

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

B

(11) 191 069

A bejelentés napja: (22) 82. 07. 01.

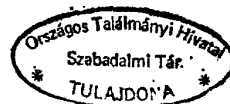
(21) 2165/82

A bejelentés elsőbbsége: (33) DE: 81. 07. 02. (32) (31) (P 31 26 021.7)

A közzététel napja: (41) (42) 1984. 10. 29.

Megjelent: (45) 1988. VII. 29.

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO,
C 12 P 7/56



Feltaláló(k): (72)

dr. COOPER Bryan, biológus, dr. KUESTERS Werner, vegyész, Ludwigshafen, dr. MARTIN Christoph, vegyész, Mannheim, dr. SIEGEL Haro, vegyész, Speyer, DE

Szabadalmas: (73)

BASF AG., Ludwigshafen am Rhein, DE

(54)

ELJÁRÁS OPTIKAILAG TISZTA D- VAGY L-TEJSAV ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya új eljárás optikailag tiszta D- vagy L-tejsav előállítására. Az eljárás lényege, hogy a megfelelő mikroorganizmussal 4-6 pH-értéken végrehajtott fermentáláshoz olyan vizes táptalajt használunk, amely nitrogén-, vitamin-, aminosav- és nyomelem-forrásként folyékony vagy szárított, adott esetben előkezelt sörélesztőt tartalmaz.

A találmány tárgya új eljárás optikailag tiszta D- vagy L-tejsav fermentálással való előállítására.

A tejsavnak cukorból, *Lactobacillus nembeli* baktériumok segítségével való erjesztés előállítása régóta ismert. Ezek az ipari erjesztési folyamatok nem szolgáltatnak optikailag tiszta tejsavat, csak racém keverékeket. Racém tejsavat az élelmiszeriparban jelentős mennyiségben használnak fel.

A gyógyszer- és növényvédőszer iparban szükséges optikailag tiszta anyagok előállítására azonban a racém tejsav nem alkalmas kiindulási anyag; optikailag tiszta D-, illetve L-tejsavra van szükség.

A múltban már végeztek kísérleteket *Lactobacillus* fajták segítségével optikailag aktív tejsav előállítására. Ezeknek a baktériumoknak növekedésükhöz számos olyan anyagra van szükségük, amelyet nem tudnak maguk előállítani, például biotinra, tiaminra, nikotinsavra, piridoxaminra, p-aminobenzoésavra, pantoténsavra és cianokobalaminra. Ezeket a vegyületeket komplex szubsztátumként adják a táptalajhoz. Laboratóriumi méretben például *Lactobacillus*ok tenyésztéséhez a Man, Rogosa és Sharpe által kifejlesztett komplex közeget (MRS-közeg) adják [J. Appl. Bacteriol. 23, 130 (1960)], amelynek alkotórészei pepton, húskivonat, élesztőkivonat, Tween 80^R, nátrium-acetát, triamónium-citrát, magnézium-szulfát, mangán-szulfát és kálium-hidrogén-foszfát.

A tejsav ipari előállításához azonban ez a közeg nem alkalmas, mivel a komplex szubsztátumok túlságosan drágák, és a szükséges mennyiségben nem állnak mindig azonos minőségben rendelkezésre. Az ipari tápoldatokhoz ezért komplex szubsztátumokat, például cukorrépamelaszt vagy kukoricaduzzasztóvizet adnak (16 42 738. számú német szövetségi köztársasági nyilvánossághozatali irat). Ezek elősegítik ugyan a baktériumok növekedését, használatuk azonban nem teszi lehetővé optikailag tiszta tejsav előállítását, mivel ezek az anyagok maguk is jelentős mennyiségű racém tejsavat tartalmaznak. A racém tejsavval szennyezett tejsavból optikailag tiszta tejsav pedig csak a D-, illetve L-tejsav sóinak bonyolult és körülményes kicsapásával és átkristályosításával állítható elő.

Megállapítottuk, hogy az optikailag tiszta tejsav sokkal egyszerűbben is előállítható.

A találmány tárgya eljárás optikailag tiszta D- vagy L-tejsav előállítására olyan vizes táptalaj 4–6 pH-értéken, valamely mikroorganizmussal végrehajtott fermentálásával, amely nitrogént, vitaminokat, aminosavakat, cukrot és nyomelemeket tartalmaz, és a nitrogén-, vitamin-, aminosav- és nyomelemforrás sörélesztő.

A sörélesztő elégséges töménységben tartalmazza a fermentáláshoz szükséges vitaminokat, fehérjéket és nyomelemeket. Sörélesztőként például a *Saccharomyces cerevisiae* és a *S. carlsbergensis* jöhetnek számításba.

A sörélesztő a sörgyártás mellékterméke. A táptalajban a sörélesztőt 1–50, előnyösen 5–30 g szárazanyag/liter töménységben alkalmazzuk, körülbelül 10 tömeg% szárazanyagtartalmú friss vizes szuszpenzió alakjában, ahogy a sörgyárakból kikerül, vagy pedig a sörélesztőt értékesítő cégek által kínált száraz terméként. Ilyen alakban közvetle-

nül is felhasználhatók, de előnyös, ha előzőleg vízben 90–100 °C-on több órán át melegítjük.

A találmány szerinti eljárás egy további kiviteli módja szerint a sörélesztő 1–10%-os vizes oldatát 30–60 °C-on 1–2 óra hosszat inkubáljuk az autólízis megindítása céljából. Adhatunk az oldathoz proteolitikusan ható enzimet, de ez nem feltétlenül szükséges. Ugyancsak előnyös a mechanikus feltárás is valamilyen sejtfeltáró készülékben, például *Dynomille*^R.

A táptalajnak szénhidrogénforrásként a mikroorganizmusok által értékesíthető cukrot kell tartalmaznia, amely tejsavvá bomlik le; ilyen cukrok például a szacharóz, a tejcukor és a glükóz.

A találmány szerinti eljárásban optikailag tiszta D- vagy L-tejsav előállítására minden olyan mikroorganizmus alkalmazható, amely a tejsavnak mindig csak egyik enantiomerjét képezi. Ilyen mikroorganizmusokat a példákban nevezünk meg. A mikroorganizmusok a deponálási intézményekből szerezhetők be.

A cukor fermentálása közben a pH értéke 4–6, előnyösen 4,5–5,5. Ezt a pH-értéket legegyszerűbben tiszta vagy technikai minőségű kalcium-karbonát, például iszapolt kréta, őrölt mészkő vagy őrölt márvány hozzáadásával állíthatjuk be; alkalmazhatunk azonban alkálifém- vagy alkáliföldfém-hidroxidokat vagy alkálifém-karbonátokat is erre a célra.

A fermentálást általában temperálható keverős tartályban hajtjuk végre a mikroorganizmus számára optimális hőmérsékleten, körülbelül 40 és 60 °C között. A találmány szerinti eljárás egyik előnyös kiviteli módja szerint temperálható keverős tartályba vizet, sörélesztőt és iszapolt krétát töltünk, és ezt a keveréket körülbelül 4 óra hosszat nitrogénatmoszférában főzzük. Az erjesztési hőmérsékletre való lehűtés után glükózt adunk hozzá, majd az alkalmazott mikroorganizmus aktív erjedő elkultúrájával beoltjuk (oltóanyag: 1–20%). Az erjedés a hozzáadott glükóz felhasználódása után megszakad. Ezután a D- vagy L-tejsav a fermentációs cefréből szokásos módon elkülöníthető. A cefrét például kénsavval 2 pH-ra megsavanyítjuk és leszűrjük. A szűrlet tartalmazza, optikailag tiszta alakban, a D- vagy L-tejsavat. A szűrlet bepárlásával a tejsavat kémiaiilag tiszta minőségben kapjuk.

Az új eljárással a D-, illetve L-tejsav csaknem tökéletesen tiszta optikai alakban és igen jó kitermeléssel állítható elő. Ezenfelül az eljárás nagyon egyszerűen végrehajtható.

A következő példák a találmány bemutatására szolgálnak.

1. példa

320 g iszapolt krétát, 80 g száraz sörélesztőt és 2,4 liter ivóvizet 5 literes üveg fermentorba töltünk, és keverés és nitrogén-gáz bevezetés közben 4 óra hosszat forraljuk. Ezután a keveréket 45 °C-ra lehűtjük, és előzőleg 1,6 liter vízben 15 percig 121 °C-on sterilizált 4 g tömény foszforsavat és 400 g glükóz-monohidrátot adunk hozzá, majd 40 ml *Lactobacillus lactis* ATCC 8000 MRS-közegben

készült, legfeljebb 24 órás előtenyésztéssel beoltjuk. Az anyagot 45 °C-on nitrogénatmoszférában keverjük, rendszeres időközönként mintákat veszünk belőle, és ezek tejsavtartalmát enzimes úton meghatározzuk. A következő eredményeket kapjuk.

Fermentálási idő, óra	D-tejsav, g/liter	L-tejsav, g/liter
15,5	11	
44	34	
64	52	
88	72	
96	78	
112	83	0,3

Az erjedés 112 óra után befejeződik (glükózkoncentráció: 0). A fermentlevet 300 g tömény kénsavval megsavanyítjuk és szűrővászonon leszívátjuk. A szűret bepárlása után 308 g D-tejsavat kapunk. 99,3%-os optikai tisztaságban.

2. példa

Az 1. példa szerint előállított 4 liter sörélesztős táptalajt *Lactobacillus lactis* DSM 20073 MRS-közegben, 45 °C-on készült, maximálisan 24 órás, 40 ml előtenyésztéssel beoltjuk, és az anyagot 45 °C-on nitrogénatmoszférában keverjük. A tejsav a következő ütemben képződik:

Fermentálási idő, óra	D-tejsav, g/liter	L-tejsav, g/liter
15	37,0	
24	46,0	
40	59,0	
48	68,2	
64	81,8	
70	82,4	0

Az erjedés 70 óra után befejeződik (glükózkoncentráció: 0). A fermentlevet 300 g tömény kénsavval megsavanyítjuk, szűrővászonon leszívátjuk, majd bepároljuk. A kapott D-tejsav optikai tisztasága 100%.

3. példa

Az 1. példában leírt sörélesztős táptalaj 1 literét, amely azonban csak 50 g/liter glükózt tartalmaz, 10 ml *Lactobacillus casei* IFO 3425 MRS-közegben 40 °C-on készült, legfeljebb 8 órás előtenyésztéssel

beoltjuk. Az anyagot 40 °C-on nitrogéngáz alatt keverjük. Az L-tejsav képződését az 1. táblázatban ismertetjük. Az erjedés 38 óra elteltével befejeződik. A fermentlevet 45 g tömény kénsavval megsavanyítjuk, leszűrjük, és bepároljuk. A kapott L-tejsav optikai tisztasága 99%-nál nagyobb.

4. példa

A 3. példában megadott sörélesztős táptalaj 1 literét 10 ml *Lactobacillus casei* sap. rhamnosus DSM 20021 40 °C-on, MRS-közegben készült, legfeljebb 8 órás előtenyésztéssel beoltjuk. A fermentlevet 40 °C-on nitrogéngáz alatt keverjük. Az L-tejsav keletkezési ütemét az 1. táblázatban ismertetjük. Az erjedés 38 óra után befejeződik, ekkor a fermentlevet 45 g tömény kénsavval megsavanyítjuk, leszűrjük és bepároljuk. A kapott L-tejsav optikai tisztasága 99%-nál nagyobb.

1. táblázat

Tejsav erjesztés *L. casei* JFO 3425 és DSM 20021 mikroorganizmusokkal.

Fermentálási idő, óra	L-tejsav, g/l		D-tejsav, g/l	
	JFO 3425	DSM 20021	JFO 3425	DSM 20021
0	0	0	0	0
23	14,2	12,2	0	0
38	47,3	45,2	0,2	0,1

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás optikailag tiszta D- vagy L-tejsav előállítására nitrogént, vitaminokat, aminosavakat, cukrot és nyomelemeket tartalmazó vizes táptalajon mikroorganizmus, előnyösen *Lactobacillus* segítségével, 4-6 pH-értéken végrehajtott fermentálással, *azzal jellemezve*, hogy a táptalaj nitrogén-, vitamin-, aminosav- és nyomelem-forrásként sörélesztőt tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja *azzal jellemezve*, hogy a sörélesztőt friss élesztő-szuspenzió alakjában alkalmazzuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja *azzal jellemezve*, hogy a sörélesztőt szárított állapotban alkalmazzuk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja *azzal jellemezve*, hogy a sörélesztőt vízben való inkubálással előkezeljük.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja *azzal jellemezve*, hogy a sörélesztőt mechanikus feltárással előkezeljük.

Rajz nélkül