

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY

B

(11)

192765

Bejelentés napja: (22) 1982.06.30. (21) (2127/82)

Közzététel napja: (41) (42) 1983.12.28.

Megjelent: (45) 1988.09.30.

Nemzetközi
osztályozás:
(51) NSZO,
C 12 P 7/58

Feltalálók: (72)

Jaksa István, 30%,
Gyurán János, 22,5%,
Németh Sándor, 22,5%,
dr. Trischler Ferenc, 10%,
dr. Udvardy Nagy Istvánné, 15%,
Budapest

Szabadalmas: (73)

Richter Gedeon Vegyészeti Gyár
Rt, Budapest

(54) ELJÁRÁS FERMENTÁCIÓBAN KELETKEZŐ GLÜKONSAV MENNYISÉGÉNEK NÖVELESÉRE

1 (57) KIVONAT

Az eljárás szerint *Aspergillus* törzsek felhasználásával végzett fermentációban keletkező glükonsav mennyiségét oly módon növelik, hogy az önmagában ismert fermentációs eljárás során keletkező és a kataláz enzim által el nem bontott hidrogénperoxidot 10-100 mg/liter, előnyösen 10-50 mg/liter koncentrációban kémiai katalizátorral, előnyösen mangán(III)-, vagy mangán(IV)-, vagy ólom(IV)-oxiddal elbontják.

A glükonsav sói értékes terápiás-, valamint ipari segédanyagok.

192765

A találmány tárgya új eljárás glükonsav termelésre képes, előnyösen *Aspergillus niger* törzs termelőképességének növelésére.

Ismertes, hogy a baktérium-, vagy gomba-törzsek alkalmazásával végzett glükóz-oxidáció egyike a legkorábban alkalmazott ipari fermentációs eljárásoknak. A folyamatban keletkező glükonsav alkalmas arra, hogy különböző egy és kétértékű kationokkal sőt képezve az illető kationok, elsősorban fémek, biológiai hatékonyságát elősegítse. A nagyüzemi módszerek elterjedésével fokozott szükség van az élő szervezet igényeinek megfelelő fémsó-arányok beállítására. A glükonsav sói közül kiemelkedő jelentőségű a kalcium-glukonát, mely a kalcium bevitelét segíti elő terápiás célok szolgálatában.

Jelentős a glükonsav ammónium-, nátrium- és kálium-sója mint ipari termék, de ezek egyúttal intermedierek is lehetnek az egyéb glukonát-sók előállításánál. A forgalmazott fémsók közül a kalcium-, magnézium-, kobalt-, réz-, vas-, mangán-, kálium- és a cink-glukonát a legismertebb.

Nagy mennyiségű glükonsav-sót használt fel az építőipar (cementkötés-gyorsítóként), a fémipar (rozsdaeltávolításban, korrózióvédelemben), a textilipar (felületkezelésnél), az élelmiszeripar (diétás készítményekben) és a kozmetikai ipar (dezodoroknál) is.

Sajátos módon a glükonsav mikrobiológiai előállításánál a kitermelés a ma ismert publikus adatok alapján sem éri el a kívánt szintet, miután átalakulatban szubsztrát - elsősorban glükóz - marad a rendszerben. A legutóbbi időben ezért több próbálkozás történt a hatékonyabb konverzió érdekében.

Az 1 817 907 sz. NSZK-beli közzétételi iratban ismertetett eljárás szerzői például úgy próbálják növelni a hatékonyságot, hogy a pH-értéket szűkebb tartományban (pH=5-7) tartják és a glükózt fokozatosan adagolják a rendszerhez.

Az eljárás hátránya, hogy a glükózt külön kell sterilizálni és a többszöri beadagolás miatt veszélyeztetett a fermentor sterilítása.

Más esetben mutáns törzseket állítanak elő, például a 141 129 sz. indiai szabadalmi leírás szerint. A konverzió és a hatásfok ez esetben sem kielégítő, mivel a keletkező glükonsavat kalcium-karbonáttal neutralizálják, így a keletkezett kalcium-glukonát kiválik és a fermentlé nehezen kezelhető heterogén fázisú lesz.

Más fejlesztési törekvés a szubsztrát megváltoztatásával olcsóbb nyersanyag hasznosítására vonatkozik. Így az 50 154 484 sz. közrebocsátott japán szabadalmi bejelentésben szaharózt, az 55 023 975 sz. közrebocsátott japán szabadalmi bejelentésben cellulózt alkalmaznak szubsztrátként. Az eljárások hátránya az, hogy az előbbi eljárásban folyamatosan fruktóz keletkezik és ezt el kell távolítani a rendszerből, míg a másik eljárás-

ban a cellulóz hiányos lebontása limitálja a glükóz átalakítás sebességét.

A találmány célja az ismert módszerek hátrányainak kiküszöbölésével olyan eljárás kidolgozása, melynek során egyszerű módon gyakorlatilag teljes konverzió érhető el és az átalakítás után kapott termék nem tartalmaz átalakulatlan szubsztrátot.

Munkánk során abból indulunk ki, hogy a glükóz mikrobiológiai oxidációjának enzimes mechanizmusát vizsgáltuk. Ismert, hogy a reakció enzimes mechanizmusa a következő: beta-D-glükopiranozt a glükóz-oxidáz-enzim D-glükonsav-delta-laktonná oxidálja a glükóz-oxidáz koenzimje (FAD=Flavin-adenin-dinukleotid) redukciója közben, mely molekuláris oxigén belépésével visszaoxidálódik. Ezután a FADH₂-ről felszabaduló hidrogén a levegő oxigénjével hidrogénperoxidot képez. A keletkező glukonolakton víz és az alkalmazott kation belépésével megképzí a kívánt sőt.

Megállapítottuk, hogy a reakció csak abban az esetben végezhető megfelelő sebességgel, megfelelő hatásfokkal és a folyamat csak abban az esetben tartható fenn gyakorlati célokat is kielégítő ideig, ha a második ún. kísérő, vagy segédreakcióban a keletkező hidrogénperoxid elbomlik. Ellenkező esetben a felhalmozódó hidrogénperoxid toxikussá válik a glükózoxidázra és annak működését leállítja. Sőt, amennyiben az eljárás ép sejtes tenyésztéssel történik és a biokonverzió párhuzamosan fut a mikroorganizmus növekedésével, úgy a hidrogénperoxid hiányos lebontása a sejt növekedését is leállítja.

A glükonsav termelésére használt mikroorganizmusok különböző mértékben képesek kataláz enzim termelésére, az elvileg biztosítja, hogy a hidrogénperoxidból ismét víz és oxigén szabaduljon fel, a gátló molekula bontása tehát egyidejűleg a szükséges oxigén pótlását is szolgálja.

Vizsgálataink során azt a váratlan megfigyelést tettük, hogy glükóz-oxidázzal és -katalázal rendelkező mikroorganizmus ép sejtes tenyésztését alkalmazva a két funkció természetes egyensúlya csak azért állhat be, mert a köztes hidrogénperoxid halmozódása fékezi az első reakció sebességét, a sebességcsökkenés pedig lehetőséget ad a második folyamat arányának helyreállítására.

Kataláz aktivitás növelésére végzett vizsgálataink azt igazolták, hogy a mikroorganizmus aktivitása a törzs szelekciójával, a pH-érték pontosításával, az előtenyésztés változtatásával, vagy a hidrogénperoxidot termelő szubsztrát fokozatos adásával csak igen kis mértékben javítható és a kataláz-aktivitás érdekében végzett körülményváltozások sok esetben a folyamat más tényezőinek hátrányára vannak. Így például, ha a pH-t az enzimes hidrogénperoxid bontásnak kedvező 6,0 feletti értékre emeljük, ez hátrányos az alacsonyabb tartományban kedvezően működő glükózoxidázra és ugyancsak

kedvezőtlen a kalcium-glukonátot eredményező fermentációnál, mert a keletkező termék kiválásának veszélyét jelenti.

Találmányunk azon a felismerésen alapul, hogy ha az átalakítási közeghez adott koncentrációban kémiai katalizátort adunk, a keletkező hidrogénperoxid lebomlása lényegesen meggyorsul és teljessé válik. A katalizátor a szükséges pontos mennyiségben adagolható, vizes oldatban könnyen bevihető és a felhasznált koncentrációban a mikroorganizmusra nem káros.

A fentiek alapján a találmány eljárás *Aspergillus* törzsek felhasználásával végzett fermentációban keletkező glükonsav mennyiségének növelésére, amely abban áll, hogy az önmagában ismert fermentációs eljárás során keletkező és a kataláz enzim által el nem bontott hidrogénperoxidot 10-100 mg/liter, előnyösen 10-50 mg/liter koncentrációban kémiai katalizátorral, előnyösen mangán(III)-, mangán(IV)- vagy ólom(IV)-oxiddal elbontjuk.

A találmány szerinti eljárás egy előnyös kivitelezési módja szerint eljárva a katalizátort 10-50 mg/liter fermentlé mennyiségében a fermentáció indításakor egyszerre vagy a folyamat közben ismételt adagolással juttatjuk a rendszerbe.

A szükséges katalizátor-mennyiség kiszámítását célszerűen úgy végezzük, hogy meghatározzuk a rendszer glükóz-oxidációs sebességét, ebből a hidrogénperoxid keletkezési sebességét és olyan mennyiségű kémiai katalizátort alkalmazunk, mely a keletkező peroxid 30-60%-ának azonos sebességű lebontására képes.

A találmány szerinti eljárás előnyei az alábbiakban foglalhatók össze:

1. A kémiai katalizátorral kiegészített biokonverziós rendszerben 300-350 g/liter glükóz oxidálható anélkül, hogy ismételt szubsztrát adagolásra volna szükség.
2. A rendszer pH-ja a folyamatra kedvező 5,5-6,0 értéken tartható.
3. A keletkező glükonsav tetszés szerint leköthető kalcium-, nátrium- vagy ammónium-só formájában.
4. Az átalakítás sebessége másfél-kétszeresére nő, ami elsősorban a biokonverzió előrehaladott fázisában jelent lényeges különbséget, ahol kémiai katalizátor nélkül a hidrogénperoxid által károsított sejtek aktivitása rohamosan romlik.
5. Az eddig ismert eljárásoknál a fokozatos sejtkárosodás következtében általában nem teljes a glükóz konverziója, egyes esetekben az átalakítás 5-10% maradék szubsztrátnál leáll. A káros hidrogénperoxid lebontása révén az oxidáció határfoka javul és az elérhető konverzió 99% vagy annál jobb érték.
6. Jobb hatásfokú konverzió miatt javul a termék minősége, csökken a termék redukáló-cukor tartalma.

7. Az eljárás alkalmazásának módja egyszerű, nem kíván külön berendezést.

A találmány szerinti eljárás kivitelezését az alábbi példákon szemléltetjük:

1. példa

Aspergillus niger (ATCC 9029; NRRL-3 jelű) törzssel 10 literes laboratóriumi fermentorban 5 l-es hasznos térfogatban sterilen végeztük a fermentációt. A táptalaj összetétele:

| | |
|-----------------------------|-----------------------|
| glükóz | 200.0 g |
| kálium-klorid | 0.2 g |
| diammónium-hidrogén-foszfát | 2.0 g |
| karbamid | 1.0 g |
| magnán(IV)-dioxid | 0.020 g=20 mg/1000 ml |

Az inokulum spóra-szuspenzió mennyisége a hasznos térfogat 0.2%-a. A tenyésztést 32-34 °C-on 1 liter levegő/liter fermentlé percenkénti levegőztetés mellett végezzük. A fermentáció ideje 36 óra, a maradék glükóz mennyisége 0,3 tömeg%. A sejtmentes fermentlevet 55-60 °C-ra melegítjük, majd egy órán át keverjük, közben literenként 5 g aktív szénrel derítjük. Az oldatlan részt és a szénelt kiszűrjük, majd az oldathoz még melegen literenként 25 g kalcium-karbonátot adunk és annyi jégecet csepegtetünk, hogy az oldat pH-ja 4,8-5,2 érték között legyen. A kalcium-karbonát teljes beoldódása (ezt a széndioxid-fejlődés megszűnése jelzi) után az oldatot szobahőmérsékletre hűtjük, majd literenként 100-500 ml metanol hozzáadásával kristályosítjuk. A kristályokat szűrjük, desztillált vízzel mossuk, súlyállandóig szárítjuk. Termék: 185,5 g/l kalcium-glukonát.

A termék minősége megfelel a gyógyszerkönyvi előírásoknak, a Fehling-reakció negatív.

2. példa

Aspergillus niger (ATCC 9029; NRRL-3 jelű) 48 órás rázott tenyészetével oldottuk a 6 liter hasznos térfogatú fermentort steril körülmények között. Az inokulum mennyisége a táptalaj térfogatának 2%-a.

Az inokulum táptalaj összetétele:

| | |
|-------------------------------------|----------------|
| glükóz | 200.0 g |
| kukoricalekvár | 10.0 g |
| kálium-klorid | 0.2 g |
| magnézium-szulfát | 0.1 g |
| kálium-dihidrogén-foszfát | 0.25 g |
| kalcium-karbonát | 30.0 g/1000 ml |
| A főfázis táptalajának összetétele: | |
| glükóz | 300.0 g |
| diammónium-hidrogén-foszfát | 2.0 g |

karbamid 1.0 g
 kálium-klorid 0.2 g
 mangán(IV)-dioxid 20.0 mg/1000 ml

A fermentációt 32-34 °C-on végeztük 1 liter levegő/liter fermentlé/perc levegőztetés mellett. A tenyésztés alatt a rendszer pH-értékét 5,9-6,0 között tartottuk nátrium-hidroxid-oldat adagolásával. A fermentáció 16. órájában 30 mg mangán(IV)-dioxidot adtunk az elegyhez.

A fermentáció ideje 36 óra, a maradék glükóz mennyisége 0,2 tömeg%. A fermentléből az 1. példában ismertetett tisztítási lépések után 290 g/l nátrium-glukonátot állítottunk elő.

3. példa

Inokulumként *Aspergillus carbonarius* ATCC-6276 jelű törzssel kapott spóra-szuszpenziót használtunk. Az inokulum mennyisége a táptalaj 0,2 térfogat százalékára.

A táptalaj

összetétele:

glükóz 300.0 g

diammónium-hid-

rogén-foszfát 2.0 g

karbamid 1.0 g

kálium-klorid 0.2 g

mangán(IV)-
 -dioxid 20.0 mg/1000 ml

6 liter hasznos térfogatú fermentorban végeztük a tenyésztést 32-34 °C-on 1 liter levegő/liter fermentlé percenkénti levegőztetés mellett. A keletkező glükonsav közömbösítésére ammónium-hidroxidot használtunk úgy, hogy a pH-értékét 5,9-6,0 közötti értéken tartottuk. A mangán(IV)-dioxid adagolását két részletben megismételtük.

8. órában +30 mg/l

16. órában +50 mg/l

Az átalakítás ideje 42 óra, a maradék glükóz mennyisége 0,1 tömeg%. Az ammónium-glukonát-tartalmú fermentlé feldolgozását az 1. példában megadott módszer szerint végeztük.

Termék: 290 g/l ammónium-glukonát.

4. példa

Mindenben a 2. példában ismertetett módon jártunk el, azzal az eltéréssel, hogy inokulumként *Aspergillus carbonarius* ATCC-6276 jelű törzs 48 órán át rázott tenyészetét alkalmaztuk.

Az inokulum mennyisége a táptalaj térfogatának 2%-a.

Termék: 291,0 g/l nátrium-glukonát.

5. példa

Mindenben a 2. példában ismertetett módon jártunk el, azzal az eltéréssel, hogy katalizátorként 50 mg mangán(III)-oxidot használtunk.

Termék: 288,0 g/l nátrium-glukonát.

6. példa

Mindenben a 4. példában ismertetett módon jártunk el, azzal az eltéréssel, hogy katalizátorként 45 mg ólom(IV)-oxidot használtunk.

Termék: 287,5 g/l nátrium-glukonát.

SZABADALMI IGÉNYPONT

Eljárás *Aspergillus* törzsek felhasználásával végzett fermentációban keletkező glükonsav mennyiségének növelésére, azzal jellemelve, hogy az önmagában ismert fermentációs eljárás során keletkező és a kataláz enzim által el nem bontott hidrogénperoxidot 10-100 mg/liter, előnyösen 10-50 mg/liter koncentrációban kémiai katalizátorral, előnyösen mangán(III)-, vagy mangán(IV)-, vagy ólom(IV)-oxiddal elbontjuk.

Rajz nélkül

A kiadásért felel a Közgazdasági és Jogi Könyvkiadó igazgatója

88.561.66-4 Alföldi Nyomda Debrecen - Felelős vezető: Benkő István vezérigazgató

5