

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

130 289

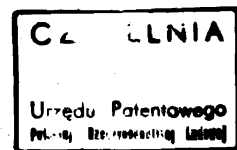
Patent dodatkowy
do patentu —

Zgłoszono: 82 08 10 (P. 237852)

Pierwszeństwo: 81 08 11 Republika
Federalna Niemiec

Zgłoszenie ogłoszono: 83 03 28

Opis patentowy opublikowano: 1985 08 30



Int. Cl.³ C12P 7/56
//C12R 1/225

Twórca wynalazku: —

Uprawniony z patentu: Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt nad Menem
(Republika Federalna Niemiec)

Sposób wytwarzania kwasu D-mlekowego

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania kwasu D-mlekowego na drodze fermentacyjnej.

Z brytyjskiego opisu patentowego nr 1 157 213 znany jest sposób wytwarzania kwasu D-mlekowego na drodze fermentacyjnej. Stosowany w tym sposobie *Lactobacillus leichmannii* ATCC 4797 jest w stanie wytworzyć w ciągu 60 godzin 113 g kwasu D-mlekowego w 1 litrze pożywki zawierającej obok innych zwykłych dodatków glukozę albo melasę z buraków cukrowych.

Ze względu na wzrastające zapotrzebowanie na kwas D-mlekowy jako substancję wyjściową do chemicznych syntez związków optycznie czynnych powstała konieczność opracowania bardziej wydajnego sposobu jego wytwarzania. Chodziło przy tym zwłaszcza o skrócenie czasu fermentacji oraz znalezienie mikroorganizmu, który zużywa nie tylko glukozę i melasę z buraków cukrowych, lecz także cukier mlekowy, który występuje w dużych ilościach w serwatce. Cel ten został osiągnięty za pomocą *Lactobacillus bulgaricus*.

Bakterie kwasu mlekowego *Lactobacillus bulgaricus* znane są z tego, że ze względu na wysoką aktywność w przemianie materii zdolne są do szczególnie szybkiej fermentacji. Stosuje się je więc do wytwarzania jogurtu, przy czym są one w stanie doprowadzić fermentację mleka do końca w ciągu 4 godzin. Jednak występujące w przyrodzie i w sfermentowanym mleku szczepy *Lactobacillus bulgaricus* nie wytwarzają więcej niż 25–30 g kwasu mlekowego na litr środowiska. Więcej niż połowa obecnego cukru mlekowego pozostaje nie przerobiona.

Niespodziewanie w zakwaszonej próbce mleka znaleziono szczep *Lactobacillus bulgaricus*, którego wydajność drogą planowanych selekcji udało się tak dalece polepszyć, że wytwarza on do 115 g kwasu mlekowego na litr środowiska. Dokładna identyfikacja tego szczepu wykazała, że składa się on z długich Gram-dodatnich pałeczek, które są katalazo-ujemne, nieruchome i mikroaerofilowe oraz nie zawierają sporów. Ponadto można go scharakteryzować za pomocą następujących danych:

Przemiana materii: homofermentacyjna fermentacja kwasu mlekowego

gaz z glukozy: —

gaz z glukonianu: —

Wzrost w temperaturze 15°C: —

Wzrost w temperaturze 45°C: +

Wytwarzanie kwasu z rybozy: —

arabinozy: —

ksylozy: —
mannitu: —
sorbitu: —
glukozy: +
galaktozy: —
laktozy: +
maltozy: —
sacharozy: —
trehalozy: —
cellobiozy: —
melibiozy: —
rafinozy: —
salicyny: —
amigdaliny: —

Rozszczepianie argininy: —

Konfiguracja kwasu mlekowego: D (—)

Kwas dwuaminopimelinowy w ścianie komórki: brak

Szczep ten w niemieckim zbiorze mikroorganizmów został zdeponowany pod nr DSM 2129.

Nowy szczep *Lactobacillus bulgaricus* jest w stanie wyprodukować w ciągu 48 godzin do 115 g kwasu D-mlekowego na litr środowiska. Szczep ten nie jest ponadto wyspecjalizowany pod kątem fermentacji glukozy, lecz prawie równie szybko jak glukozę poddaje fermentacji cukier mlekowy do kwasu mlekowego. W związku z tym serwatka występująca w dużych ilościach jako produkt odpadowy w przemyśle mleczarskim może być stosowana jako źródło surowca do wytwarzania kwasu D-mlekowego.

Przedmiotem wynalazku jest więc sposób wytwarzania kwasu D-mlekowego drogą fermentacji pożywki zawierającej glukozę i/lub cukier mlekowy i inne zwykłe dodatki, w którym jako mikroorganizm produkujący kwas mlekowy stosuje się *Lactobacillus bulgaricus* DSM 2129. Cukier mlekowy stosuje się przy tym na ogół w postaci świeżej serwatki albo w postaci zawiesiny sproszkowanej serwatki, przy czym ewentualnie można jeszcze dodawać też glukozę.

Pożywki stosowane do uzyskiwania kwasu D-mlekowego są komponowane w znany sposób. Obok glukozy i/lub cukru mlekowego muszą naturalnie zawierać jeszcze źródło azotu, przy czym bierze się pod uwagę na przykład wyciąg mięsny, namok kukurydziany lub mączkę sojową. Ponadto dodaje się też sole mineralne witaminy i środki powierzchniowo czynne. Jako środki powierzchniowo czynne bierze się pod uwagę zwłaszcza występujące w handlu niejonowe środki powierzchniowo czynne, korzystnie produkty ciekłe. Te środki powierzchniowo czynne na ogół zawierają jako substancję czynną polioksalkilany, np. produkty reakcji alkoholu i kwasów z tlenkiem etylenu i/lub tlenkiem propylenu. Jako alkohole bierze się pod uwagę alkohole jedno- i wielowodorotlenowe, takie jak alkohole szeregu tłuszczowego, alkohole żywiczne, gliceryna, erytryt, pentaerytryt lub alkohole cukrowe, jak sorbit i mannit, a jako kwasy zwłaszcza kwasy szeregu tłuszczowego i kwasy żywiczne. Korzystnie są również częściowe estry takich wielowartościowych alkoholi i wymienionych kwasów, jak oksyetylany monooleinianu anhydrosorbitu.

Ze względu na to, że *Lactobacillus bulgaricus* DSM 2129 wrażliwy jest na kwasy, należy powstający kwas mlekowy wiązać wodortlenkami lub węglanami metali alkalicznych lub metali ziem alkalicznych, zwłaszcza węglanem wapnia. W ten sposób wartość pH utrzymuje się w zakresie 4,5–7, korzystnie 6,5–6,8. Każdą pożywkę przed zaszczepieniem *Lactobacillus bulgaricus* DSM 2129 należy poddać sterylizacji w celu usunięcia ewentualnych zanieczyszczeń obcymi organizmami. W tym celu wystarczające jest ogrzewanie pożywki w ciągu 15 minut do temperatury 121°C.

Jak we wszystkich procesach odfermentowywania kwasu mlekowego, również w sposobie według wynalazku należy zachowywać warunki beztlenowe. Do tego celu wystarcza dwutlenek węgla powstający przy zobojętnianiu kwasu mlekowego węglanem wapnia albo pokrycie środowiska fermentacyjnego warstwą azotu. Odfermentowywanie kwasu mlekowego można prowadzić w temperaturze 30–50°C, korzystnie 40–45°C. Z powstającej w sposobie według wynalazku soli kwasu D-mlekowego można otrzymywać wolny kwas D-mlekowy za pomocą wymienniczy jonowych albo w przypadku mleczanu wapnia przez zakwaszanie kwasem siarkowym.

Wynalazek jest bliżej objaśniany w następujących przykładach, przy czym procenty oznaczają procenty wagowe.

Przykład I. Rozwój szczepu *Lactobacillus bulgaricus* DSM 2129. Stwierdzony w próbce sfermentowanego mleka szczep *Lactobacillus bulgaricus* wyodrębnia się i hodzi na następującej pożywce (wszystkie dane w g/litr): pepton kazeinowy (tryptycznie trawiony) — 10, ekstrakt mięsny (Merck) — 10, ekstrakt drożdżowy — 5, glukoza — 20, K_2HPO_4 — 2, octan sodu — 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2, $MnSO_4 \cdot H_2O$ — 0,05, niejonowy środek powierzchniowo czynny — 1 ml/litr.

Następnie próbki tego szczepu rozcieńcza się i przeszczepia na płytki agarowe otrzymane z tego samego środowiska z dodatkiem 1,8% agaru. Zaszczepiane płytki agarowe przechowuje się następnie w warunkach bez-

tlenowych w termostacie w temperaturze 45°C w ciągu jednego dnia.

Następnie pobiera się 30 pojedynczych kolonii i każdorazowo wprowadza do probówek zawierających następującą pożywkę 4 (dane w g/litr): glukoza – 50, CaCO_3 – 70, ekstrakt drożdżowy – 7, namok kukurydziany (suchy) – 15, octan sodu – 5, niejonowy środek powierzchniowo czynny – 1 ml/litr.

Hodowlę prowadzi się w ciągu 24 godzin w temperaturze 45°C. Po upływie 24 godzin wyraźnie widać różnicę pomiędzy hodowlami o zróżnicowanej zdolności fermentacyjnej po każdorazowo wytwarzanych ilościach kwasu D-mlekowego. Probówkę o najwyższej zawartości kwasu D-mlekowego stosuje się do sporządzania nowego wymazu na płytkach. Postępowanie to powtarza się regularnie w ciągu 8 tygodni, podnosząc przy tym zawartość cukru w pożywce najpierw do 8%, a po następnych 5 tygodniach do 10%. Następnie szczep selekcjonuje się w ciągu dalszych 12 tygodni, aż do momentu uzyskania zdolności metabolizowania 100 g glukozy w litrze pożywki w ciągu 24 godzin do 65%, wytwarzając 55 g kwasu D-mlekowego/litr. Całkowitą odbudowę glukozy obserwuje się po upływie 36–40 godzin.

Przykład II. Uzyskany według przykładu I szczep *Lactobacillus bulgaricus* zaszczepia się w probówkach do hodowli drobnoustrojów, przy czym każda probówka zawiera 15 ml pożywki 1. Probówki utrzymuje się w temperaturze 45°C w ciągu co najmniej 8 godzin i najwyżej 20 godzin w położeniu pionowym, po czym stosuje jako inokulum dla kultur w kolbach Erlenmeyera, zawierających każdorazowo po 250 ml pożywki 1, które również utrzymuje się w temperaturze 45°C w ciągu 8–20 godzin. Zawartość 6 wyżej wymienionych kolb Erlenmeyera służy następnie jako inokulum dla fermentora o pojemności 30 litrów, do którego uprzednio wprowadzono następującą pożywkę 2 (dane w g/litr): glukoza – 30, CaCO_3 – 15, ekstrakt drożdżowy – 7, pepton kazeinowy – 10, namok kukurydziany (suchy) – 20, octan sodu – 5, niejonowy środek powierzchniowo czynny – 1 ml/litr.

Zawartość fermentora miesza się stosując 100 obrotów na minutę i po 8–12 godzinach w temperaturze 45°C przeprowadza do fermentora o pojemności 270 litrów, zawierającego wymienioną w przykładzie I pożywkę 4 albo następującą pożywkę 3 (dane w g/litr): glukoza – 30, CaCO_3 – 70, ekstrakt drożdżowy – 7, mączka sojowa – 15, octan sodu – 5, niejonowy środek powierzchniowo czynny – 1 ml/litr.

Po podrośnięciu hodowli, to znaczy po upływie około 6–8 godzin, dodaje się jeszcze glukozę. Dodatkowa ilość glukozy zależy do stopnia zużycia glukozy i tworzenia kwasu. Łącznie w ciągu 40–50 godzin dodaje się ilość glukozy odpowiadającą około 10% wagowych pożywki. Z glukozy tworzy się 110–115 g kwasu D-mlekowego/litr środowiska hodowlanego (co odpowiada 159–166 g mleczanu wapnia). Wolny kwas mlekowy wyodrębnia się zanymi metodami, a mianowicie przez wytrącanie wapnia kwasem siarkowym, sączenie, odparowywanie i oczyszczanie drogą destylacji w postaci estru etylowego lub metylowego.

Stosowanie pożywki 3 ma tę zaletę, że w produkcie końcowym nie występuje dająca się stwierdzić ilość kwasu L-mlekowego. Pożywka 4 ma tę zaletę, że o wiele lepiej daje się sączyć po fermentacji w porównaniu z pożywką 3, ponieważ mączka sojowa w pożywce 3 ulega tylko częściowej odbudowie. Produkt wytwarzany przy użyciu pożywki 4 zawiera 1,5–2% kwasu L-mlekowego pochodzącego z namoku kukurydzianego występującego w pożywce.

Po przesączeniu można rozszczepić kwas L-mlekowy, przeprowadzając przesącz przez reaktor enzymatyczny zawierający enzym, który specyficznie rozszczepia kwas L-mlekowy. Nadają się tu układy z L-laktatoksydazą, L-laktatdehydrogenazą lub cytochromu b_2 . L-laktatdehydrogenaza wymaga stosowania NAD jako ko-faktora, który może też być osadzony na nośniku i w związku z tym może być później zregenerowany i ponownie zastosowany. Dla cytochromu b_2 jako ko-faktor stosuje się żelazicyjanek, który można ponownie utlenić za pomocą prądu elektrycznego na elektrodzie z metalu szlachetnego.

Przykład III. Wytwarza się kulturę podstawową i inokulum w sposób opisany w przykładzie II, lecz jako pożywkę stosuje się następującą pożywkę 5, która jako substrat do fermentacji zawiera cukier mlekowy (dane w g/litr): sproszkowana serwatka – 60, CaCO_3 – 70, ekstrakt drożdżowy – 3, mączka sojowa – 5, octan sodu – 5, niejonowy środek powierzchniowo czynny – 1 ml/litr.

Analogicznie do przykładu II po podrośnięciu hodowli wprowadza się dodatkową ilość substratu cukrowego, a to tak długo, aż łącznie wprowadzana ilość cukru mlekowego wyniesie 130 g/litr. Tworzenie kwasu mlekowego trwa nieco dłużej niż w przykładzie II, lecz dobiega końca po upływie 45–55 godzin. Poza tym postępuje się, jak w przykładzie II.

Przykład IV. Kulturę podstawową i inokulum uzyskuje się pod azotem, jak opisano w przykładzie I. Stosuje się pożywki 3,4 albo 5, lecz początkowo bez CaCO_3 , który dodaje się później w postaci suchej lub w postaci 20% zawiesiny, tak aby wartość pH nigdy nie obniżyła się poniżej 5,5. Po 48 godzinach rozpoczyna się dodatkowe dawkowanie pożywki. Stopień rozcieńczania wynosi początkowo 0,01 litra/godzinę na litr pożywki, przy czym taką samą ilość cieczy odbiera się z fermentora w sposób ciągły. Stopień rozcieńczania powoli podwyższa się aż do wartości 0,03–0,04 litra/godzinę na litr pożywki, przy czym wyciek z fermentora wykazuje zawartość 5–7% kwasu D-mlekowego. Z wycieku oddziela się masę komórkową za pomocą separatora, pracującego w sposób ciągły i zawraca do 90% do fermentora. W cieczy znad osadu nastawia się wartość pH na 6,5 za pomocą wodorotlenku wapnia i odparowuje do około 1/10 pierwotnej objętości. W wymrażarce koncentrat chłodzi się do temperatury +4°C, przy czym wykryształizowuje mleczan wapnia. Stężony roztwór wpływa do

wymrażarki w sposób ciągły, podczas gdy wytrącony mleczan wapnia usuwa się w regularnych odstępach przy użyciu zaworu zasuwanego. Ług macierzysty zawraca się do fermentora. Kwas mlekowy uwalnia się z otrzymanego mleczanu wapnia za pomocą kwasu siarkowego i następnie sączenia.

P r z y k ł á d V. Ciągły sposób wytwarzania kwasu mlekowego według przykładu IV powtarza się z tą różnicą, że do sterowania wartością pH stosuje się nie CaCO_3 , lecz wodorotlenek sodu. Zaletą tego sposobu polega na tym, że możliwe jest wtedy utrzymywanie wartości pH 6,5–6,8, wskutek czego podwyższa się prędkość odfermentowywania *Lactobacillus bulgaricus* DSM 2129. Otrzymany roztwór mleczanu sodu wprowadza się na kolumny jonowymienne, które adsorbują kwas mlekowy. Po załadowaniu kolumny kwasem mlekowym eluuje się go kwasem solnym. Po regeneracji za pomocą rozcieńczonego ługu sodowego kolumnę można ponownie stosować do adsorpcji kwasu mlekowego.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania kwasu D-mlekowego drogą beztlenowej fermentacji pożywki zawierającej glukozę i/albo cukier mlekowy i inne zwykłe dodatki w temperaturze 30–50°C przy wartości pH, 4,5–7, z n a m i e n n y t y m, że jako drubnoustrój wytwarzający kwas mlekowy stosuje się *Lactobacillus bulgaricus* DSM 2129.
2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że fermentację prowadzi się w atmosferze gazu ochronnego.