



Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu nr

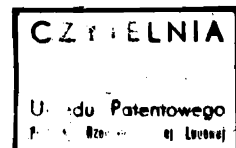
Int. Cl.² C12D 13/04

Zgłoszono: 29.12.78 (P. 212405)

Pierwszeństwo:

Zgłoszenie ogłoszono: 19.11.79

Opis patentowy opublikowano: 30.06.1982



Twórcy wynalazku: Ewa Tomczak, Jerzy Ziobrowski

Uprawniony z patentu tymczasowego: Akademia Ekonomiczna im. Oskara Langego,
Wrocław (Polska)

Sposób wytwarzania dekstranu

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania dekstranu o średniej masie cząsteczkowej 40 000–80 000, w procesie dwustopniowym, stosowanego do produkcji środka krwiozastępczego.

Znane są sposoby produkcji dekstranu klinicznego, na przykład z opisu patentowego NRD nr 21 324, przez poddanie dekstranu naturalnego hydrolizie. W wyniku frakcjonowanego wytrącania otrzymuje się dekstran o masie cząsteczkowej 40 000–80 000 z wydajnością 15–25% w stosunku do sacharozy.

Znane są metody bezpośredniej biosyntezy dekstranu o pożądanej średniej masie cząsteczkowej w procesie pełnokulturowym wielostopniowym, na przykład z opisów patentowych NRD nr nr 35 367, 62 647 oraz opisu patentowego ZSRR nr 493 229. Proces taki polega na hodowli bakterii, w pierwszym etapie na pożywkach zawierających jako źródło węgla monocukry o niskich stężeniach, niskocząsteczkowe alkohole alifatyczne, zhydrolizowane proteiny, kwasy jedno lub dwukarboksylowe oraz źródła azotu i sole mineralne w określonych stężeniach. Po uzyskaniu maksymalnego wzrostu bakterii całość pożywki przenoszona jest do roztworu zawierającego, obok źródeł azotu i soli mineralnych, sacharozę w stężeniach 10–60% oraz elementy dekstranu niskocząsteczkowego w ilości 0,5–10%. Po zakończeniu biosyntezy dekstran wyodrębniony jest znanymi metodami. W procesie pełnokulturowym wielostopniowym osiąga się wydajność około 30% frakcji o pożądanej średniej masie cząsteczkowej.

2

Znane są również sposoby dotyczące syntezy enzymatycznej, na przykład ze szwedzkiego opisu patentowego nr 157 635, polegające na bezpośrednim działaniu roztworów preparatów enzymatycznych dekstranosacharaz na roztwory zawierające 10–50% sacharozy i 1–10% dekstranu niskocząsteczkowego. Metoda ta pozwala na uzyskanie produktu o wysokiej czystości, z wydajnością pożądaną frakcji około 40%.

Wadą metody pełnokulturowej wielostopniowej jest duża zawartość azotu bakteryjnego w produkcie i trudność otrzymywania klarownych roztworów. Metoda syntezy enzymatycznej daje wprawdzie dobrą wydajność, ale wymaga stosowania wyodrębnionych enzymów, oddzielonych od tworzącego się dekstranu wysokocząsteczkowego. Podnosi to w rezultacie koszty produkcji. Sposób wytwarzania dekstranu o średniej masie cząsteczkowej 40 000–80 000 w procesie pełnokulturowym, wielostopniowym wg wynalazku polega na tym, że w etapie hodowli bakterii *Leuconostoc mesenteroides* dodaje się dekstran niskocząsteczkowy o masie 3 000–20 000 w ilości 0,5–2,0%. W trakcie procesu hodowli stosuje się stabilizację pH w granicach 5,5–6,5. Proces syntezy enzymatycznej przebiegający z użyciem otrzymanego roztworu dekstranosacharaz (po oddzieleniu biomasy bakteryjnej, na przykład przez odwirowanie) prowadzi się z zastosowaniem dozowania roztworu sacharozy i elementów dekstranowych. Dozowana mieszanina sacharozy i dekstranu niskocząsteczkowego przygotowana jest w proporcji 10 : 1. Na początku procesu syntezy

enzymatycznej zużywa się 20–30% całkowitej ilości sacharozy i elementów dekstranowych, a następnie dozuje się pozostałą ilość do końcowego stężenia sacharozy 30–50% w porcjach 20–25 g/l dm³ na jedną jednostkę standardową aktywności enzymów w ciągu 1 godziny (20–25 g/dm³ × J × h).

Dodatek niskocząsteczkowego dekstranu do podłoża hodowlanego zapobiega tworzeniu się dekstranu wysokocząsteczkowego w etapie tworzenia dekstranosacharaz, nie hamując rozwoju bakterii. W ten sposób eliminuje się konieczność oddzielania enzymów od dekstranu wysokocząsteczkowego przed użyciem ich do syntezy dekstranu. Dozowanie roztworu sacharozy i elementów dekstranowych powoduje podwyższenie wydajności w wyniku uniknięcia tworzenia się oligosacharydów oraz umożliwia skrócenie czasu przerobu określonej ilości roztworu sacharozy na skutek wyeliminowania hamowania szybkości reakcji nadmiarem substratu.

Sposób według wynalazku zapewnia również wykorzystanie roztworu zawierającego niskocząsteczkowy dekstran, który stosowany w procesie hodowli lub biosyntezy zwiększa wydajność liczoną w stosunku do sacharozy.

Przykład I. Do fermentatora zaopatrzonego w mieszadło, termometr i urządzenie utrzymujące stałą wartość pH wprowadza się pożywkę zawierającą sacharozę w ilości 2%, dekstran o masie cząsteczkowej około 4000 — 1%, autolizat drożdżowy — 1%, KH₂PO₄ — 0,5% oraz inne sole mineralne.

Po sterylizacji i ochłodzeniu pożywkę szczepi się kulturą bakterii szczep *Leuconostoc mesenteroides* i prowadzi się hodowlę 24 godziny przy pH = 6,0. Po zakończeniu hodowli bakterie oddziela się przez wirowanie, a uzyskany roztwór rozcieńcza się do otrzymania aktywności dekstranosacharaz i J/cm³. Tak przygotowany roztwór enzymów miesza się z roztworem sacharozy 20% i dekstranem o masie cząsteczkowej 4000 — 1%. Syntezę enzymatyczną prowadzi się w temperaturze 25°C przy pH = 5,5. W trakcie syntezy dozuje się wodny roztwór sacharozy zawierający 80% cukru i 8% dekstranu niskocząsteczkowego do końcowego stężenia 30%. Dozowanie roztworu sacharozy z dekstranem prowadzi się przez 8 godzin, wdozowując co godzinę 30 cm³ na każdy 1 dm³ objętości początkowej, co odpowiada 24 g sacharozy dm³ × J × h.

Po zakończeniu syntezy sprowy dekstran wytrąca się dwukrotną ilością etanolu i po wyodrębnieniu frakcji

nuje się przez stopniowe strącanie etanolem. Dekstran o masie cząsteczkowej 40 000–80 000 jest otrzymywany z wydajnością 35,5%.

Przykład II. W fermentatorze, jak w przykładzie I, umieszcza się pożywkę zawierającą: sacharozę — 2%, dekstran o masie cząsteczkowej 4 000 — 1,5%, ekstrakt drożdżowy — 1%, KH₂PO₄ — 2,5% oraz inne sole mineralne. Po sterylizacji pożywkę szczepi się kulturą bakterii *Leuconostoc mesenteroides* i prowadzi hodowlę, jak w przykładzie I. Do uzyskanego w wyniku hodowli roztworu dekstranosacharaz po rozcieńczeniu do aktywności 0,5% dodaje się sacharozę do stężenia 10%, a następnie dozuje się 80% wodny roztwór sacharozy i 12% elementów dekstranowych o masie cząsteczkowej około 15 000 otrzymanych po wytrąceniu frakcji dekstranu o masie cząsteczkowej poniżej 30 000. Dozowanie roztworu sacharozy i dekstranu prowadzi się co 2 godziny dodając 30 cm³ roztworu na każdy 1 dm³ roztworu początkowego, co odpowiada 24 g sacharozy (1 dm³ × 1 J × h).

Stężenie końcowe sacharozy wynosi około 50%. Reakcję syntezy enzymatycznej prowadzi się w temperaturze 30°C przy pH = 5,5. Po wytrąceniu i następnie rozfrakcjonowaniu otrzymuje się dekstran z wydajnością 39,6% w stosunku do sacharozy.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania dekstranu o średniej cząsteczkowej 40 000–80 000, polegający na biosyntezie dekstranosacharaz w czasie hodowli bakterii *Leuconostoc mesenteroides*, oddzieleniu bakterii, zwłaszcza przez filtrację lub odwirowanie, oraz syntezie enzymatycznej dekstranu prowadzonej z zastosowaniem otrzymanych roztworów enzymatycznych i roztworów wodnych sacharozy, z dodatkiem elementów dekstranowych, a następnie na wydzieleniu produktu znanymi metodami, **znamienny tym**, że proces hodowli bakterii prowadzi się z dodatkiem dekstranu niskocząsteczkowego o masie 3 000–20 000 w ilości 0,5–2,0% z jednoczesną stabilizacją pH w granicach 5,5–6,5, a w syntezie enzymatycznej wprowadza się na początku 20–30% całkowitej ilości sacharozy i elementów dekstranowych, używanych w proporcjach 10 : 1, a następnie dozuje się pozostałą ilość sacharozy i elementów dekstranowych do końcowego stężenia sacharozy 30–50% w porcjach 20–25 g/l dm³ × 1 J × 1 h.