



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

272 748

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 07 H 3/02

(21) PV 5349-89.M

(22) Prihlásené 19 09 89

(40) Zverejnené 14 05 90

(45) Vydané 25 11 91

(75) Autor vynálezu

KUBALA JOZEF ing., BRATISLAVA
ROSENBERG MICHAL ing. CSc., BRNO
KOČAN JOZEF RNDr., SMOLENICE
ŠTURDÍK ERNEST doc. ing. CSc., BRATISLAVA

(54)

Spôsob prípravy D-manózy a D-arabinózy

(57) Rieši sa príprava D-manózy a D-arabinózy z D-glukózy kombináciou biochemickej metódy. 10 až 60 % vodný roztok zmesi D-glukózy a D-manózy sa submerzne kultivuje s vláknitou hubou *Aspergillus niger* s výhodou kmeňom CCM 8004 pri teplote 25 až 35 °C, pri pH 3,0 až 7,5, pri miešaní 200 až 500 otáčok/min., vzdušení 0,2 až 1,5 objemu vzduchu na objem fermentačného média pri tlaku 0,05 až 0,2 MPa po dobu 20 až 72 hodín. Z reakčnej zmesi sa izoluje kryštalizáciou vo forme príslušnej soli kyselina D-glukonová, z ktorej sa peroxidom vodíka za prítomnosti železitých iónov s výhodou síranu železitoamónneho uvoľní D-arabínóza. Matečný lúh obsahujúci D-manózu po separácii D-glukonovej soli sa prečistí pomocou vymieňača kationov a aniónov.

Vynález sa týka spôsobu prípravy D-manózy a D-arabínózy z D-glukózy.

D-Manóza ako aj D-arabínóza patria medzi vzácné sacharidy aldózy, ktoré sa nachádzajú v prírode ojedinele.

D-Manóza sa môže pripraviť hydrolýzou mananov zo semien palmy *Phyttelephas macrocarpa* /R.Riese: Ber. 22, 609 (1889)/, z riasy *Porphyra umbilicalis* /C.S. Hudson, E.L. Jackson: Am. Chem. Soc. 56, 958 (1944)/ a bunečných stien kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* /J. Šandula, A. Vojteková: Folia Microbiol. 19, 94 (1974)/. Prípravu D-manózy z epimerizačnej zmesi pomocou fenylhydrazínu, anilínu alebo delením na kolónu naplnenej ionomienom s funkčnými sulfoskupinami vo vápenatej forme popisujú /V. Bílik AO. 149 051; J. Kubala, V. Bílik, J. Čaplovič, F. Rendoš, M. Repáš AO. 214 431; J. Kubala, J. Rosík AO. 233 220/.

D-Arabínóza nachádzajúca sa v prírode najčastejšie vo forme glykozidov tropických laliovitých rastlín *Aloe barbadensis* /M.E. Légar: Am. Chim. phys. 8, 265 (1917); C.S. Gibson, J.L. Simonson: J. Chem. Soc. 553 (1930)/ v niektorých prípadoch zo zmesi polysacharidov obsahujúcich D-arabínózu /W.N. Hawerth, P.W. Kent, M. Steay: J. Chem. Soc. 1211, 1220 (1948)/, z ktorých sa pripravuje po izolácii kyslou a enzymatickou hydrolýzou. Taktiež sa môže pripraviť sulfonovou degradáciou disulfonu D-manitolu /Donald, L. MacDonald: Methods in Carbohyd. Chem. Vol. I. 73 (1962)/. Oxidáciou D-glukózy pomocou chlórnanu sodného /R.L. Whistler, R. Schweiger: J. Am. Chem. Soc. 81, 5190 (1959); R.L. Whistler, J.N. Be Miller: Methods in Carbohyd. Chem. Vol. I. 71 (1962)/, alebo rozkladom glukonanu vápenatého s peroxidom vodíka za prítomnosti železitých iónov a meďnatých iónov /O. Ruff, G. Ollendorf: Ber. 33, 1798 (1900); R.C. Hockett, C.S. Hudson: J. Am. Chem. Soc. 56, 1632 (1934); G. Fletcher, J.H.W. Dichts, C.S. Hudson: J. Am. Chem. Soc. 72, 4546 (1950); V. Bílik AO. 232 647)/. Príprava D-arabínózy sa uskutočňuje z glukonanu vápenatého elektrolytickou oxidáciou za katalytického účinku ceričitých iónov /J. Kubala, Š. Kučár, K. Linek AO. 225 576/. Oxidácia D-glukózy na kyselinu D-glukonovú biochemickými postupmi je popísaná v prácach /S. Oga, K. Sate: Japan pat. 7461 384 (1974); T. Sonoyama, H. Tani, B. Kageyama, K. Kobayami, T. Honjo, S. Yagi: US. pat. 3 998 697 (1976); A. Gruager, W. Grueger: In. Biotechnology, Vol. 69, Verlag Chemie Weinheim (1984); M. Rosenberg, E. Šturdík, J. Gömöry, S. Stanek, R. Kacina, B. Škárka AO. 262 877/.

Uvedené metódy prípravy D-manózy a D-arabínózy mali nedostatky v tom, že ich príprava vzhľadom na spracovanie rôznych východziech surovín bola dlhá, dochádzalo k nebezpečnému zamorovaniu prostredia, výťažok medziproduktu bol nízky, čím príprava bola nákladná a konečné produkty nedosahovali požadovanú čistotu.

Uvedené nevýhody v podstatnej miere odstraňuje spôsob prípravy D-manózy a D-arabínózy podľa vynálezu tak, že sa použije ako východzia surovina zmes vodných roztokov D-glukózy a D-manózy. Je známe, že keď sa vodný alebo vodnoetanolický roztok aldózy D-glukózy podrobí zahrievaniu v kyslom prostredí za prítomnosti molybdenanových iónov dochádza k epimerizácii na D-manózu /V. Bílik: Chem. Zvesti 26, 372 (1972); M.L. Hayes, N.L. Pennige, A.S. Serianni, R. Barker: J. Am. Chem. Soc. 104, 6764 (1982); E.L. Clark Jr, M.L. Hayes, R. Barker: Carbohyd. Res. 153, 263 (1986); J. Kubala: Záverečná správa 1985, Chemický ústav CCHV SAV, Bratislava/.

Autori skúmali možnosť prípravy D-manózy a D-arabínózy zo zmesi D-glukózy a D-manózy a dospeli k tomuto vynálezu, keď zistili lepšie zúžitkovanie východzej látky a prípravu D-manózy a D-arabínózy v jednom stupni kombinovanou metódou biochemicky ako aj chemicky. Ako producent bol vytipovaný kmeň mikroorganizmu *Aspergillus niger* CCM 8004 schopný vysoko selektívne oxidovať D-glukózu na kyselinu D-glukonovú.

Spôsob podľa vynálezu spočíva v tom, že sa 10 až 60 % vodný roztok zmesi D-glukózy a D-manózy zmieša so zložkami fermentačného média obvyklými pre pestovanie mikroorganizmu rodu *Aspergillus*, zmes sa zaočkuje mikroorganizmom *Aspergillus niger*, s výhodou kmeňa CCM 8004. Fermentačná zmes sa submerzne kultivuje pri teplote 25 až 35 °C, pri pH 3,0 až 7,5, za miešania pri 200 až 500 ot/min., pri prevzdušnení 0,2 až 1,5 ob-

jemu vzduchu na objem fermentačného média; pri tlaku 0,05 až 0,2 MPa, po dobu 20 až 72 hodín. Po skončení fermentácie a po separácii bunečnej hmoty mikroorganizmu, sa kyselina glukonová oddelí kryštalizáciou od D-manózy vo forme odpovedajúcej soli s alkalickým kovom alebo kovom alkalickéj zeminy, z ktorej sa peroxidom vodíka za prítomnosti železitých iónov, s výhodou síranu železitoamónneho, uvoľní D-arabinóza. Matečný lúh obsahujúci D-manózu po separácii D-glukonovej soli sa prečistí pomocou vymieňača kationov a aniónov. Očkovanie fermentačného média mikroorganizmom *Aspergillus niger* CCM 8004 sa vykoná tak, že sa spórová suspenzia mutantu tohto kmeňa použije priamo na inokuláciu fermentačného média alebo sa z nej pripraví vegetačné inokulum, ktorým sa naočkuje fermentačné médium. Separovaná bunečná hmota mikroorganizmu sa s výhodou opakovane použije na konverziu vodného roztoku D-glukózy a D-manózy.

Základné morfológické a fyziologické charakteristiky mutantu *Aspergillus niger* N-XI, ktoré je uložené v Československej zbierke mikroorganizmov Univerzity J.E. Purkyně v Brne pod označením CCM 8004, sú podrobne uvedené AO. 262 877. Pre zaočkovanie fermentačných nádob je možné použiť spórové alebo vegetatívne inokulum mikroorganizmu.

Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy D-manózy a D-arabinózy oproti doterajším spôsobom prípravy je, že predmetný spôsob je hospodárnejší. Technologické operácie sú jednoduché, nenáročné na energiu. Veľmi dobre nahradzuje doterajšie spôsoby izolácie D-manózy z epimerizačnej zmesi pomocou aromatických aminov, anilínu, fenylydrazínu, ktoré sú nebezpečnými jedmi, resp. karcinogénnymi látkami, odstraňuje možnosť rizika vzniku choroby z povolania, nedochádza k zamorovaniu prostredia. Z komerčne dostupnej D-glukózy sa vyrobí veľmi vzácne dva monosacharidy D-manóza a D-arabinóza o vysokej čistote.

Vynález ilustruje nasledujúce príklady prevedenia, pričom sa však rozsah vynálezu v žiadnom smere neobmedzuje.

Príklad 1

Pripraví sa sterilné fermentačné médium, ktoré obsahuje 5 % hmot. D-manózy a 15 % hmot. D-glukózy a ďalšie chemikálie: 0,11 % hmot. dusičnanu vápenatého tetrahydrátu, 0,07 % hmot. síranu amónneho, 0,03 % hmot. dihydrogénfosforečnanu draselného, 0,025 % hmot. síranu horečnatého heptahydrátu, 0,025 % hmot. chloridu draselného. Do média sa pridá 3 % hmot. uhličitanu vápenatého, ktorý je sterilizovaný oddelene. Fermentácia prebieha v 5 dm³ nerezovom fermentore s centrálnou umiestneným miešadlom. Ako inokulum sa použije suspenzia spór plesne *Aspergillus niger* CCM 8004, kultivovanej 10 dní na sladínovom agare, pri 30 °C, ktorú pripravíme spláchnutím spór príslušným množstvom 0,1 % roztoku povrchovo aktívnej látky odpeňovača polyoxyetylén sorbitan monooleátu (Tween 80). Takto pripravenou suspenziou spór sa zaočkuje 3 dm³ fermentačného média tak aby počiatočná koncentrácia spór bola 10⁵ až 10⁶ l cm³ média. V prvej fáze fermentácie kľúčia spóry pri teplote 32 °C, miešaní 200 ot/min., vzdušnení 0,2 objemu vzduchu na objem fermentačného média a pri tlaku 0,05 MPa. Po 12 hodinách dochádza k vlastnej fermentácii; miešanie sa zvýši na 400 otáčok/min., vzdušnenie na 1 objem vzduchu/objem fermentačného média; teplota sa v priebehu fermentácie udržiava na 30 °C; vo fermentore je pretlak 0,15 MPa. Hodnota pH fermentačného média udržiavaná uhličitanom vápenatým sa mení z pH 7,3 zo začiatku fermentácie až na pH 3,7 na jej konci. Celková doba fermentácie je 30 až 35 hodín. Fermentačné médium obsahujúce kyseliny D-glukonovú a D-manózu, je po skončení fermentácie zbavené mikroorganizmu filtráciou a kyselina D-glukonová je po neutralizácii média uhličitanom vápenatým odseparovaná od D-manózy vo forme vápenatej soli kryštalizáciou. Matečný lúh sa perkoláciou deionizuje cez kolónu vymieňača kationov Ostion KS v M⁺ forme a vymieňača aniónov Wofatit SBW v OH⁻ forme. Roztok pri tlaku 100 kPa a teplote 40 °C sa zahusť na sirup; za horúca rozpustí v 90 % hmot. etanole v pomere 1 : 3 a vykryštalizuje. Vzhľadom na použité množstvo sacharidov vo fermentačnom médiu je výťažnosť D-manózy 92 %, $\alpha_D^{20} + 14^0$ (c=5 voda), teplota topenia 130 až 132 °C.

Do 50 litrového skleneného reakčného kotlíka opatreného miešadlom, ohrevom a chladením sa pripraví vodný roztok 8,8 % hmot. glukonanu vápenatého, 0,5 % hmot. síranu železitoamónneho, ktorý sa vyhreje na teplotu 80 °C a postupným pridávaním 10 % hmot. peroxidu vodíka reakcia prebieha pri teplote 48 °C po dobu 4 hod. Reakčná zmes sa neutralizuje 25 % hmot. kyselinou sírovou na pH 7 a nerozpustné soli sa odfiltrujú a premyjú vodou. Filtrát sa deionizuje perkoláciou cez kolónu vymieňača katiónov Ostion KS v H⁺ forme a vymieňača aniónov Wofatit SBW v Ac⁻ forme. Roztok pri tlaku 100 kPa a teplote 40 °C zahustí na sirup, rozpustí v horúcom 96 % hmot. etanole a vykryštalizuje. D-Arabinóza $\alpha/\beta^{20} = 104^0$ (c=5 voda), teplota topenia 160 až 161 °C sa získa v 46 % výťažku.

Príklad 2

Pripraví sa inokulačné médium, ktoré obsahuje 13 % hmot. D-manózy a 13 % hmot. D-glukózy a ďalšie chemikálie: 0,19 % hmot. dusičnanu vápenatého tetrahydrátu, 0,11 % hmot. síranu amónneho, 0,025 % hmot. dihydrogénfosforečnanu draselného, 0,025 % hmot. síranu horečnatého heptahydrátu, 0,025 % hmot. chloridu draselného. Do média sa pridá 3,0 % hmot. uhličitan vápenatý, ktorý sa sterilizuje oddelene. Sterilné inokulačné médium o objeme 3 dm³ je naočkované spórmi suspenzie mikroorganizmu *Aspergillus niger* CCM 8004 tak, ako je to popísané v príklade 1. Kultivácia prebieha v 5 dm³ fermentore pri 32 °C; miešanie 200 ot./min., vzdušenie 0,2 objemu vzduchu/objem fermentačného média, pri tlaku 0,05 MPa. Po 20 hodinovej kultivácii sa príslušný diel fermentačného tanku, ktorý obsahuje 12 dm³ produkčného média, obsahujúceho 13 % hmot. D-glukózy a 13 % hmot. D-manózy a ďalšie minerálne ako je uvedené v príklade 1. Do fermentačného média je pridávaný 3,0 % hmot. uhličitan vápenatý, ktorý udržiava pH 3,5 až 7. Fermentácia prebieha pri 30 °C; miešaní 400 ot./min., vzdušnení 1,0 objemu vzduchu/objem fermentačného média, pretlaku 0,15 MPa po dobu 20 až 22 hodín. Ďalšie spracovanie ako v príklade 1.

Výťažnosť kyseliny D-glukonovej je 94 %. D-Manóza $\alpha/\beta^{20} = 13,8^0$ (c=5 voda), teplota topenia 130 až 132 °C. Výťažnosť 90 %. D-Arabinóza $\alpha/\beta^{20} = 103,8^0$ (c=5 voda), teplota topenia 161 až 162 °C. Výťažnosť 44 %.

Príklad 3

Pripraví sa inokulačné médium, jeho zloženie je uvedené v príklade 2. V 20 dm³ fermentore je 12 dm³ inokulačného média zaočkované spórovou suspenziou mikroorganizmu *Aspergillus niger* CCM 8004 tak, ako je to v príklade 1. Kultivácia prebieha pri 30 °C vzdušnení 0,5 objemu vzduchu/objem fermentačného média, miešaní 300 ot./min., pH je udržiavané prídavkom 15 mol/dm³ hydroxidu sodného na hodnotu 6,2. Po 20 hodinovej kultivácii sa príslušný podiel takto pripravovaného inokula, postačuje k dosiahnutiu 10 % objemu inokula, vnesie do 100 dm³ fermentačného média, ktoré obsahuje 25 % hmot. D-glukózy, 25 % hmot. D-manózy a ďalšie minerálne soli ako je uvedené v príklade 1. Fermentácia prebieha pri teplote 30 °C; miešaní 450 ot./min., vzdušnení 1,2 objemu vzduchu/objem fermentačného média, pri tlaku 0,15 MPa. Hodnota pH je udržiavaná prídavkom 15 mol./dm³ hydroxidu sodného na hodnotu pH 5,6. Doba fermentácie nepresahuje 28 až 32 hodín. Po separácii mycélia a filtrácii je kyselina D-glukónová odseparovaná od D-manózy kryštalizáciou vo forme sodných solí. Výťažok kyseliny D-glukonovej je 94 %. Matečný lúh po odstránení glukonátu sodného sa perkoláciou deionizuje cez kolónu vymieňača kationov Ostion KS v H⁺ forme a vymieňača aniónov Ostion AD v OH⁻ forme. Roztok pri tlaku 100 kPa a teplote 40 °C zahustí na sirup, za horúca rozpustí v 90 % etanole v pomere 1 : 3 a vykryštalizuje. D-Manóza $\alpha/\beta^{20} = 14^0$ (c=5 voda), teplota topenia 130 až 132 °C a získa sa v 88 % výťažku.

Do 50 litrového skleneného reakčného kotlíka opatreného miešaním a chladením sa pridá vodný roztok 8,8 % hmot. glukonanu sodného, 0,5 % hmot. síranu železitoamónneho a za intenzívneho miešania postupne sa pridáva 10 % hmot. peroxid vodíka pri teplote

48 °C po dobu 4 hod. Reakčná zmes sa deionizuje perkoláciou cez kolónu vymieňača katiónov Wofatit KPS v H^+ forme a vymieňača aniónov Wofatit SBV v Ac^- forme. Pri tlaku 100 kPa a teplote 40 °C sa roztok zahusťí na sirup, rozpustí v horúcom 95 % hmot. etanole v pomere 1 : 4 a kryštalizuje. D-Arabinóza $[\alpha]_D^{20} = 104,6^\circ$ (c=5 voda), teplota topenia 160 až 162 °C sa získala v 43 % výťažku. D-Manóza sa dá získať i temer 100 % výťažku ak sa pracuje vo fermentore s objemom cca 10 litrov. Straty do 10 % sú spôsobené stratami výroby v priemyselnom merítke o objeme cca 1500 litrov.

D-Manóza ako aj D-arabinoza majú použitie v chémii a biochémií sacharidov, medicíne, potravinárskom a farmaceutickom priemysle.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Spôsob prípravy D-manózy a D-arabinózy z D-glukózy, spočívajúci v tom, že sa roztok D-glukózy podrobí zahrievaniu v kyslom prostredí, pričom sa časť D-glukózy epimerizuje na D-manózu, vyznačujúci sa tým, že sa 10 až 60 % hmot. roztok zmesi D-glukózy a D-manózy zmieša so zložkami fermentačného média obvyklými pre pestovanie mikroorganizmu rodu *Aspergillus*, zmes sa zaočkuje mikroorganizmom *Aspergillus niger*, následne sa submerzne kultivuje pri teplote 25 až 35 °C; pri pH 3,0 až 7,5; za miešania pri 200 až 500 otáčok/min., pri vzdušnení 0,2 až 1,5 objemu vzduchu na objem fermentačného média; pri tlaku 0,05 až 0,2 MPa, po dobu 20 až 72 hodín; pričom po skončení fermentácie a po separácii bunečnej hmoty mikroorganizmu, sa kyselina glukonová oddelí kryštalizáciou od D-manózy vo forme odpovedajúcej soli s alkalickým kovom alebo kovom alkalickéj zeminy; z ktorej sa peroxidom vodíka za prítomnosti železitých iónov s výhodou síranu železitoamónneho uvoľní D-arabinóza a matečný lúh obsahujúci D-manózu po separácii D-glukonanovej soli sa prečistí pomocou vymieňača katiónov a aniónov.
2. Spôsob prípravy podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa použije mikroorganizmus *Aspergillus niger* CCM 8004.
3. Spôsob prípravy podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa očkovanie fermentačného média mikroorganizmom *Aspergillus niger* vykoná tak, že sa spórová suspenzia mutantu tohto kmeňa použije priamo na inokuláciu fermentačného média alebo sa z nej pripraví vegetačné inokulum, ktorým sa naočkuje fermentačné médium.
4. Spôsob prípravy podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa separovaná bunečná hmota mikroorganizmu opakovane použije na konverziu vodného roztoku D-glukózy a D-manózy.