



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 00973

(22) Data de depozit: 29.09.2011

(41) Data publicării cererii:
28.06.2013 BOPI nr. 6/2013

(71) Solicitant:
• INCDO- INOE 2000, FILIALA INSTITUTUL
DE CERCETĂRI PENTRU
INSTRUMENTAȚIE ANALITICĂ,
STR. DONATH NR.67, CLUJ NAPOCA, CJ,
RO

(72) Inventatori:
• MAJDIK CORNELIA, CALEA FLOREȘTI
NR.81, AP.277, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• IRSAI IZABELLA, STR. MUNCII NR. 5,
AP.5, TÂRGU-MUREȘ, MS, RO;
• CADAR OANA, STR. MIGDALULUI NR. 14,
AP. 20, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• GOG ADRIANA, STR.FLORILOR NR.184,
BL.C5, AP.51, COMUNA FLOREȘTI, CJ,
RO;
• ȘENILĂ MARIN, STR.BUCIUM, NR.1,
BL.B1, SC.1, AP.30, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

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

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a acidului L-lactic tehnic, utilizat în industria alimentară. Procedeu conform invenției constă din fermentația zerului având un conținut de 75 g/l lactoză, în prezența unei mase bacteriene de *Lactobacillus casei*, immobilizate în alginat de calciu cu 5% chitosan, la o temperatură de 45...50°C, cu un adaos de 1% extract de drojdie, timp de 24 h, după care biomasa este separată prin decantare, iar mediul de fermentație se acidulează cu HCl 1M; în continuare, acidul lactic este izolat prin două

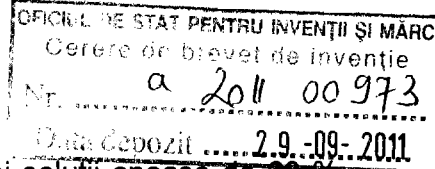
extracții succesive, folosind *n*-butanol, faza organică se amestecă cu hidroxid de sodiu sub agitare, timp de 45 min, iar după 1 h se separă fazele, din care faza apoasă conținând lactat de sodiu se transformă în acid lactic, prin neutralizare cu o soluție HCl 1M, iar în final, soluția se concentrează până la un conținut de 60% acid lactic.

Revendicări: 1



**Procedeu de obținere a unei soluții apoase de 60% a acidului L-lactic tehnic
prin fermentația lactică a zerului**

DESCRIERE

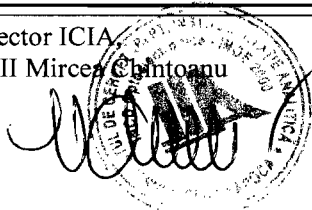


Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei soluții apoase de 60 % acid L (+) - lactic tehnic, din zer fortificat cu un conținut minim de 75 g/L lactoză, produs secundar în industria de prelucrare a laptelui. Obținerea acidului lactic stereoizomerul L (+) se face cu celule de *Lactobacillus casei* imobilizate prin includere în alginat de calciu cu chitosan %, în condiții fermentative prin adaos de extract de drojdie 1%. Metoda se bazează pe fermentația lactozei cu *Lactobacillus casei*, proces enantioselectiv cu formarea izomerului L(+) 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 se poate folosi, fără alte purificări, pentru reacții de polimerizare în scopul sintezei unor biopolimeri.

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 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, 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 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 obținerea unor noi tipuri de mase plastice biodegradabili.

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

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



Descrierea invenției

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.

Zerul este un produs secundar considerat în multe cazuri deșeu, obținut în industria de prelucrare a laptelui. În funcție de modul de coagularea laptelui, poate fi zer dulce sau 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 influențează posibilitățile de utilizare, procesul de fermentație lactică fiind diferit în funcție de compoziție.

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

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

Etapă 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.

Izolarea și purificarea acidului lactic se bazează în general pe mai multe etape, ceea ce are ca rezultat creșterea prețului.

Descrierea invenției

Metodele propuse de diferiți cercetători depind de materia primă foarte variată a procesului fermentativ, precum și de lactobacilii 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 Patent 6280985).

Cercetările și studiile existente raportează obținerea acidului lactic, sau a sărurilor acestuia, prin metoda fermentativă prin folosirea diferiților lactobacili, condițiile fermentatei 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.

În țara noastră există două brevete de obținere a acidului lactic tehnic.

Brevetul de invenție al colectivului Koch Anton și colab. (Nr. 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 *Lactobacillus bulgaricus*.

Brevetul colectivului Jurcone Ștefana (Nr. Brevet 115177 B) se referă la obținerea acidului lactic tehnic printr-un proces de biosinteză prin obținerea unui inocul cu o tulpină de *Lactobacillus delbrueckii*, folosind un hidrolizat enzimatic de făină de porumb.

Există și proceduri de obținere a lactatului de calciu (Nr. 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.

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* imobilizat 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 stabilității acestora, în paralel cu posibilitatea separării și reutilizării lor în condiții foarte avantajoase, comparative cu suspensiile celulare. Adăosul de 5% chitosan în amestecul de alginat utilizat în procesul de imobilizare conduce la obținerea unei matrici cu proprietăți mecanice superioare și o stabilitate mai ridicată la temperatura și variații de pH.

Descrierea invenției

Fermentația se realizează cu o soluție de zer fortificat cu o concentrație de 75 g/L lactoză, la temperatura de 37 °C, menținând pH-ul în intervalul de 5-6, prin adăugare de soluție de NaOH 10 M și agitare continuă, timp de 24 de ore.

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 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 la un pH 1-2 cu acid clorhidric 1 M, se extrage cu *n*-butanol acidul lactic (în raport 1:1 față de soluția apoasă). Timpul de amestecare este 45 minute, urmată de repaos 1 oră. Din faza organică (soluția *n*-butanol) acidul lactic se extrage cu o soluție apoasă de NaOH 1 M prin trecerea acidului în lactat de sodiu. Soluția apoasă se acidulează la un pH de 1-2 cu acid HCl 1 M 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 necesar în scopul reacțiilor de polimerizare. Soluția astfel obținută se folosește în reacția de polimerizare.

Problemele tehnice pe care le rezolvă invenția sunt:

- ca și materie primă se folosește zer, un subprodus din industria laptelui;
- reacția de fermentație lactică se realizează folosind *Lactobacillus casei* imobilizat prin includere în alginat de calciu cu 5 % chitosan;
- creșterea randamentului în acid lactic al procesului de fermentație se realizează prin fortifierea zerului și folosirea unui adaos de extras de drojdie;
- procedeul propus elimină necesitatea încălzirii mediului de fermentație la 80-90 °C, necesară precipitării proteinelor din zer, micșorându-se astfel consumul de energie necesară, ceea ce are ca rezultat un preț mai scăzut;
- izolarea acidului lactic se realizează simplu prin două extracții succesive folosind *n*-butanol, care se reutilizează în proces;
- clorura de sodiu rezultată în urma procesului rămâne în soluție, nefiind necesară separarea, soluția obținută fiind utilizată ca atare în reacția de polimerizare.

Descrierea invenției

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

Ca și materie primă, se folosește zerul cu un conținut de 50 g/L lactoză, a cărui concentrație se corectează prin adaos de lactoză până la o concentrație de 75 g/L și extract de 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 fermentație MRS (Man, Rogosa, Sharpe) și se incubează timp de 24 de h la 37 °C. Celulele de *Lactobacillus casei*, astfel obținute se amestecă în volume egale cu o soluție apoasă de alginat de sodiu 4%. Suspensia de lactobacil-alginat se adaugă în picături într-o soluție de CaCl₂ 0,2 M, chitosan 1% și acid acetic 1%. Biomasa imobilizată se spală cu apa distilată și se introduce în reactorul care conține zerul fortificat. În fermentator, se adaugă extract de drojdie 1 %, se crește temperatura la 37 °C și se pornește agitarea (150 rpm). În timpul fermentației se menține pH-ul optim între 5-6 , prin adăugare de soluție de NaOH 10 M. Procesul fermentativ decurge în 24 de ore, timp în care se menține agitarea. Reacția fiind exotermă temperatura se menține în aceste condiții la aprox. 37±1 °C, nefiind necesar aport energetic exterior.

După terminarea fermentației, mediul de fermentație se decantează de biomasa imobilizată, care se păstrează sub apa distilată pentru a putea fi refolosită. Mediul de fermentație se acidulează la un pH 1-2 cu o soluție de HCl 1 M, iar acidul lactic se extrage cu *n*-butanol (raport 1:1 față de soluția apoasă). Extracția se perfectează sub amestecare timp de 45 minute, iar apoi urmează separarea celor două faze nemiscibile în repaos timp de 1 oră. Faza organică se amestecă cu o soluție de NaOH 1 M, în raport 1:1 și după o agitare de 45 minute și repaos 1 ora 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 1 M (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.

Rectificarea soluției astfel obținută, 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.



REVENDICARE

Procedeul de obținere a soluției apoase de acid L(+) lactic tehnic de 60 % , are la bază o metodă fermentativă a zerului fortificat (cu un conținut de 75 g/L lactoză) folosind *Lactobacillus casei* imobilizat în alginat cu 5 % chitosan. Fermentația are loc la pH = 5 și la o temperatură de 45-50 °C, cu un adaos de 1 % extract de drojdie, timp de 24 de ore. După separarea biomasei imobilizate prin decantare are loc acidularea mediului de fermentație cu acid clorhidric. Izolarea se face printr-un proces de extracție cu *n*-butanol (raport 1:1). Obținerea soluției apoase de acid lactic tehnic 60 % se face prin transformare în lactat de sodiu și extracție din faza organică cu o soluție de hidroxid de sodiu 1 M, urmată de concentrare. Soluția astfel obținută poate fi folosită în reacția de polimerizare.

