



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu nr ———

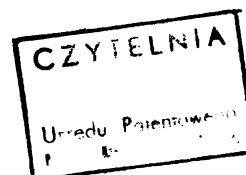
Zgłoszono: 84 06 01 (P. 248017)

Pierwszeństwo ———

Zgłoszenie ogłoszono: 85 04 09

Opis patentowy opublikowano: 1987 04 30

Int. Cl.³ C12P 7/18
C12P 7/56
//C07C 31/26
C07C 59/08



Twórcy wynalazku: Bogusław Wojciech Król, Maciej Wachowicz, Jan Makowski
Zdzisław Majer, Maciej Klauze, Ewa Garstka

Uprawniony z patentu tymczasowego: Politechnika Łódzka, Łódź,
Kutnowskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa”,
Kutno (Polska)

Sposób wytwarzania mannitolu i kwasu mlekowego

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania mannitolu i kwasu mlekowego z mieszaniny fruktozy i glukozy, korzystnie wywaru podekstranowego powstającego przy fermentacyjnej produkcji dekstranu z sacharozy.

Wywar podekstranowy jest rozcieńczonym wodnym roztworem wieloskładnikowym, zawierającym mineralne składniki pożywki dodawane do roztworu sacharozy przed fermentacją dekstranową, nie przereagowaną glukozę i fruktozę oraz część związków organicznych powstałych w roztworze cukrów pod ubocznym działaniem bakterii *Leuconostoc mesenteroides*. Są to oligosacharydy, drobnocząsteczkowy dekstran, mannitol i kwas mlekowy. Udział dwóch ostatnich składników w suchej substancji wywaru nie przekracza 10%.

Znany z opisu patentowego CSRS nr 102 741 sposób otrzymywania mannitolu z wywaru podekstranowego polega na krystalizacji mannitolu w temperaturze -10 do -12°C z zagęszczonego roztworu wywaru w środowisku alkoholowym.

Znany z polskiego opisu patentowego nr 129 430 sposób otrzymywania mannitolu i fruktozy z wywaru podekstranowego polega na chromatograficznym rozdzieleniu składników suchej substancji wywaru na dwie frakcje, z których z jednej wzbogaconej w mannitol i fruktozę w drodze sukcesywnej krystalizacji otrzymuje się obydwie składniki w postaci krystalicznej.

Odmienny sposób otrzymywania mannitolu z wywaru polegający na wtórnej fermentacji fruktozy zawartej w wywarze do mannitolu z użyciem bakterii *Lactobacillus brevis* jest znany z opisu patentowego RFN nr 1 296 613.

Według monografii „The Bacteria”, wydanej przez J. C. Gunzalesa w Akademii Press z 1961 r., bakterie *Lactobacillus brevis* fermentują fruktozę do mannitolu, kwasu mlekowego i kwasu octowego, zaś glukozę do kwasu mlekowego, octowego i glicerolu. W wyniku dłuższego oddziaływania na mannitol wymienione bakterie rozkładają również mannitol do kwasu mlekowego i octowego. Z czasopisma „Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie”, 6, 323 1966 r. wiadomo, że optimum fermentacji samej fruktozy jest następujące: temperatura 25-35°C, stężenie 8%, czas 24 godziny oraz dodatek ekstraktu drożdżowego 0,3-0,5%. Wiadomo też, że ze wzrostem stężenia fruktozy wydłuża się czas fermentacji i zwiększa się stężenie nie przereagowanej fruktozy.

Wadą znanych sposobów otrzymywania mannitolu bezpośrednio z wywaru podekstranowego jest niewielka wydajność procesu ograniczonego zawartością mannitolu w surowcu. W przypadku

zaś otrzymywania mannitolu po wtórnej fermentacji fruktozy do mannitolu wadą jest otrzymywanie tylko jednego składnika, znaczny koszt ekstraktu drożdżowego i konieczność stosowania niskiego stężenia roztworu fermentacyjnego, co czyni proces energochłonnym oraz wymaga użycia dużych fermentorów.

Sposób wytwarzania mannitolu i kwasu mlekowego z mieszaniny glukozy i fruktozy, korzystnie z wywaru podekstranowego powstającego przy fermentacyjnej produkcji dekstranu z sacharozy według wynalazku polega na tym, że mieszaninę glukozy i fruktozy o stężeniu 14-24% z dodatkiem CaCO_3 i autolizatu z odpadowych drożdży piwnych w postaci gęstwy o dawce równoważnej stężeniu azotu $0,1-0,4 \text{ g N}_2/\text{dm}^3$, poddaje się fermentacji z udziałem bakterii *Lactobacillus brevis*, w temperaturze $30-35^\circ\text{C}$ w czasie 20-36 godzin do przereagowania 60-80% początkowej ilości cukrów redukujących, zawartych w płynie fermentacyjnym. Następnie roztwór fermentacyjny ogrzewa się do temperatury $75-90^\circ\text{C}$ i neutralizuje wodorotlenkiem wapniowym oraz przez filtrację oddziela precypitat fosforanu wapniowego i białka. Filtrat odsala się z użyciem kationitu i anionitu, przy czym odsolony roztwór mannitolu zagęszcza się do 40-60% wagowych i krystalizuje mannitol pierwszego rzutu. Po odwirowaniu krystalicznego mannitolu roztwór macierzysty ponownie zagęszcza się do stężenia 52-60% i krystalizuje mannitol drugiego rzutu. Roztwór macierzysty po odwirowaniu mannitolu drugiego rzutu zawierający nie wykrystalizowany mannitol, nie przereagowaną fruktozę i glukozę oraz izomaltozę i izodekstryny rozdziela się chromatograficznie na trzy frakcje: glukozowo-dekstranową o stężeniu 25-30%, fruktozową o stężeniu 14-20% i mannitolową o stężeniu 6-9%. Frakcja glukozowo-dekstranowa jest użytecznym produktem ubocznym. Frakcję fruktozową łączy się z wywarem używanym do fermentacji, zaś frakcję mannitolową łączy się z odsolonym roztworem mannitolu poddawany następnie krystalizacji.

Zatrzymany w złożu anionitowym kwas mlekowy z przefiltrowanego roztworu pofermentacyjnego desorbuje się 4-8% roztworem kwasu solnego, a następnie usuwa się z desorbentu chlorki oraz związki barwne w dodatkowej kolumnie anionitowej, zawierającej anionit w postaci jonu mleczanowego. Oczyszczony roztwór kwasu mlekowego zagęszcza się do stężenia nie mniejszego niż 50%.

Zaletą sposobu według wynalazku jest niski koszt wytwarzania oraz duża dostępność pożywki azotowej, zezwalającej na równoczesną produkcję dwóch cennych produktów chemicznych, jakim jest mannitol i kwas mlekowy. Nadto krótki jest czas fermentacji, dostosowany do wydajnej fazy procesów biochemicznych, łatwe oddzielenie bakterii od płynu fermentacyjnego oraz zminimalizowanie zapotrzebowania na jonity stosowane do odsalania, przez zakończenie fermentacji przed rozpoczęciem fazy wzmożonego powstawania kwasów w roztworze.

Przedmiot wynalazku ilustruje bliżej poniższy przykład nie ograniczając jego zakresu.

Przykład. W fermentatorze kwasoodpornym o pojemności 150 dm^3 zaopatrzonym w mieszadło i płaszcz parowo-wodny umieszczono 100 dm^3 wywaru dekstranowego o stężeniu 16,5% wagowych, 2 kg węglanu wapniowego oraz 4 dm^3 autolizatu drożdży piwnych. Zawartość fermentora poddano pasteryzacji i po ochłodzeniu roztworu do 32°C dodano 6 dm^3 inoculum bakterii *Lactobacillus brevis*. Fermentację przy ciągłym mieszaniu prowadzono w temperaturze $31-33^\circ\text{C}$ w czasie 30 godzin. W tym czasie stężenie cukrów redukujących obniżyło się z $131 \text{ g}/\text{dm}^3$ do $38 \text{ g}/\text{dm}^3$, czyli o 71%, jednocześnie nastąpił przyrost wapnia w roztworze o $4,8 \text{ g}/\text{dm}^3$. Następnie roztwór fermentacyjny ogrzano do temperatury 82°C i zneutralizowano przez dodanie $2,2 \text{ dm}^3$ 0,8 moloowego mleka wapniowego, po czym odsączono wytrącony precypitat fosforanu wapniowego i białka, uzyskując 95 dm^3 roztworu, który odsolono z użyciem dwóch kolumn jonitowych zawierających po 30 dm^3 kationitu i anionitu. Po odrzuceniu wycieku o stężeniu nie większym niż 3% otrzymano 110 dm^3 odsolonego roztworu mannitolu o średnim stężeniu 10,3%. Roztwór mannitolu zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 65°C do 43%, uzyskując 23 dm^3 roztworu do krystalizacji mannitolu pierwszego rzutu. Po zakończeniu krystalizacji mannitolu pierwszego rzutu otrzymano 4,5 kg mannitolu surowego o zawartości wody poniżej 0,5% oraz 20 dm^3 roztworu macierzystego o stężeniu 29%. Po zagęszczeniu roztworu macierzystego do 55% uzyskano 1,4 kg mannitolu surowego drugiego rzutu oraz $10,0 \text{ dm}^3$ roztworu macierzystego o stężeniu 43%, to jest 5,0 kg suchej substancji. Roztwór macierzysty rozdzielono chromatograficznie w kolumnie jonitowej zawierającej 5 dm^3 kationitu na trzy frakcje, otrzymując $7,5 \text{ dm}^3$ frakcji dekstranowej zawierającej 2,5 kg suchej substancji, $5,0 \text{ dm}^3$ frakcji fruktozowej zawierającej 1,1 kg

suchej substancji oraz 10,0 dm³ frakcji mannitolowej zawierającej 0,8 kg suchej substancji. Frakcję fruktozową zawrócono do fermentacji następnej szarży, a frakcję mannitolową zużyto do zagęszczenia łącznie z odsolonym roztworem mannitolu następnej szarży. Po rekryształizacji mannitolu surowego obydwu rzutów z roztworu wodnego otrzymano 5,1 kg produktu o czystości farmakopealnej.

W celu otrzymania kwasu mlekowego, kolumnę zawierającą 30 dm³ anionitu przemyto wodą destylowaną w ilości 50 dm³ i poddano desorpcji z użyciem 40 dm³ 6% roztworu kwasu solnego, który w następnej kolejności wyparto 60 dm³ wody. Wyciek o stężeniu nie przekraczającym 2% odrzucono, po czym odebrano 25 dm³ frakcji głównej surowego kwasu mlekowego o stężeniu 1,1 M. Surowy kwas mlekowy oczyszczono w kolumnie anionitowej zawierającej 2 dm³ anionitu obsadzonego jonem mleczanowym. Otrzymano 19 dm³ kwasu mlekowego o stężeniu 1 M, następnie roztwór zatężono do zawartości kwasu 500 g w 1 dm³. Otrzymano 3,3 dm³ produktu.

Z a s t r z e ż e n i e p a t e n t o w e

Sposób wytwarzania mannitolu i kwasu mlekowego z mieszaniny fruktozy i glukozy, korzystnie wywaru podekstranowego, drogą fermentacji fruktozy i glukozy z udziałem bakterii *Lactobacillus brevis*, a następnie odsoleniu roztworu pofermentacyjnego, zagęszczeniu roztworu i dwurzutowej krystalizacji mannitolu oraz chromatograficznego rozdzielania w złożu kationitowym końcowego roztworu macierzystego na frakcje, **znamienny tym**, że fermentacji poddaje się roztwór fruktozy i glukozy o stężeniu 14-24% wagowych z dodatkiem 0,1-0,4 g azotu na 1 dm³ wywaru w postaci autolizatu drożdży piwnych oraz CaCO₃ po czym po przereagowaniu 60-80% początkowej ilości cukrów redukujących, roztwór fermentacyjny ogrzewa się do 75-90°C, neutralizuje wodorotlenkiem wapniowym, filtruje utworzony precypitat fosforanu wapniowego i białka, a następnie filtrat odsala się z użyciem kationitu i anionitu, zaś odsolony roztwór mannitolu zagęszcza się do 40-60% wagowych i krystalizuje mannitol z roztworu wodnego, następnie końcowy roztwór macierzysty rozdziela się chromatograficznie na trzy frakcje: dekstranową o stężeniu 25-30% wagowych, fruktozową o stężeniu 14-20% wagowych i mannitolową o stężeniu 6-9% wagowych, z których frakcję fruktozową recyrkuje się do fermentacji, zaś frakcję mannitolową recyrkuje się do zagęszczenia i krystalizacji, nadto zatrzymany w złożu anionitowym kwas mlekowy desorbuje się 4-8% roztworem kwasu solnego, po czym usuwa się z desorbentu chlorki i związki barwne w złożu anionitowym obsadzonym jonem mleczanowym.