



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 00973**

(22) Data de depozit: **29/09/2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/09/2017** BOPI nr. **9/2017**

(41) Data publicării cererii:
28/06/2013 BOPI nr. **6/2013**

(73) Titular:

- **UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI"**
DIN CLUJ-NAPOCA,
STR.MIHAIL KOGĂLNICEANU NR.1,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
- **INCDO-INOE 2000 - FILIALA INSTITUTUL**
DE CERCETĂRI PENTRU
INSTRUMENTAȚIE ANALITICĂ,
STR.DONATH NR.67, CLUJ-NAPOCA, CJ,
RO

(72) Inventatori:

- **MAJDIK CORNELIA, CALEA FLORESTI**
NR.81, AP.277, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
- **IRSAI IZABELLA, STR. MUNCII NR. 5,**
AP.5, TÂRGU-MUREȘ, MS, RO;

- **CADAR OANA- ALINA, STR.MIGDALULUI**
NR.14, AP.20, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
- **GOG ADRIANA, STR.FLORILOR NR.184,**
BL.C 5, AP.51, COMUNA FLOREȘTI, CJ,
RO;
- **ȘENILĂ MARIN, STR.BUCIUM NR.1,**
BL.B 1,SC.1, AP.30, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:

Y. GOKSUNGUR, M. GUNDUZ, Ș. HARSA,
"OPTIMIZATION OF LACTIC ACID
PRODUCTION FROM WHEY BY L CASEI
NRRL B-441 IMMOBILIZED IN CHITOSAN
STABILIZED CA-ALGINATE BEADS",
J. CHEM. TECHNOL. BIOTECHNOL.,
VOL. 80, NR. 11, PP. 1282-1290, 2005;
WO 2006/001034; EP 2017347 A1

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNEI SOLUȚII APOASE**
DE 60% A ACIDULUI L-LACTIC TEHNIC PRIN FERMENTAȚIA
LACTICĂ A ZERULUI



RO 128469 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei soluții apoase de 60% acid L (+) -
lactic tehnic, din zer fortificat cu un conținut de minimum 75 g/L lactoză, produs secundar în
3 industria de prelucrare a laptelui. Obținerea acidului lactic stereoizomerul L (+) se face cu
celule de *Lactobacillus casei* imobilizate prin includere în alginat de calciu cu chitosan 5%,
5 în condiții fermentative, prin adaos de extract de drojdie 1%. Metoda se bazează pe fermen-
tația lactozei cu *Lactobacillus casei*, proces enantioselectiv cu formarea izomerului L (+)
7 90...95%, folosind o tehnică nouă de izolare, bazată pe extracție cu solvent nemiscibil cu apa,
și anume n-butanol. Soluția apoasă de acid lactic tehnic L (+) obținută după acest procedeu
9 se poate folosi, fără alte purificări, pentru reacții de polimerizare în scopul sintezei unor
biopolimeri.

11 Acidul lactic L (-), D (+) și racemic pur este un compus chimic foarte valoros, care se
folosește ca și aditiv alimentar, acidulant, conservant, și are un număr mare de aplicații în
13 industria alimentară, cosmetică, farmaceutică. Acidul lactic are un rol important și în industria
chimică, unde este folosit ca și precursor pentru sinteza etil lactatului, propilen glicolului,
15 acidului acrilic și a 2,3-pentadionelor. O valorificare sintetică importantă din ultimii ani este
utilizarea acidului lactic atât stereoizomer, cât și racem în sinteza polimerilor pe bază de acid
17 lactic. Acidul polilactic și copolimerii acestuia sunt compuși biocompatibili și biodegradabili,
cu o largă utilizare în medicină și în industria farmaceutică. Unii compuși sunt utilizați pentru
19 obținerea unor noi tipuri de mase plastice biodegradabile.

21 Obținerea acidului lactic se bazează pe metode fermentative sau pe metode chimice
de sinteză. Metodele fermentative sunt mai avantajoase, fiind mai ieftine, și conduc la obține-
rea acidului lactic prin reacții stereoselective. Sursele de carbon pentru aceste procese fer-
23 mentative pot fi glucoza, maltoza, zaharoza, amidonul, celuloza, etc. La nivel industrial,
prezintă interes produsele secundare ale industriilor alimentare, melasa și zerul.

25 Fermentația lactică a zaharurilor se realizează prin folosirea bacteriilor lactoacide
(LAB).

27 Propunerea de brevet se referă la un procedeu în care se folosește *Lactobacillus*
casei sub formă imobilizată în alginat de calciu cu adaos de chitosan.

29 Zerul este un produs secundar considerat în multe cazuri deșeu, obținut în industria
de prelucrare a laptelui. În funcție de modul de coagulare a laptelui, poate fi zer dulce sau
31 zer acid. Zerul este relativ sărac în grăsimi și conține lactoză 40...50 g/L, proteine 5...10 g/L,
lactat 2...7 g/L, calciu 0,4...1,6, fosfați 1...4,5 g/L și acid lactic 2 g/L. Compoziția zerului
33 influențează posibilitățile de utilizare, procesul de fermentație lactică fiind diferit în funcție de
compoziție.

35 Se cunosc mai multe procedee brevetate de obținere a acidului lactic prin fermentația
lactică a hidraților de carbon din cartofi, porumb, etc. (Brevete **FR 2635334**, **2674865**) și
37 procedeu de obținere a acidului lactic din soia (**US 72175450**). Un alt procedeu folosește ca
și materie primă în fermentație produse secundare din industria alimentară, implicând
39 procesele fermentative și de hidroliză (**US 6319382**). De asemenea, există descrieri pentru
obținerea acidului lactic prin transformarea enzimatică a amidonului în glucoză și fermentația
41 acestuia (**US 5464760**). Ulterior s-a brevetat și un procedeu bazat pe celuloză ca și materie
primă prin zaharificare (*Tchoderma reesei*) și fermentație (*Lactobacillus delbrueckii*) cu
43 obținerea acidului lactic.

45 În scopul obținerii unui randament cât mai bun s-au brevetat și proceduri semi-
continue sau tehnologii în flux continuu. Brevetul **US 5932455** descrie o metodă formată din
două cicluri alternative, unul de fermentație și unul de reprospectare prin adăugare de
47 nutrienți, iar în ultimii ani, în scopul creșterii productivității, s-au elaborat proceduri continue
de obținere a acidului lactic prin fermentația deșeurilor (**US 47741001**).

RO 128469 B1

Etapa cheie în obținerea acidului lactic prin procedeele de fermentație este izolarea și purificarea acidului lactic obținut. Prin procesele fermentative, acidul lactic se obține în soluții diluate; aceasta se datorează, în primul rând, calității de inhibitor a acidului lactic asupra microorganismelor, la concentrații mari, datorită acidității. O altă problemă tehnologică în procesele fermentative este faptul că în mediu de fermentație se găsesc mai multe impurități, celule din lactobacili, alți acizi organici care se formează în timpul fermentației, sau substanțe nutritive necesare fermentației.	1 3 5 7
Izolarea și purificarea acidului lactic se bazează, în general, pe mai multe etape, ceea ce are ca rezultat creșterea prețului.	9
Metodele propuse de diferiți cercetători depind de materia primă foarte variată a procesului fermentativ, precum și de lactobacili utilizați. Există brevete pentru realizarea etapei de izolare care propun utilizarea schimbătorilor de ioni, transformarea în esteri urmată de hidroliză sau extracții cu diferiți solvenți (US 6280985).	11 13
Cercetările și studiile existente raportează obținerea acidului lactic, sau a sărurilor acestuia, prin metoda fermentativă, prin folosirea diferiților lactobacili; condițiile fermentației industriale, cât și metodele de izolare pentru produs diferă de la caz la caz, în funcție de compoziția zerului (produs care diferă de originea laptelui prelucrat), de stereospecificitatea reacției, de puritatea acidului lactic obținut și de randamentele procesului.	15 17
În țara noastră există două brevete de obținere a acidului lactic tehnic.	19
Brevetul de invenție al colectivului Koch Anton și colab. (Brevet 109756 B1) se referă la obținerea acidului lactic tehnic folosit în industria textilă și în tăbăcărie ca depilator și la decalcifierea pieilor, prin fermentația zerului amestecat cu melasă cu <i>Lactobacillus bulgaricus</i> .	21 23
Brevetul colectivului Jurcoane Ștefana (Brevet 115177 B) se referă la obținerea acidului lactic tehnic printr-un proces de biosinteză prin obținerea unui inocul cu o tulpină de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , folosind un hidrolizat enzimatic de faină de porumb.	25
Există și proceduri de obținere a lactatului de calciu (Brevet 106396 B1) în scopul utilizării acestuia ca și lichid antigel sau ca și lichid de frână. Prețul mic al zerului, fiind un produs secundar, și faptul că este un produs natural face ca interesul pentru cercetarea de obținere și prelucrare a acestuia să fie în continuă creștere.	27 29
Lucrarea științifică a autorilor Y. Göksungur, M. Gündüz, Ș. Harsa , " Optimization of lactic acid production from whey by <i>L casei</i> NRRL B-441 immobilized in chitosan stabilized Ca-alginate beads ", J. Chem. Technol. Biotechnol. , 2005, 80, pp. 1282-1290 , prezintă un studiu asupra producerii de acid lactic printr-un proces de fermentație a zerului în prezență de <i>Lactobacillus casei</i> imobilizat pe perle de alginat și chitosan, cele mai bune rezultate fiind obținute pentru o soluție de pudră de zer cu un conținut de 145...147g/L lactoză, suplimentată cu extract de drojdie 28 g/L și CaCO ₃ 97,5 g/L, timp de 72 h, imobilizarea realizându-se în alginat cu 0,5% chitosan.	31 33 35 37
Cererea de brevet internațională WO 2006/001034 prezintă un procedeu de obținere a acidului polilactic pornind de la materii prime agricole regenerabile, precum melasa. Fermentația are loc prin utilizarea unei bacterii din specia <i>Lactobacillus</i> în sistem discontinuu timp de 24...48 h, la pH 5...6, la o temperatură de 37...45°C. După fermentație are loc separarea biomasei, urmată de extracția mediului de fermentație limpede cu un solvent, de exemplu butanol, într-un raport cuprins între 1:1 și 1:5. După separarea fazelor, extractul care conține acid lactic este contactat cu o soluție apoasă alcalină sub agitare, timp de 1/2...1 h, iar apoi este lăsat în repaos timp de 2 h pentru a se separa fazele. Faza organică	39 41 43 45

RO 128469 B1

1 care conține solventul este recirculată, iar faza apoasă care conține sarea acidului lactic este
tratată cu un acid mineral, pentru a se obține acid lactic. Acidul lactic brut obținut poate fi
3 trecut pe o rășină cationică, iar apoi concentrat la vid la o concentrație de 50...60%, pentru
a fi mai departe utilizat la obținerea de acid polilactic.

5 Problema tehnică pe care își propune să o rezolve invenția este de a obține o soluție
apoasă de 60% acid L (+) - lactic tehnic, soluție de puritate corespunzătoare pentru a se
7 utiliza în reacții de polimerizare, cu scopul obținerii acidului polilactic.

9 Procedeu conform invenției, de obținere a unei soluții apoase de acid L(+) lactic
tehnic de 60%, cuprinde fermentația unei soluții de zer fortificat cu o concentrație de 75 g/L
11 lactoză, folosind *Lactobacillus casei* imobilizat în alginat cu 5% chitosan, fermentația având
loc la $pH = 5...6$, și la $45...50^{\circ}C$, cu adaos de 1% extract de drojdie, timp de 24 h, și fiind
13 urmată de separarea biomasei imobilizate prin decantare, acidularea mediului de fermentație
cu acid clorhidric, izolarea acidului lactic prin extracție cu n-butanol la un raport de 1:1,
15 urmată de o a doua extracție din faza organică formată cu o soluție de NaOH 1M, tratarea
fazei apoase care conține lactat de sodiu cu HCl 1M și concentrarea soluției apoase
rezultate pentru a se obține o soluție apoasă cu un conținut de acid lactic de 60%.

17 Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unei soluții apoase a
acidului lactic L (+) de 60% printr-un proces fermentativ folosind *Lactobacillus casei* imobiliz-
19 zat în alginat de calciu cu 5% chitosan. Utilizarea celulelor imobilizate față de procedurile în
care se folosesc culturi de lactobacil în suspensie are ca beneficiu imediat creșterea stabi-
21 lității acestora, în paralel cu posibilitatea separării și reutilizării lor în condiții foarte avanta-
joase, comparative cu suspensiile celulare. Adaosul de 5% chitosan în amestecul de alginat
23 utilizat în procesul de imobilizare conduce la obținerea unei matrici cu proprietăți mecanice
superioare și o stabilitate mai ridicată la temperatură și variații de pH .

25 Fermentația se realizează cu o soluție de zer fortificat cu o concentrație de 75 g/L
lactoză, la temperatura de $45...50^{\circ}C$, menținând pH -ul în intervalul de $5...6$, prin adăugare
27 de soluție de NaOH 10M și agitare continuă, timp de 24 h.

29 Izolarea și purificarea acidului lactic format conform invenției se bazează pe o
separare care constă în două procese de extracție cu n-butanol/apă, care se realizează prin
trecerea acidului lactic în lactat și din nou în acid lactic. Această metodă înlătură problemele
31 de izolare a acidului lactic, și anume separarea de proteinele existente în zer și de alți
nutrienți. Biomasa imobilizată se separă prin decantarea soluției fermentate, se aduce soluția
33 la un pH de $1...2$ cu acid clorhidric 1M, se extrage cu n-butanol acidul lactic (în raport 1:1 față
de soluția apoasă). Timpul de amestecare este 45 min, urmată de repaos 1 h. Din faza orga-
35 nică (soluția n-butanol), acidul lactic se extrage cu o soluție apoasă de NaOH 1M, prin tre-
cerea acidului în lactat de sodiu. Soluția apoasă se acidulează la un pH de $1...2$ cu acid HCl
37 1M și se concentrează până la un conținut de acid lactic 60%. Soluția conține și clorură de
sodiu formată din neutralizare, dar separarea acestuia nu este necesară în scopul reacțiilor
39 de polimerizare. Soluția astfel obținută se folosește în reacția de polimerizare.

41 În continuare, este prezentat un exemplu de realizare al procedurii conform
invenției.

Exemplu

43 Ca și materie primă, se folosește zerul cu un conținut de 50 g/L lactoză, a cărei con-
centrație se corectează prin adaos de lactoză până la o concentrație de 75 g/L și extract de
45 drojdie (10 g/L) ca sursă suplimentară de nutrienți, obținând astfel zerul fortificat. Se utilizează
Lactobacillus casei, liofilizat. Masa bacteriană uscată se adaugă în 25 ml mediu de fermenta-
47 ție MRS (Man, Rogosa, Sharpe) și se incubează timp de 24 h la $37^{\circ}C$. Celulele de
Lactobacillus casei astfel obținute se amestecă în volume egale cu o soluție apoasă de

RO 128469 B1

alginate de sodiu 4%. Suspensia de lactobacil-alginat se adaugă în picături într-o soluție de CaCl_2 0,2M, chitosan 5% și acid acetic 1%. Biomasa imobilizată se spală cu apă distilată și se introduce în reactorul care conține zerul fortificat. În fermentator, se adaugă extract de drojdie 1%, se crește temperatura la 45...50°C și se pornește agitarea (150 rpm). În timpul fermentației, se menține pH-ul optim între 5...6, prin adăugare de soluție de NaOH 10M. Procesul fermentativ decurge în 24 h, timp în care se menține agitarea. Reacția fiind exotermă, temperatura se menține în aceste condiții la aproximativ 45...50°C, nefiind necesar aport energetic exterior.	1 3 5 7
După terminarea fermentației, mediul de fermentație se decantează de biomasa imobilizată, care se păstrează sub apă distilată, pentru a putea fi refolosită. Mediul de fermentație se acidulează la un pH de 1...2 cu o soluție de HCl 1M, iar acidul lactic se extrage cu n-butanol (raport 1:1 față de soluția apoasă). Extracția se perfectează sub amestecare timp de 45 min, iar apoi urmează separarea celor două faze nemiscibile în repaos timp de 1 h. Faza organică se amestecă cu o soluție de NaOH 1M, în raport 1:1 și, după o agitare de 45 min și repaos 1 h, se separă fazele. Faza organică de n-butanol se recirculă pentru un nou proces fermentativ. Lactatul de sodiu din faza apoasă se transformă în acid lactic prin neutralizare cu o soluție de HCl 1M (pH = 1) și soluția se concentrează la un conținut de acid lactic de 60%. În urma izolării, în soluție există și clorură de sodiu, a cărei separare nu este necesară în scopul utilizării în reacția de polimerizare.	9 11 13 15 17 19
Rectificarea soluției astfel obținute nu este necesară. În cazul apariției unor probleme de puritate, în vederea încadrării în condițiile tehnice, se face o rectificare printr-un nou proces de extracție - neutralizare.	21

RO 128469 B1

1

Revendicare

3

Procedeu de obținere a unei soluții apoase de acid L(+) lactic tehnic de 60%, prin fermentația unei soluții de zer fortificat cu o concentrație de 75 g/L lactoză, folosind

5

Lactobacillus casei imobilizat în alginat cu 5% chitosan, fermentația având loc la pH = 5...6 și la 45...50°C, cu adaos de 1% extract de drojdie, timp de 24 h, și fiind urmată de separarea

7

biomasei imobilizate prin decantare, acidularea mediului de fermentație cu acid clorhidric,

9

izolarea acidului lactic prin extracție cu n-butanol la un raport de 1:1, urmată de o a doua

11

extracție din faza organică formată cu o soluție de NaOH 1M, tratarea fazei apoase care conține lactat de sodiu cu HCl 1M, și concentrarea soluției apoase rezultate, pentru a se obține o soluție apoasă cu un conținut de acid lactic de 60%.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 429/2017