze, Biol. Z. 309, 399, /1941/) oraz nie nazwana bakteria, stosowana przez Stubbs'a i Ward'a (Stubbs, Lockwood, Roe, Tobenkin, Ward, Ind. Eng. Chem. 32, 1626/1940/).

Bakteria *Pseudomonas fluorescens* w hodowli przewietrzanej wytwarza w ciągu 24 godzin w 5 — 15%-wym roztworze *d*-glukonianiu wapnia drogą biochemicznego utlenienia 2-keto-*d*-glukonianu wapnia z wydajnością 75 — 85%. Bakteria stosowana przez Stubbs'a i Ward'a wytwarza w tym samym czasie w 10%-wym roztworze *d*-glukozy w obecności węglanu wapnia ten sam produkt z wydajnością 82% wydajności

teoretycznej. Z szeregu innych kwasów heksonowych można kwas *l*-idonowy utlenić za pomocą bakterii *Pseudomonas Mildenbergii* na kwas 2-keto-*l*-idonowy (patent Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 2421611).

Wynalazek polega na zastosowaniu nowo odkrytej bakterii, nazwanej *Cyanococcus chromospirans*, do biochemicznego utleniania kwasów heksonowych na kwas 2-ketohexonowy. Kwas poddaje się reakcji w postaci jego rozpuszczalnych soli, np. soli wapniowej lub potasowej. Reakcja przebiega według schematu:



Nowo odkryta bakteria, wyizolowana z powietrza, tworzy koki i diplokokki o wielkości 0,1 — 0,2 μ , które są nieruchliwe, pozbawione rzęsek i gramoujemne. Bakteria odznacza się wytwarzaniem różnych barwników jak pseudoperycyjaniny, bakteriofluoresceiny, oraz substancji kol-

lagenowych o charakterystycznym zapachu, a także wyróżnia się wybitną zdolnością utleniania odpowiednich substancji. Za pomocą tej bakterii można drogą przewietrzania 5 — 20%-owe roztwory d-glukonianu wapnia przeprowadzić w ciągu 24 — 30 godzin prawie ilościowo w 2-keto-d-glukonian. Z roztworów sfermentowanych można 2-keto-d-glukonian wapnia wyosobnić z wydajnością około 90 — 95% wydajności teoretycznej, a po przekrystalizowaniu z wody o temperaturze 40 — 50°C otrzymać czysty produkt z wydajnością około 80% wydajności teoretycznej.

Podobnie można 5 — 10%-owe roztwory d-glukonianu potasu utleniać na 2-keto-d-glukonian za pomocą hodowli przewietrzanych lub też mieszanych albo wstrząsanych.

Działaniem omawianej bakterii w hodowlach stałych lub przewietrzanych można też 2 — 10%-owe roztwory l-idonianu wapnia utleniać z bardzo dobrą wydajnością na 2-keto-l-idonian wapnia. Z sfermentowanych roztworów otrzymuje się czyste produkty z wydajnością 70 — 80% wydajności teoretycznej. Można również mieszaniny wymienionych substancji wyjściowych w postaci 2 — 10%-owych roztworów łatwo przeprowadzać w odpowiednie kwasy 2-ketohexonowe, przy czym fermentacja trwa 4 — 14 dni i przebiega bądź bez przewietrzania, bądź lepiej z przewietrzaniem i z dodatkiem znanych pożywek, ekstraktu drożdżowego i glukozy, w temperaturze 28 — 30°C. Korzyści nowego sposobu otrzymywania soli kwasów 2-ketohexonowych drogą fermentacji przy użyciu bakterii *Cyanococcus chromospirans*, w porównaniu do innych sposobów fermentacji, polegają na tym, że można stosować roztwory substancji wyjściowych bardziej stężone, do 20%, dalej, że można jako substancje wyjściowe stosować różne sole kwasów heksonowych, jak sole Ca, K, Na, NH₄, wreszcie że czas potrzebny do fermentacji jest o wiele krótszy.

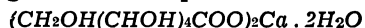
Przykład I. 500 g krystalicznego d-glukonianu wapnia, 313 cm³ 2%-ego ekstraktu drożdżowego, 25 g glukozy, 10 g (NH₄)₂HPO₄, 1,25 g MgSO₄ · 7H₂O oraz 5 g KH₂PO₄ rozpuszcza się w 5 litrach wody, z dodatkiem 5 g borksu, otrzymując roztwór około 10%-owy. Roztwór wyjaławia się przez gotowanie i po oziębieniu zaszczepia hodowlą bakterii *Cyanococcus chromospirans* wyhodowaną w ciągu 3 — 4 dni na d-glukonianie wapnia i ekstrakcie drożdżowym. Po zaszczepieniu roztwór poddaje się fermentacji przy silnym mieszaniu i przepuszczaniu wyjałowionego powietrza w ilości 1,6 litra

na minutę. Temperatura, potrzebna do fermentacji, wynosi 28 — 30°C, a czas 24 — 26 godzin. Z chwilą osiągnięcia maksymalnego przefermentowania masę sfermentowaną odsącza się z dodatkiem 10 g octanu ołowiu i przesącz zagęszcza pod próżnią w temperaturze 40 — 50°C. Po dodaniu bezwodnego metanolu z roztworu wykrystalizowuje 450 g surowego 2-keto-d-glukonianu wapnia (wydajność wynosi około 90% wydajności teoretycznej). Z surowego produktu po przekrystalizowaniu z wody o temperaturze 40 — 50°C otrzymuje się 400 g czystego 2-keto-d-glukonianu wapnia



co stanowi wydajność 80% wydajności teoretycznej.

Przykład II. W taki sam sposób jak w przykładzie I i przy użyciu tych samych dodatków oraz przy zachowaniu analogicznych warunków można przefermentować 15%-owy roztwór d-glukonianu wapnia



to znaczy zawierający 750 g substancji w 5 litrach wody. Czas fermentacji wynosi 25 godzin, a wydajność czystego przekrystalizowanego 2-keto-d-glukonianu wapnia 78 — 80% wydajności teoretycznej.

Przykład III. 300 g d-glukonianu potasu rozpuszcza się w 6 litrach 2%-ego ekstraktu drożdżowego, dodając takich samych ilości soli jak w przykładzie I. Otrzymany około 5%-owy roztwór poddaje się fermentacji z 200 cm³ hodowli *Cyanococcus chromospirans*, przy silnym przewietrzaniu, w temperaturze 28 — 30°C. Warunki fermentacji zachowuje się takie jak w przykładzie I. Maksymalne przefermentowanie ma miejsce po 4 — 5 dniach. Masę reakcyjną po dodaniu odpowiednich substancji odsącza się w celu oddzielenia bakterii i przesącz zagęszcza pod próżnią do krystalizacji. Otrzymany w ten sposób 2-keto-d-glukonian potasu przekrystalizowuje się z wody o temperaturze 40 — 50°C. Wydajność czystego 2-keto-d-glukonianu potasu CH₂OH(CHOH)₃COCOOK wynosi 210 g, to znaczy 70% wydajności teoretycznej. Temperatura topnienia czystego produktu wynosi 151 — 152°C.

Przykład IV. 50 g l-idonianu wapnia rozpuszcza się w jednym litrze 2%-owego ekstraktu drożdżowego z dodatkiem 2 g (NH₄)₂HPO₄, 1 g KH₂PO₄ i 0,25 g MgSO₄ · 7H₂O. Otrzymany około 5%-owy roztwór wyjaławia się i zaszczepia 50 cm³ hodowli bakterii *Cyanococcus chromospirans*, wyhodowanej na takim samym podłożu. Po 10 — 14-dniowym stanie w temperatu-

rze 28 — 30°C osiąga się maksymalne przefermentowanie. Po odsączeniu bakterii z odpowiednimi dodatkami, przesącz klaruje się za pomocą węgla aktywowanego i zagęszcza pod próżnią w temperaturze 30 — 40°C do konsystencji syropu. Syrop ten miesza się z jednym litrem metanolu, przy czym wytrąca się 45 g surowego 2-keto-l-idonianu wapnia, z którego otrzymuje się 40 g czystego produktu, co stanowi 80% wydajności teoretycznej.

Przykład V. 500 g l-idonianu wapnia, 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 5 g KH_2PO_4 i 1,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ rozpuszcza się w 5 litrach 2%-ego ekstraktu drożdżowego. Otrzymany 10%-owy roztwór podstawowy zaszczepia się 400 cm³ hodowli *Cyanococcus chromospirans*, wyhodowanej na takim samym podłożu w ciągu 3 — 5 dni. Ciecz fermentacyjną przewietrza się, przepuszczając 1,5 litra wyjałowionego powietrza na minutę, jednocześnie mieszając i utrzymując temperaturę 28 — 30°C. W ten sposób czas potrzebny do przefermentowania skraca się do 6 — 8 dni. Roztwór przefermentowany przerabia się tak samo jak w przykładzie IV, przy czym otrzymuje się czysty produkt z wydajnością 78% wydajności teoretycznej.

Przykład VI. Mieszaninę 250 g d-glukonianu wapnia, 250 g l-idonianu wapnia, 200 cm³ ekstraktu ze słodu żytniego (o zawartości 50 g suchej substancji), 50 g glukozy, 20 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 10 g KH_2PO_4 i 2,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dopełnia się wodą do 10 litrów. Otrzymany 5%-owy roztwór podstawowy wyjaławia się i zaszczepia 500 cm³ hodowli bakterii *Cyanococcus chromospirans*, wyhodowanej na takim samym podłożu. Roztwór fermentujący przewietrza się przepuszczając wyjałowione powietrze i jednocześnie miesza się go. Fermentacja zachodzi w temperaturze 30°C i trwa 8 — 10 dni.

Roztwór przefermentowany przerabia się w zwykły sposób, przy czym otrzymuje się czysty produkt, to znaczy mieszaninę 2-keto-d-glukonianu wapnia i 2-keto-l-idonianu wapnia, z wydajnością 80% wydajności teoretycznej.

Przykład VII. Mieszaninę 250 g d-glukonianu wapnia i 250 g l-idonianu wapnia rozpuszcza się w 5 litrach 2,5%-ego ekstraktu drożdżowego z dodatkiem 50 g glukozy, 20 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 5 g KH_2PO_4 i 1,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, po czym otrzymany 10%-owy roztwór zaszczepia się 500 cm³ hodowli wyżej podanej bakterii, wyhodowanej jak wyżej. Roztwór poddaje się fermentacji, mieszając i przewietrzając w temperaturze 30°C w ciągu 12 — 14 dni. Wydajność czystego produktu wynosi 78% wydajności teoretycznej. Obydwa ketonokwasy znajdujące się w mieszaninie można rozdzielić przez frakcjonowaną krystalizację ich estrów metylowych z roztworu metanolowego.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania soli kwasów 2-ketohexonowych drogą fermentacji, znamieny tym, że 2 — 20%-owe roztwory soli kwasów heksonowych, z dodatkiem glukozy, ekstraktu drożdżowego i znanych soli odżywczych, poddaje się fermentacji za pomocą hodowli *Cyanococcus chromospirans*, najkorzystniej przy przewietrzaniu i mieszaniu, w temperaturze około 30°C, po czym masę reakcyjną odsącza się z odpowiednimi dodatkami i przesącz, uwolniony od bakterii, zagęszcza pod próżnią, a otrzymany produkt surowy oczyszcza w znany sposób.

Spolek pro chemickou a hutní výroby, národní podnik

Zastępca: J. Felkner
rzecznik patentowy