

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

62547

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 30.IX.1967 (P 122 810)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 15.VIII.1971

Kl. 6 b, 16/02

MKP C 12 d, 1/06

CZYTELNIA

UKD Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórca wynalazku: Romuald Bogoczek

Właściciel patentu: Politechnika Śląska im. W. Pstrowskiego (Katedra
Chemii i Technologii Organicznej), Gliwice (Polska)

Fermentacyjny sposób wytwarzania kwasu 2-keto-L-gulonowego

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania kwasu 2-keto-L-gulonowego na drodze fermentacji roztworów sorbitolu.

Z opisu patentowego brytyjskiego nr 994.119 znany jest fermentacyjny sposób otrzymywania tego kwasu z sorbitolu. Sposób ten polega na długotrwałym, periodycznym fermentowaniu rozcieńczonych roztworów sorbitolu z pomocą bakterii rodzaju *Acetobacter* i *Pseudomonas*, z dodatkiem węglanu wapnia i składników odżywczych dla bakterii. Po 7—10 dniach trwania fermentacji, tj. po jej zakończeniu filtruje się brzeczkę, a następnie przepuszcza przez kolumny kationitową i anionitową. W tej ostatniej sorbuje się kwas 2-keto-L-gulonowy a wyciek z niej ulega odrzuceniu jako bezwartościowy. Zaabsorbowany produkt wypiera się ze złoża anionitowego z pomocą roztworu zasady uzyskując w ten sposób roztwór soli kwasu 2-keto-L-gulonowego.

Znany jest też sposób otrzymywania czystego kwasu 2-keto-L-gulonowego z jego soli, na drodze przepuszczania roztworów tej soli przez złożo żywicy kationitowej.

Znany fermentacyjny sposób wytwarzania kwasu 2-keto-L-gulonowego cechuje długotrwałość i pracochłonność, jak również dość niska wydajność materiałowa. Ponadto istnieje konieczność ponownego zaszczepiania każdej nowej szarży kulturą bakterii fermentacyjnych.

2

Wiele z wymienionych wad i niedogodności tego sposobu można byłoby pokonać, gdyby proces prowadzono w sposób ciągły. Dotychczas jednak nieznanym jest ciągły proces wytwarzania kwasu 2-keto-L-gulonowego z sorbitolu na drodze fermentacyjnej, tj. biochemicznej.

Znany jest natomiast z opisu patentowego nr 56722 ciągły sposób otrzymywania kwasu 2-keto-L-gulonowego na drodze czysto chemicznej to jest nie fermentacyjnej, przy czym wychodzi się z innego surowca organicznego, a mianowicie z L-sorbozy. Znane jest też w związku z tym z tego samego opisu patentowego, urządzenie służące do przeprowadzenia takiego ciągłego sposobu. Urządzenie to składa się z reaktora, filtra, kolumny kationitowej, kolumny anionitowej, zbiorników podawczych i odbiorczych, z pompy obiegowej oraz ze zbiornika przygotowawczego.

W niniejszym opracowaniu udało się stworzyć ciągły sposób wytwarzania kwasu 2-keto-L-gulonowego na drodze fermentacyjnej, gdzie surowcem organicznym jest sorbitol. Wynalazek powstał przez połączenie znanego, fermentacyjnego periodycznego sposobu wytwarzania ze znanym lecz zmienionym nieco urządzeniem służącym do ciągłego wytwarzania tego kwasu na drodze chemicznej, lecz u innych surowców. Ze sposobu będącego przedmiotem opisu patentowego nr 56722 przyjęto również ogólną koncepcję procesu polegającą na nawracaniu

do środowiska reakcyjnego roztworu, z którego usunięto produkt reakcji.

Jednakże wprowadzono tu pewne zmiany, gdyż jak się okazało, roztwory poreakcyjne, które przeszły przez układ kolumn jonitowych po ponownym wprowadzeniu do kadzi fermentacyjnej, zatrzymywały mikroorganizmy, zatrzymując fermentację nieraz również zmieniały jej kierunek. Tę istotną przeszkodę udało się usunąć dopiero po zainstalowaniu sterylizatora pomiędzy zbiornik przygotowawczy w kadzi fermentacyjną, i przez dokładne wysterylizowanie wszystkich roztworów obiegowych. Ten zmieniony schemat aparaturowy przedstawiono na rysunku. Zostanie on omówiony w przykładzie.

Postęp techniczny jaki wnosi sposób według wynalazku w stosunku do znanego sposobu fermentacyjnego polega na tym, że nowy proces jest ciągły, charakteryzuje się znacznie większą szybkością wytwarzania produktu i przebiegu samej reakcji biochemicznej, co stanowi efekt nieoczekiwany. W stosunku do znanego ciągłego sposobu wytwarzania kwasu 2-keto-L-gulonowego na drodze chemicznej postęp polega na tym, że w charakterze głównego surowca stosuje się sorbitol, a więc surowiec wymagający krótszej obróbki chemicznej niż L-sorboza.

Sposób według wynalazku polega na ciągłej, lecz stale tylko częściowej fermentacji roztworu sorbitolu, wywołanej działaniem bakterii rodzaju *Acetobacter* lub *Pseudomonas* na podłożu odżywczym zawierającym węglan wapnia. Ciągłość procesu jest wywołana ciągłym odprowadzaniem części brzezki z kadzi fermentacyjnej do kolumn jonitowych gdzie sorpcji ulega produkt reakcji, i ciągłym powrotem tego roztworu do tejże kadzi, po uprzednim uzupełnieniu w nim surowców i wysterylizowaniu. Częściowość fermentacji polega na tym, że koncentracja jonu 2-keto-L-gulonianowego w brzezce fermentacyjnej wynosi tylko niewielką część koncentracji sorbitolu, a mianowicie stężenie sorbitolu wynosi 1,0—15% wagowych a stężenie 2-keto-L-gulonianu wapniowego wynosi 0,01—1,0% wagowych.

Kolumny jonitowe stosuje się dwójakiego rodzaju. Najpierw roztwór przepływa przez kolumnę kationitową, gdzie jony metaliczne w roztworze zostają wymienione na jony wodorowe. Następnie roztwór przepływa przez kolumnę anionitową, gdzie sorpcji ulega kwas 2-keto-L-gulonowy, a roztwór nieprzereagowanego sorbitolu przepływa bez zmian. Kwas 2-keto-L-gulonowy otrzymuje się przez wyparcie ze złoża anionitowego za pomocą elektrolitu. Złoże żywiczne regeneruje się w znany sposób, a mianowicie kationit przez przemycie kwasem mineralnym, anionit przez przemycie roztworami wodorotlenków zasadowych. Sposób postępowania według wynalazku, przedstawiony został na rysunku.

Istota wynalazku oparta jest na spostrzeżeniu, że szybkość powstawania kwasu 2-keto-L-gulonowego jest zróżnicowana w czasie trwania fermentacji. Początkowo istnieje pewien okres inicjacji procesu w którym narastanie koncentracji produktu jest bardzo powolne. Dopiero przy poziomie około 0,1 g

2-keto-L-gulonianu wapniowego w litrze następuje bardzo szybki przyrost koncentracji produktu w brzezce fermentacyjnej, po czym koncentracja ta zbliża się asymptotycznie do wielkości maksymalnej. Dalszym spostrzeżeniem na którym oparto wynalazek jest fakt, że możliwa jest zupełna sorpcja nawet drobnych ilości kwasu 2-keto-L-gulonowego z brzezki fermentacyjnej zawierającej znaczne ilości innych substancji, poprzez ciągłe cykliczne przeprowadzenie roztworu przez kolumny jonitowe. Dlatego według wynalazku, gdy stężenie kwasu 2-keto-L-gulonowego w brzezce wynosi tylko niewielką część maksymalnie możliwej koncentracji korzystnie od około 0,1—10 g w litrze, zaczyna się z niej w sposób ciągły odprowadzać roztwór do kolumn jonitowych, a jednocześnie doprowadza się do kadzi świeży roztwór sorbitolu z pożywką dla bakterii jak również węglan wapnia.

W ten sposób przywraca się i zachowuje w kadzi pierwotne warunki koncentracyjne, to jest kilka do kilkanaście procent wagowych sorbitolu i około 0,01—1% wagowych 2-keto-L-gulonianu-wapniowego. W ten sposób zachowuje się wysoką prędkość tworzenia się 2-keto-L-gulonianu-wapniowego, przy czym brzezka znajdująca się w kadzi wymaga tylko jednokrotnego zaszczepienia bakteriami na długi okres pracy. Celem zapewnienia należytej czystości kultury bakteryjnej w środowisku fermentacyjnym, odkaża się roztwory przed ich powrotem do kadzi. Odkażanie odbywa się znanymi sposobami czy to przez zagotowanie, pasteryzowanie czy też napromienianie.

Wymienione kolumny jonitowe są wypełnione dwoma rodzajami jonitów. Pierwsze kolumny zawierają kationit w formie wodorowej celem zamiany w brzezce jonów wapnia i innych kationów metali na jon wodorowy. Następne kolumny wypełnione są anionitami będącymi w formie wodorotlenowej. Mają one na celu zatrzymanie kwasów zawartych w brzezce.

Sposób wytwarzania kwasu 2-keto-L-gulonowego według wynalazku przedstawia następujący szczegółowy przykład, w którym procenty oznaczają procenty wagowe.

P r z y k ł a d. W przedstawionej na rysunku kadzi fermentacyjnej **1** oraz w zbiornikach przygotowawczych **11** umieszcza się roztwór wodny sorbitolu o stężeniu 5%. Do kadzi dodaje się poza tym w charakterze pożywki dla bakterii jeden procent glikozy oraz w przybliżeniu tyle samo 3%-owego ekstratu drożdżowego. Następnie dodaje się węglanu wapnia w ilości równej w przybliżeniu $\frac{1}{4}$ części sorbitolu celem zachowania wartości pH roztworu fermentacyjnego na poziomie około 5,6. Do kadzi dodaje się również bakterie rodzaju *Pseudomonas*, po czym, utrzymując temperaturę w kadzi na poziomie około 29°C, miesza się zawartość i napowietrza energicznie za pomocą bełkotki. Sorbitol ulega nią do kwasu 2-keto-L-gulonowego, który ulegając zobojętnieniu węglanem wapniowym, przechodzi w 2-keto-L-gulonian-wapniowy. Gdy koncentracja tegoż związku w brzezce wyniesie około 1 g w litrze, zaczyna się równomiernie i ciągle odprowadzać roztwór fermentacyjny przewodem na

5

filtr 2, a jednocześnie zaczyna się ciągle doprowadzać do kadzi 1 świeżo przygotowany roztwór ze zbiornika przygotowawczego 11 poprzez sterylizator 3.

W kadzi fermentacyjnej utrzymuje się w ten sposób stałą koncentrację 2-keto-L-gulonianu wapnia na poziomie około 1 g w litrze. Wartość pH roztworu utrzymuje się na poziomie 5—6 poprzez okresowe dodawanie do kadzi węglanu wapnia. Tymczasem roztwór fermentacyjny przechodząc przez filtr 2 dodaje się do kolumn kationitowych 4, gdzie zawarte w nim kationy wapniowe zostają wymienione na wodorowe po czym roztwór przedostaje się przez odbieralnik 5 do kolumn anionitowych 6 w których zostaje zatrzymany głównie kwas 2-keto-L-gulonowy, a brzeczka zawierająca inne substancje przechodzi do odbieralników 7, z których pompa 9 podaje ją do zbiorników przygotowawczych 11, do których dodaje się sorbitol w ilości ekwiwalentnej do ilości usuniętego z brzeczki kwasu 2-keto-L-gulonowego, pożywki dla bakterii wywaru drożdżowego i glikozy, również w ilości takiej aby uzupełnić ubytki w brzeczce do poziomu pierwotnego.

Roztwór ze zbiorników 11 dopływa ciągle do kadzi fermentacyjnej poprzez sterylizator i podgrzewacz 3, do której dodaje się stopniowo węglan wapniowy, celem utrzymywania wartości pH = 5,6, jak również utrzymuje się temperaturę około 29°C. Co pewien czas bada się brzeczke w kadzi pod względem składu mikrobiologicznego i chemicznego, aby zawczasu spostrzec fałszywy bieg procesu zapoczątkowany przypadkowym skażeniem. W takim przypadku należy zmienić kadź. Przy dokładnym przestrzeganiu warunków sterylizacji zdarza się to bardzo rzadko.

Gdy kolumna kationitowa ulegnie po pewnym czasie dezaktywacji, uaktywnia się ją przez przemycie 3% kwasem solnym, przy czym wyciek odzyskuje się.

6

Gdy natomiast dezaktywacji ulegnie kolumna anionitowa to jest, gdy ulegnie ona wysyceniu kwasem 2-keto-L-gulonowym, to roztwór pofermentacyjny przełącza się do innej kolumny anionitowej, a kwas 2-keto-L-gulonowy wypiera się okresowo z kolumny anionitowej 6 za pomocą kwasu solnego o stężeniu 3% dopływającego z dozownika 12, uzyskując w odbieralniku 8 wodny roztwór kwasu 2-keto-L-gulonowego o stężeniu około 10%. Kolumnę anionitową przemywa się następnie roztworem wodorotlenku anionu, celem jej uaktywnienia, aby była przygotowana do przyjęcia następnej ilości produktu.

Otrzymany wodny roztwór kwasu 2-keto-L-gulonowego nadaje się dobrze do bezpośredniej syntezy witaminy C.

Zastrzeżenie patentowe

2

Fermentacyjny sposób wytwarzania kwasu 2-keto-L-gulonowego z sorbitolu przy użyciu bakterii rodzajów *Acetobacter* lub *Pseudomonas* na podłożu odżywczym zawierającym węglan wapnia z zastosowaniem żywic jonowymiennych, **znamienny tym**, że fermentację prowadzi się w sposób ciągły, utrzymując w kadzi fermentacyjnej stężenie sorbitolu w zakresie 1,0—15% wagowych i stężenie 2-keto-L-gulonianu wapniowego w zakresie 0,01—1,0% wagowych, przez stałe odprowadzanie brzeczki do kolumn kationitowych, gdzie następuje wymiana kationów metalicznych z roztworu na jony wodorowe, a następnie do kolumn anionitowych, gdzie sorpcji ulega kwas 2-keto-L-gulonowy, i przez stałe doprowadzanie do kadzi fermentacyjnej wycieku z kolumn, po uzupełnieniu w nim surowców i po sterylizacji, przy czym kwas 2-keto-L-gulonowy wypiera się ze złoża anionitowego w znany sposób.

25

30

35

40

