



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

216 767

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 21 05 81
(21) PV 3788-81

(51) Int. Cl.³

C 07 C 59/105

(40) Zveřejněno 29 01 82
(45) Vydáno 01 10 84

(75)
Autor vynálezu KULHÁNEK MILOŠ ing.CSc., TADRA MILAN ing.C., PRAHA
LINEK KAZIMÍR ing.CSc., BRATISLAVA

(54) Způsob přípravy kyseliny 2-deoxy-D-glukonové

Vynález se týká způsobu přípravy kyseliny 2-deoxy-D-glukonové biochemickou oxidací 2-deoxy-D-glukosy v systému obsahujícím glukosodenhydrogenázu nebo glukosooxidázu, za průběžného odstraňování kyseliny ze systému neutralizací ve formě soli, s výhodou soli barnaté.

Vynález se týká způsobu přípravy kyseliny 2-deoxy-D-glukonové /2-deoxy-D-arebino-hexonové/, cukerného derivátu, kterého se používá v biochemii a medicíně při studiu metabolických pochodů, zejména jako kompetitivně působícího strukturního analoga kyseliny D-glukonové.

Kyselina 2-deoxy-D-glukonová se dosud připravovala chemickou oxidací 2-deoxy-D-glukosy bromem nebo jodem. Hlavní nevýhodou tohoto postupu je nízká specifická reakce, následkem toho nízké výtěžky a dále obtížné odstraňování většího množství bromidu nebo jodidu z reakční směsi.

Možnost biochemické dehydrogenace 2-deoxy-D-glukosy byla dosud studována jen s klidovými buňkami, izolovanými po růstu na některém dobře asimilovatelném cukru, dále bezbuněčnými extrakty a enzymovými preparáty, převážně v manometrických pokusech na Warburgově přístroji, při kterých spotřeba kyslíku nasvědčovala oxidaci v kyselinu 2-deoxy-D-glukonovou u *Pseudomonas aeruginosa* /A.K. Williams, R.G.Eagon: J.Bacteriol. 77, 167, 1959/, *Aerobacter aerogenes* /E.R. Blakley, O.Cifferit: Can.J.Microbiol. 7, 61, 1961/ a u plísňové glukosooxidázy /R.B.Mc.Comb se sp.: J.Franklin Inst. 263, 161, 1957; M.S. Feather: Biochem. Biophys.Acta 220, 127, 1970/. U *Acetobacter suboxydans* /J.A.Fewster: Biochem.J. 69, 582, 1950/ probíhala oxidace až v kyselině 2-deoxy-keto-D-glukonovou/pravděpodobně 5-ketoderivát/, která však dosud nebyla izolována. Tvorba kyseliny 2-deoxy-D-glukonové při těchto pokusech byla dokázána pouze chromatografickou analýzou /viz. Williams a Eagon/, popřípadě izolací miligramových množství z nádobek Warburgova přístroje /viz Blakley a Cifferi/. 2-Deoxy-D-glukosa však nebyla vhodným zdrojem uhlíku pro růst *Pseudomonas aeruginosa*, pokusy o její adaptaci na tento cukr byly bezvýsledné /viz Williams a Eagon; Eagon/. Z uvedeného vyplývá, že ani jedna ze zmíněných metod není ekonomicky použitelná pro získávání kyseliny 2-deoxy-D-glukonové ve větším měřítku.

Způsob přípravy kyseliny 2-deoxy-D-glukonové biochemickou oxidací 2-deoxy-D-glukosy ve vodné prostředí, za aerobních podmínek, působením enzymového systému obsahujícího glukosodehydrogenázu nebo glukosooxidázu, řeší vynález, jehož podstatu spočívá v tom, že se při konverzi vznikající kyselina 2-deoxy-D-glukonová průběžně odstraňuje ze systému neutralizací ve formě soli, která se izoluje.

Neutralizace vznikající kyseliny 2-deoxy-D-glukonové se účelně provádí ve vodě omezeně rozpustným uhličitánem kovů alkalických zemin, s výhodou uhličitánem barnatým nebo vápenatým, přítomným v systému od počátku konverze.

Uvedené opatření, tj. neutralizace, umožňuje použití vysokých, ekonomicky výhodných koncentrací 2-deoxy-D-glukosy, aniž by se enzymatická oxidační reakce zastavila působením snižující se hodnoty pH.

Jako zdroj glukosodehydrogenázy mohou sloužit bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, kultivované za aerobních podmínek ve vodném prostředí, obsahujícím zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku a minerální živné sole; jako zdroje glukosooxidázy lze použít plísně *Aspergillus niger*, kultivované za aerobních podmínek ve vodném prostředí, obsahujícím zdroje asimilovatelného dusíku a dalších živin, popřípadě enzymového preparátu obohaceného glukosooxidázou, dodávaného výrobcí pod různými obchodními názvy.

V průběhu pokusů, kterými se hledaly optimální podmínky pro přípravu kyseliny 2-deoxy-D-glukonové, byly ověřovány různé mikroorganismy. Octové bakterie /*Acetobacter gluconicus*, *Acetomonas oxidans*/ vytvářely směs kyseliny 2-deoxy-D-glukonové a jejího ketoderivátu, při použití plísně *Aspergillus niger* byly výtěžky nižší.

Byl proto zkoušen kmen *Pseudomonas aeruginosa*, o němž bylo již z dřívějšího známo, že při růstu na půdách, obsahujících D-glukosu i ve vysokých koncentracích a čimlo neutralizující primárně vznikající kyselinu D-glukonovou, vytvářel a hromadil 2-keto-D-glukonan. Při jeho působení na 2-deoxy-D-glukosu nedochází ke změně na uhlíku v poloze 2 a vzniká kyselina 2-deoxy-D-glukonová ve vysokém výtěžku. Při použití vhodného kmene a podmínek fermentace, tj. koncentrace, přísady dobře asimilovatelného cukru, například D-glukosy, jako induktoru růstu /2-deoxy-D-glukosa není vhodný zdroj uhlíku pro růst *Pseudomonas aeruginosa*/ a vzdušnění, je možno dosáhnout úplné konverze v krátké době. Vznikající kyselina 2-deoxy-D-glukonovou je ovšem nutno neutralizovat, jak již bylo zmíněno, nejjednodušeji přísadou málo rozpustného uhličitánu, například vápenatého, horečnatého, barnatého, manganatého nebo železnatého, a to přímo do fermentační půdy, aniž by uvolněné kationty působily v používaných koncentracích na kulturu toxicky, a připravovat tak přímo příslušnou sůl. Neutralizaci je možno provádět také automatickým přidáváním roztoku hydroxidu alkalického kovu nebo rozpustného uhličitánu apod., v závislosti na průběžně měřené hodnotě pH. Vzhledem k dobré krystalizační schopnosti byl nejčastěji připravován a izolován 2-deoxy-D-glukonan barnatý, z kterého je kromě toho možno pohodlně připravit volnou kyselinu. Výtěžky této izolované soli dosahují 75 až 80 % teorie při fermentaci 5 %ní půdy a době fermentace 2 až 3 dny. Nejvyšší udávaný výtěžek při oxidaci bromem je 58 % teorie.

Působením glukosooxidázy, obsažené v obchodním enzymovém preparátu s účinností 750 j/ml, byla 2-deoxy-D-glukosa v 5 %ním roztoku zcela konvertována během 1 dne v sůl kyseliny 2-deoxy-D-glukonové. Izolace produktu však byla ztížena balastními látkami cukerné povahy, přítomnými v enzymovém preparátu.

Některé možnosti realizace způsobu podle vynálezu jsou uvedeny v následujících příkladech provedení, které vynález pouze ilustrují, ale nijak neomezuji.

Příklad 1

Kultura kmene *Pseudomonas aeruginosa* IHE Ps 5/40 byla udržována přeočkováním na šikmé agarové půdě, obsahující 5 g D-glukonanu vápenatého, zfiltrovaný autolyzát z 2,5 g pekařského droždí a 2,5 g agaru ve 100 ml. Dva dny starou kulturou byla zaočkována půda /2,5 ml/, která obsahovala 2 g D-glukonanu vápenatého, 0,2 g D-glukosy ve 100 ml a stejné množství kvasničného autolyzátu jako výše. Po zaočkování byla půda kultivována 1 den na reciproké třepačce, pak byla použita k zaočkování 100 ml sterilní půdy, která obsahovala 5 g 2-deoxy-D-glukosy, 0,2 g D-glukosy, zfiltrovaný autolyzát z 0,5 g droždí, 0,2 g hydrogenfosforečnanu amonného, 0,1 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,025 g sírenu hořečnatého a 6 g uhličitánu barnatého sterilizovaného zvlášť. Kultivace probíhala v 500 ml varných baňkách, uzavřených vatovými zátkami, na třepacím stroji při teplotě 30 °C. Po 3 dnech kultivace byl chromatografickou analýzou dekationizovaného filtrátu zjištěn obsah pouze kyseliny 2-deoxy-D-glukonové, redukující cukry nebyly přítomny. Po ukončení kultivace byla půda zahřáta na 80 °C a udržována při této teplotě 30 min., pak byla zfiltrována. Hodnota pH filtrátu byla upravena roztokem hydroxidu barnatého na 9,2, aby se případně přítomné laktony převedly v barnatou sůl a aby se současně odstranil zbytek fosfátů přidaných do půdy. Malé množství vzniklé sraženiny bylo odfiltrováno a filtrát byl zneutralizován na pH 6,9 opatrným přidáváním katexu v H⁺-formě za míchání. Po odfiltrování katexu byl roztok odpařen za sníženého tlaku na objem kolem 20 ml a ponechán při teplotě místnosti do druhého dne. Vykrytalovaná barnatá sůl kyseliny 2-deoxy-D-glukonové byla odsáta, promyta 50 % methanolem

a vysušena ve vakuu při 50 °C. Bylo získáno 4,28 g prvního podílu a z matečného louhu po odpaření na malý objem ještě 1,53 g druhého podílu. Celkový výtěžek barnaté soli kyseliny 2-deoxy-D-glukonové byl 5,81 g, tj. 77 % teorie. Izolovaná sůl měla odpovídající obsah Ba a krystalická volná kyselina, připravená z ní působením teoreticky potřebného množství kyseliny sírové, filtrací, zahuštěním a krystalizací, byla podle t.t., optické otáčivosti a IČ spekter totožná s autenticou, chemicky připravenou kyselinou 2-deoxy-D-glukonovou.

Příklad 2

kultura kmene *Aspergillus niger* NRRL 3 byla udržována na sladidinovém šikmém agaru. Sporovou suspenzi ze 4 dny staré kultury bylo zaočkováno 100 ml sterilní půdy obsahující 5 g 2-deoxy-D-glukosu, autolyzát z 2,5 g droždí a 1,75 g uhličitanu vápenatého sterilizovaného zvlášť. Po 3 dnech na třepacím stroji při 30 °C pod vatovou zátkou roztok již neobsahoval 2-deoxy-D-glukosu. Po filtraci byl veden sloupcem katexu v H⁺-formě o objemu 25 ml a sloupcem anexu v OH⁻-formě o objemu 30 ml. Po promytí ionexů vodou byly kyseliny zachycené na anexu eluovány 2 % kyselinou sírovou. Eluát obsahující cukry byl odpařen za sníženého tlaku na objem asi 30 ml a za tepla zneutralizován pevným uhličitnem barnatým do pH 6,55. Po odfiltrování sraženiny a zahuštění na malý objem vykristaloval 2-deoxy-D-glukonan barnatý. celkem bylo získáno ve 3 frakcích 1,97 g této soli.

Příklad 3

Směs 0,25 g 2-deoxy-D-glukosu, 0,62 ml obchodního enzymového přípravku glukosooxidázy s aktivitou 750 j/ml a 0,15 g uhličitnu barnatého byla doplněna vodou na objem 5 ml a umístěna v baňce uzavřené vatovou zátkou na třepacím stroji /v tomto případě nebylo pracováno za aseptických podmínek/. Po 5 h obsahoval roztok ještě výchozí 2-deoxy-D-glukosu, po 24 h byla konverze v kyselinu 2-deoxy-D-glukonovou úplná.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy kyseliny 2-deoxy-D-glukonové biochemickou oxidací 2-deoxy-D-glukosu ve vodném prostředí, za aerobních podmínek, působením enzymového systému obsahujícího glukosodehydrogenázu nebo glukosooxidázu, vyznačující se tím, že se při konverzi vznikající kyselina 2-deoxy-D-glukonová průběžně odstraňuje ze systému neutralizací ve formě soli, která se izoluje.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se neutralizace vznikající kyseliny 2-deoxy-D-glukonové provádí ve vodě omezeně rozpustným uhličitnem kovu alkalických zemin, s výhodou uhličitnem barnatým nebo vápenatým, přítomným v systému od počátku konverze.