



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

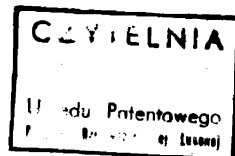
Zgłoszono: 07.07.79 (P. 216947)

Pierwszeństwo: 20.07.78 Stany Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 01.04.80

Opis patentowy opublikowano: 15.03.1984

Int. Cl.³ C07C 59/347
C12P 7/60
C12R 1/39



Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Pfizer Inc., Nowy Jork
(Stany Zjednoczone Ameryki)

**Sposób usuwania 2-ketoglukonianu z mieszaniny zawierającej
2-ketogulonian i 2-ketoglukonian na drodze fermentacji**

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób usuwania 2-ketoglukonianu z mieszaniny zawierającej 2-ketogulonian i 2-ketoglukonian na drodze fermentacji, pozwalający na otrzymanie 2-ketogulonianu praktycznie wolnego od 2-ketoglukonianu.

Kwas 2-keto-L-gulonowy jest ważnym półproduktem do wytwarzania witaminy C. W wyniku kondensacji L-sorbozy z acetonem w obecności kwasu siarkowego, utlenienia nadmanganianem i hydrolizy pochodnej dwuizopropylidenowej w temperaturze wrzenia, otrzymuje się kwas 2-keto-L-gulonowy. Zostało to opisane w Helv. Chim. Acts 17, 311 (1934) i w opisie patentowym St. Zjedn. Ameryki nr 2301811. Wytwarzanie kwasu 2-keto-L-gulonowego drogą ostrożnego utleniania L-sorbozy kwasem azotowym zostało zastrzeżone w brytyjskim opisie patentowym nr 443901 i w holenderskim opisie patentowym nr 59584. Selektywna redukcja kwasu 2,5-dwuketoglukonowego, w wyniku której otrzymuje się mieszaninę kwasu 2-ketoglukonowego i 2-ketogulonowego, oraz następna hydroliza kwasu 2-ketogulonowego do kwasu askorbinowego zostały opisane w opisie patentowym nr 114409.

Przedmiotem wynalazku jest sposób usuwania 2-ketoglukonianu z mieszaniny zawierającej 2-ketogulonian, drogą fermentacji wybranego szczepu z gatunku Pseudomonas, co ułatwia wyodrębnienie i oczyszczenie kwasu askorbinowego, wytwarzane-

2

go następnie drogą hydrolizy pozostałego nienaruszonego 2-ketogulonianu.

5 Kwas 2,5-dwuketoglukonowy jest użytecznym półproduktem w syntezie witaminy C. Wytwarza się go drogą biosyntetyczną z glukozy, stosując sposób opisany w opisie patentowym St. Zjedn. Ameryki nr 3790444. Selektowna redukcja kwasu 2,5-dwuketoglukonowego w brzeczce fermentacyjnej w sposób opisany w opisie patentowym nr 114409 prowadził do otrzymywania mieszaniny w stosunku 85:15 kwasu 2-ketogulonowego i 2-ketoglukonowego. Po hydrolizie otrzymuje się miesza-

10 ninę kwasu askorbinowego i kwasu arytorbowego. Pożądane jest aby kwas 2-ketoglukonowy, obecny w poddawanej redukcji brzeczce fermentacyjnej opidanej powyżej, został usunięty lub aby jego stężenie zostało znacznie zmniejszone. Pozostały kwas 2-ketogulonowy powinien przy tym pozostać nienaruszony, tak aby w wyniku hydrolizy powstał tylko kwas askorbinowy.

15 Przedmiotem wynalazku jest nowy sposób usuwania 2-ketoglukonianu z mieszaniny zawierającej 2-ketogulonian i 2-ketoglukonian polegający na działaniu na tę mieszaninę dawką wzrostową wybranego drobnoustroju Pseudomonas fluorescens 20 szczep WRRLB 10 lub Pseudomonas fluorescens szczep ATCC 13430 w prowadzeniu fermentacji aż do praktycznie całkowitego usunięcia 2-ketoglukonianu.

Zbadano wiele drobnoustrojów pod kątem ich zdolności metabolizowania kwasu 2-ketoglukonowego do dwutlenku węgla i wody bez naruszenia współbocznego kwasu 2-ketogulonowego. Z badanych drobnoustrojów, wyżej wymienione szczepy należące do gatunku *Pseudomonas* okazały się być zdolne do selektywnego rozkładania kwasu 2-ketoglukonowego. Robocze hodowle, które są powszechnie dostępne, zostały zdeponowane pod nadanymi im numerami. Fachowiec może łatwo otrzymać potrzebny mu szczep z odpowiedniej kolekcji. Tak więc, numery kolekcji są wystarczającą identyfikacją danego szczepu.

Szczepy stosowane w sposobie według wynalazku można rozmnażać w wodnej pożywce odżywczej zawierającej źródło przyswajalnego węgla, przyswajalnego azotu i sole nieorganiczne. Do pożywki dla inokulum pierwszego stopu korzystne jest organiczne źródło azotu, takie jak pepton i ekstrakt mięsny. Dla inokulum drugiego etapu korzystny jest wyciąg naukowy kukurydzy, fosforanu jednowodorodamonowy i mocznik. Składniki te korzystne są także dla pożywek produkcyjnych.

Porcję z 24-godzinnej hodowli w kolbach odpowiedniego szczepu *Pseudomonas fluorescens* w ilości wystarczającej do otrzymania 5% inokulum przenosi się do pożywki odżywczej znajdującej się w fermentorze w temperaturze łaźni 28–30°C, mieszanej mieszadłem mechanicznym o około 1700 obrotach/minutę i napowietrznej około 0,75 objętościami powietrza na objętość brzeczki na minutę.

Po upływie około 20 godzin odpowiednią porcję hodowli do sporządzenia 5% inokulum przenosi się do fermentatora zawierającego pożywkę z wyciągiem namokowym kukurydzy, nieorganicznymi solami amonowymi i mocznikiem. Zwiększenie wzrostu uzyskuje się dodając 0,5 g/litr glukozy. Rozmnażanie prowadzi się w temperaturze około 28–30°C, przy obrotach mieszadła 1700 obrotów na minutę i napowietrzeniu 0,75 objętościami powietrza na objętość brzeczki na minutę. Po upływie 8 godzin dodaje się mieszaninę 2-ketoglukonianu i 2-ketogulonianu otrzymaną podczas selektywnej redukcji 2,5-dwuketoglukonianu (opis patentowy nr 114409). Jak wspomniano fermentację kontynuuje się aż do praktycznie całkowitego rozkładu 2-ketoglukonianu, co ocenia się za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (około 24 godziny). Szybkość rozkładu 2-ketoglukonianu można zwiększyć dodając dodatkowo 5 g/litr wyciągu namodowego kukurydzy lub 0,5–1,0 g/litr mocznika.

Dodawaną mieszaninę 2-ketoglukonianu i 2-ketogulonianu można otrzymywać drogą selektywnej redukcji czystego lub surowego 2,5-dwuketoglukonianu lub korzystnie drogą redukcji brzeczki fermentacyjnej zawierającej mieszaninę otrzymaną z 2,5-dwuketoglukonianu wytwarzanego biosyntetycznie z glukozy.

Zmieniając ilość borowodoru metalu alkalicznego stosowanego na mol 2,5-dwuketoglukonianu, otrzymuje się w redukowanej brzeczce fermentacyjnej mieszaniny 2-ketogulonianu i 2-ketoglukonianu o stosunku od 85:15 do 45:55.

Na ogół, brzeczki fermentacyjne zawierające więcej 2-ketogulonianu w stosunku do 2-ketoglukonianu (85:15) są bardziej korzystne do dalszego przerobu, to znaczy rozkładu 2-ketoglukonianu podczas fermentacji *Pseudomonas* i następnej hydrolizy pozostałego nienaruszonego kwasu 2-ketogulonowego do kwasu askorbinowego.

W opisie i zastrzeżeniach określenie 2,5-dwuketoglukonian, 2-ketoglukonian i 2-ketogulonian dotyczy zarówno wolnych kwasów jak i ich soli.

Następujące przykłady ilustrują sposób według wynalazku, przy czym przykłady I i II dotyczą wytwarzania związków wyjściowych.

Przykład I. Przygotowuje się następującą wodną pożywkę:

Składnik	G/litr
Glukoza	— 25
Wyciąg namokowy kukurydzy	— 5
KH ₂ PO ₄	— 0,5
K ₂ HPO ₄	— 0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	— 0,2
CaCO ₃	— 6,3
pH = 6,2	

Kolbę trzęsawkową zawierającą jeden litr pożywki autoklawuje się w ciągu 30 minut w temperaturze 121°C. Wartość pH pożywki po ochłodzeniu wynosi 6,0. Do kolby dodaje się 5 ml komórek drobnoustroju *Acetobacter cerinus* IFO 3263 ze skosów agarowych w postaci 20 ml zawiesiny w jałowej wodzie. Kolbę wstrząsa się na trzęsawce obrotowej w temperaturze około 28°C, w ciągu około 24 godzin.

Porcję hodowli wzrostowej wystarczającą do sporządzenia 5% inokulum dodaje się do fermentatora o pojemności 4 litrów, zawierającego 2 litry pożywki produkującej o następującym składzie:

Składnik	G/litr
Glukoza	— 110
Wyciąg namokowy kukurydzy	— 0,5
H(NH ₄) ₂ PO ₄	— 0,58
KH ₂ PO ₄	— 1,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	— 0,5
Mocznik	— 0,5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	— 1 mg
Kwas nikotynowy	— 300 mikrogramów
pH = 6,0	

Fermentację prowadzi się w temperaturze około 28°C, przy mieszaniu 1700 obrotami na minutę i napowietrzaniu 0,75 objętościami powietrza na objętość brzeczki na minutę. Po upływie około 20 godzin od rozpoczęcia fermentacji dodaje się 55 g/litr wysterylizowanej glukozy. Wartość pH utrzymuje się za pomocą dodawania wodnego roztworu wodorotlenku sodowego. Fermentację prowadzi się aż do uzyskania 95% kwasu 2,5-dwuketoglukonowego z glukozy.

Przykład II. Do szybko mieszanego roztworu 20 litrów przesączonej brzeczki fermentacyjnej zawierającej 10% 2,5-dwuketoglukonianu sodowego

5

(0,84 mola) z przykładu I, dodaje się w temperaturze 0°C 42,4 ml 2,2 molarne NaBH₄ w 7 m NaOH (0,93 mola wodoru), z szybkością 1 ml/minutę. Wartość pH roztworu wzrasta gwałtownie z 3,65 do 10,2. Otrzymaną zawiesinę sący się, pH przesącza doprowadza do 1,6 stężonym kwasem siarczkowym, wytrącony osad odsąca się i odzruca. Wartość pH przesącza doprowadza się do 7,0 wodorotlenkiem sodowym. Stosunek 2-ketogulonianu do 2-ketoglukonianu wynosi 85:15.

Przykład III. Przygotowuje się następującą wodną pożywkę:

Składnik	G/litr
Wyciąg mięsny	— 4
Wyciąg drożdżowy	— 4
Pepton	— 4
Głukoza	— 10
NaCl	— 2

pH = 6,2

Kolbę trzęsawkową zawierającą jeden litr pożywki autoklawuje się w ciągu 30 minut w temperaturze 121°C. Komórki *Pseudomonas fluorescens* NRRL B10 ze skosów agarowych dodaje się do kolby, którą następnie wstrząsa się na trzęsawce w ciągu około 24 godzin, w temperaturze około 28°C.

Porcję hodowli wzrostowej wystarczającą dla uzyskania 5% inokulum dodaje się do 2 litrów mieszanej w fermentorze o pojemności 4 litry następującej pożywki:

Składnik	G/litr
Wyciąg namokowy kukurydzy	— 8
(NH ₄) ₂ HPO ₄	— 1
KH ₂ PO ₄	— 1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	— 0,5
Głukoza	— 10
Mocznik	— 2

pH = 7,0

Fermentację prowadzi się w temperaturze około 28—30°C, przy 1700 obrotach na minutę i przy napowietrzaniu 0,75 objętościami powietrza na objętość brzezki na minutę. Fermentację prowadzi się w ciągu około 20 godzin i następnie porcję wystarczającą do sporządzenia 5% inokulum przenosi się do fermentora o pojemności 4 litry zawierające 2 litry następującej pożywki.

Składnik	G/litr
Wyciąg namokowy kukurydzy	— 10
(NH ₄) ₂ HPO ₄	— 2

6

MgSO ₄ ·7H ₂ O	— 0,5
Mocznik	— 2
KH ₂ PO ₄	— 1

pH = 7,0

Namnażanie prowadzi się w temperaturze około 28—30°C, przy 1700 obrotach na minutę i przy napowietrzaniu 0,75 objętościami powietrza na objętość brzezki na minutę. Fermentację prowadzi się w ciągu 8 godzin i następnie porcję wystarczającą do sporządzenia 10% inokulum przenosi się do fermentora zawierającego zredukowaną brzezke fermentacyjną z przykładu II o pH 7,0. Fermentację kontynuuje się w temperaturze 28—30°C, przy 1700 obrotach na minutę i napowietrzaniu 0,75 objętościami powietrza na objętość brzezki na minutę, aż do praktycznego zakończenia rozkładu 2-ketoglukonianu.

Przesączoną brzezke fermentacyjną można dalej przerabiać dodając ksylene i stężony kwas siarkowy i ogrzewając podczas mieszania, w temperaturze 65°C, w ciągu około 5 godzin. Kwas askorbinowy wyodrębnia się z mieszaniny reakcyjnej i oczyszcza drogą rekrytalizacji.

Przykład IV. Do roztworu 15 g 2,5-dwuketoglukonianu sodowego w 150 ml wody dodaje się podczas mieszania w temperaturze 0°C 6,61 g węglanu sodowego. Wartość pH roztworu wzrasta do 9,57. Dodaje się 0,49 g borowodoru sodowego i roztwór miesza w temperaturze 0°C w ciągu około 15 minut, otrzymując mieszaninę 85:15 2-ketogulonianu i 2-ketoglukonianu.

Brzezke zawierającą komórki wzrostowe *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13430 dodaje się do powyższego zubożonego roztworu i rozkłada 2-ketoglukonian w sposób opisany w przykładzie III.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób usuwania 2-ketoglukonianu z mieszaniny zawierającej 2-ketogulonian i 2-ketoglukonian, znamienny tym, że na mieszaninę tę działa się hodowlą wzrostową wybranego drobnoustroju *Pseudomonas fluorescens* szczep NRRL B10 lub *Pseudomonas fluorescens* szczep ATCC 13430 w wodnym roztworze pożywki fermentacyjnej i fermentację prowadzi się aż do praktycznie całkowitego usunięcia 2-ketoglukonianu.

2. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że stosuje się mieszaninę 2-ketoglukonianu i 2-ketogulonianu znajdującą się w selektywnie redukowanej brzezce fermentacyjnej otrzymywanej drogą redukcji borowodorciem 2,5-dwuketoglukonianu wytwarzanego przez działanie biologiczne na glukozę.