



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12P 7/56 (2019.02); C12N 1/20 (2019.02); C12R 1/225 (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2018128806, 06.08.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
06.08.2018Дата регистрации:  
17.09.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.08.2018

(45) Опубликовано: 17.09.2019 Бюл. № 26

Адрес для переписки:

392000, г. Тамбов, ул. Советская, 106, ТГТУ,  
отдел патентования, Неверовой О.С.

(72) Автор(ы):

Дворецкий Дмитрий Станиславович (RU),  
Дворецкий Станислав Иванович (RU),  
Темнов Михаил Сергеевич (RU),  
Акулинин Евгений Игоревич (RU),  
Маркин Илья Владимирович (RU),  
Устинская Яна Витальевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования "Тамбовский государственный  
технический университет" (ФГБОУ ВО  
"ТГТУ") (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2177036 C2, 20.12.2001. RU  
2306340 C1, 20.09.2007. RU 2149188 C1,  
20.05.2000. RU 2283345 C2, 10.09.2006.  
ПОЛЯНСКИЙ К.К., ШУВАЕВА Г.П. и др.  
Производство молочной кислоты, Известия  
Вузов. Пищевая технология, 1997, N 1, с. 8-14.  
ДВОРЕЦКИЙ Д.С., ЗЮЗИНА О.В. и др.  
Совершенствование условий биосинтеза  
молочной кислоты лактобактериями, Вестник  
(см. прод.)

(54) Способ получения молочной кислоты

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Способ получения молочной кислоты предусматривает внесение бактерий рода *Lactobacillus* в питательную среду, содержащую рассиропную, отстерилизованную свекловичную мелассу, сточные воды, предварительно очищенные с помощью биомассы *Chlorella vulgaris* при заданных соотношениях компонентов, и культивирование молочнокислых бактерий в течение 24-35 часов, при температуре 37-50°C, начальном уровне pH 6,5-7,5, при перемешивании 50-80 об/мин, аэрации суспензии на стадии накопительного культивирования газовой воздушной

смесью 60-80 л/ч с последующим обеспечением анаэробных условий в течение 24-35 ч. Причем в питательной среде используют сточные воды, очищенные до содержания внеклеточных метаболитов, моль/л: водорастворимые витамины B2, B12 -  $10^{-4}$ - $10^{-7}$ , растворимые полисахариды (галактоза, арабиноза, галактоза, ксилоза) -  $10^{-4}$ - $10^{-6}$ , свободные жирные кислоты (стеариновая, олеиновая, линолевая, линоленовая) -  $10^{-5}$ - $10^{-7}$ , полипептиды, свободные аминокислоты -  $10^{-5}$ - $10^{-6}$ , вещества фенольной

природы (флавоноиды) -  $10^{-6}$ - $10^{-7}$ , фитогормон:  
индолил-3-уксусная кислота -  $10^{-5}$ - $10^{-6}$ .

Изобретение позволяет повысить выход  
молочной кислоты. 1 ил., 5 табл.

(56) (продолжение):

технологического университета, 2017, Т.20, N8, с. 126-130.

R U 2 7 0 0 5 0 3 C 1

R U 2 7 0 0 5 0 3 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12P 7/56* (2006.01)  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*C12R 1/225* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C12P 7/56 (2019.02); C12N 1/20 (2019.02); C12R 1/225 (2019.02)*(21)(22) Application: **2018128806, 06.08.2018**(24) Effective date for property rights:  
**06.08.2018**Registration date:  
**17.09.2019**

Priority:

(22) Date of filing: **06.08.2018**(45) Date of publication: **17.09.2019** Bull. № 26

Mail address:

**392000, g. Tambov, ul. Sovetskaya, 106, TGTU,  
otdel patentovaniya, Neverovoj O.S.**

(72) Inventor(s):

**Dvoretckij Dmitrij Stanislavovich (RU),  
Dvoretckij Stanislav Ivanovich (RU),  
Temnov Mikhail Sergeevich (RU),  
Akulinin Evgenij Igorevich (RU),  
Markin Ilya Vladimirovich (RU),  
Ustinskaya Yana Vitalevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniya "Tambovskij gosudarstvennyj  
tekhnikeskij universitet" (FGBOU VO "TGTU")  
(RU)**(54) **METHOD OF PRODUCING LACTIC ACID**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: invention relates to the biotechnology. Lactic acid production method envisages introduction of bacteria of the genus *Lactobacillus* into a nutrient medium containing syrupy sterilized beet molasses, waste water pre-purified with the help of *Chlorella vulgaris* biomass at specified ratio of components, and culturing the lactic acid bacteria for 24–35 hours, at temperature of 37–50 °C, initial level of pH 6.5–7.5, while stirring 50–80 rpm, aeration of suspension at accumulation stage with gas-air mixture 60–80 l/h with subsequent provision of anaerobic

conditions for 24–35 hours. In addition, in nutrient medium is treated with waste water purified to content of extracellular metabolites, mol/l: water-soluble vitamins B2, B12 –  $10^{-4}$ – $10^{-7}$ , soluble polysaccharides (galactose, arabinose, galactose, xylose) –  $10^{-4}$ – $10^{-6}$ , free fatty acids (stearic, oleic, linoleic, linolenic) –  $10^{-5}$ – $10^{-7}$ , polypeptides, free amino acids –  $10^{-5}$ – $10^{-6}$ , substances of phenolic nature (flavonoids) –  $10^{-6}$ – $10^{-7}$ , phytohormone: indolyl-3-acetic acid –  $10^{-5}$ – $10^{-6}$ .

EFFECT: invention increases output of lactic acid.  
1 cl, 1 dwg, 5 tbl

Изобретение относится к области биотехнологических процессов и производств, в частности, к способам культивирования биомассы бактерий.

Известен способ культивирования молочнокислых бактерий на основе штамма (*Lactobacillus delbrueckii* В-8744» (Патент на изобретение РФ №2283345, МПК С12Р 7/56, С12N 1/20, 2006 г). Способ предусматривает использование питательных сред с органическими формами азота (дрожжевой экстракт, пептон, пшеничные зародыши), в качестве источников углерода используются сусло, солодовые ростки, сахар. Питательная среда настаивается 1 ч при температуре 50°С, после чего вносится двухсуточная культура молочнокислых бактерий. Колбы термостатируются при 50°С, их содержимое периодически перемешивается. Способ обеспечивает выход лактата кальция 146,0 г/л после 50 ч брожения, что соответствует общей продуктивности процесса 2,92 г/(л·ч) и выходу молочной кислоты 93,9%.

Недостатком данного способа является относительно невысокий выход молочной кислоты, а также то, что при его реализации требуется использование в качестве источников азота и углерода дорогостоящих органических веществ.

Известен способ получения молочной кислоты (Патент на изобретение №1243354 РФ, МПК С12Р 7/56, 2002 год), предусматривающий выращивание продуцирующего ее штамма бактерий *Lactobacillus delbrueckii* в сахаросодержащей питательной среде до максимального накопления целевого продукта, нейтрализацию сброженного раствора карбонатом кальция при нагревании, последующую очистку и выделение. С целью ускорения процесса очистки и улучшения качества продукта, в сброженный раствор после нейтрализации карбонатом кальция дополнительно вводят активную кремневую кислоту в количестве 60-80 мг/л и удаляют образовавшийся осадок в поле центробежных сил при факторе разделения 3500-4500, а надосадочную жидкость перед выделением целевого продукта подвергают омагничиванию в поле с магнитной индукцией 0,01-0,15 Тл. Способ обеспечивает выход лактата кальция 146,0 г/л после 50 ч брожения, что соответствует общей продуктивности процесса 2,92 г/(л·ч) и выходу молочной кислоты 93,9%.

Недостатком данного способа также является относительно невысокий выход молочной кислоты и использование дорогостоящих компонентов питательной среды (источники углерода и азота).

Известен способ получения молочной кислоты (Патент на изобретение №2306340 РФ, МПК С12Р 7/56, С12N 1/20, 2007 год), предусматривающий сбраживание сахаросодержащей питательной среды молочнокислыми бактериями *Lactobacillus delbrueckii* в присутствии обработанных молочной кислотой солодовых ростков и нейтрализацию образующейся молочной кислоты мелом, причем в питательную среду дополнительно вводят мел в количестве 60% от общего количества мела, рассчитанного для нейтрализации молочной кислоты, дрожжевой экстракт и питательные соли (сульфаты магния, марганца и железа, цитрат аммония, одно- и двухзамещенные фосфаты калия). Обработку солодовых ростков в количестве 12-15 г/л проводят водой, подкисленной молочной кислотой до рН 4,0-5,0 и ферментным препаратом ксилотрансферазой в количестве, соответствующем 200-600 ед./л ксиланазной активности, в качестве молочнокислых бактерий *Lactobacillus delbrueckii* используют штамм *Lactobacillus delbrueckii* ВКПМ В-8744 в возрасте 48-72 ч, а для нейтрализации образующейся молочной кислоты через 24 ч от начала процесса брожения вносят оставшиеся 40% мела. Продуктивность процесса составляет 2,96 г/(л·ч) лактата кальция. Выход молочной кислоты на стадии брожения от исходного сахара составляет 94,6%.

Недостатком данного способа также является относительно невысокий выход молочной кислоты и использование дорогостоящих компонентов питательной среды (источник азота - солодовые ростки, сульфаты магния, марганца и железа, цитрат аммония, одно- и двухзамещенные фосфаты калия).

5 Наиболее близким к предлагаемому решению является способ получения молочной кислоты (Патент на изобретение №2177036 РФ, МПК C12P 7/56, C12N 1/20, C12N 1/20, C12R 1:225, C12R 1:46, 2001 год). Данный способ получения молочной кислоты из городских твердых отходов, предусматривает ферментацию молочнокислых бактерий, причем, сначала из городских твердых отходов удаляют шины, крупные части черных  
10 и цветных металлов, пластмассы и стекла и получают целлюлозный компонент, который затем измельчают и обрабатывают его разбавленной серной кислотой при 40-100°C, растворяя тем самым оставшиеся тяжелые металлы и получая растворимый и нерастворимый компоненты. После этого отделяют растворимый компонент от нерастворимого компонента, затем высушивают полученный нерастворимый компонент,  
15 обрабатывают его при массовом соотношении "концентрированная серная кислота : нерастворимый компонент" - 1:1 и получают частично гидролизованную смесь. Далее разбавляют полученную частично гидролизованную смесь водой при 80-100°C, после этого перемешивают полученную разбавленную смесь при 100°C и получают разложившийся материал. Затем удаляют твердые вещества из полученного  
20 разложившегося материала и получают фильтрат, разделяют фильтрат на раствор, содержащий кислоту, и раствор, содержащий сахар, потом концентрируют раствор, содержащий сахар, до 1-20% концентрации сахара, доводят рН полученного концентрированного раствора, содержащего сахар, до 4,5-7,5, после чего ферментируют полученный раствор молочнокислыми бактериями и получают раствор, содержащий  
25 молочную кислоту.

Недостатком данного способа является необходимость предварительной многостадийной обработки сырья для получения достаточного выхода молочной кислоты, что приводит к усложнению технологического процесса и его удорожанию.

30 Задачей изобретения является получение культуральной жидкости с повышенным содержанием молочной кислоты.

Решение технической задачи достигается за счет создания стрессовых условий культивирования молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* на предварительно обеззараженных сточных водах, содержащих комплекс внеклеточных метаболитов.

35 Между отличительными признаками и достигаемым техническим результатом существует следующая причинно - следственная связь.

Технический результат достигается тем, что создание стрессовых условий обеспечивается анаэробными условиями культивирования молочнокислых бактерий, а накопление комплекса внеклеточных метаболитов в питательной среде обеспечивается при обеззараживании загрязненных сточных вод путем культивирования на них  
40 микроводорослей вида *Chlorella vulgaris*.

Муниципальные сточные воды, поступающие с городских очистных сооружений и содержащие азот в виде катионов аммония 30-60 мг/л, фосфор в виде фосфат-анионов в концентрации 10-40 мг/л, нефтепродукты в концентрации 1-3 мг/л, катионы цинка - 0,01-0,09 мг/л, меди - 0,01-0,2 мг/л, общее микробное число: 5-20 млн кл/мл, очищаются  
45 и обеззараживаются с применением микроводорослей вида *Chlorella vulgaris* и используются в качестве основы питательной среды для культивирования. После обеззараживания состав вод становится следующим: азот в виде катионов аммония 1,5 мг/л, фосфор в виде фосфат-анионов в концентрации 3,5 мг/л, нефтепродукты в

концентрации 0,01 мг/л, катионы цинка - 0,001-0,009 мг/л, меди - 0,001-0,02 мг/л, общее микробное число: 0,3 млн кл/мл.

5 Культивирование молочнокислых бактерий для биосинтеза молочной кислоты заключается в создании благоприятных условий в обеззараженных муниципальных сточных водах: температуры 37-50°C, начального уровня pH 6,5-7,5, интенсивности перемешивания 50-80 оборотов в минуту, интенсивности аэрации суспензии микроводорослей *Chlorella vulgaris* на стадии накопительного культивирования газовой смеси 60-80 л/ч, подачей посевного материала - молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* в количестве 10% об. по отношению к питательной среде.

10 При этом последовательно осуществляются стадии культивирования биомассы клеток молочнокислых бактерий на предварительно обеззараженных сточных водах, содержащих комплекс внеклеточных метаболитов при аэрации суспензии и создания стрессовых условий для стимулирования накопления молочной кислоты.

15 Длительность последовательных стадий культивирования прироста биомассы и создания стрессовых условий составляют 24-35 часов каждая.

В подаваемой питательной среде (табл. 1) присутствуют очищенные с помощью микроводорослей от химических и биологических контаминантов сточные воды, содержащие в своем составе внеклеточные метаболиты: водорастворимые витамины (В<sub>2</sub>, В<sub>12</sub>), растворимые полисахариды (галактоза, арабиноза, ксилоза) свободные жирные

20 кислоты (стеариновая, олеиновая, линолевая, линоленовая), и полипептиды, аминокислоты, вещества фенольной природы (флавоноиды), фитогормон - индолил-3-уксусная кислота (табл. 2).

Таблица 1- состав питательной среды

Вещество	Концентрация, г/л
Свекловичная меласса (рассиропная, отстерилизованная)	600
Очищенные сточные воды	200
Вода дистиллированная	200

Таблица 2 – Состав внеклеточных метаболитов в сточных водах, очищенных с помощью микроводорослей

Вещество	Концентрация, моль/л
Водорастворимые витамины (B2, B12)	10 <sup>-4</sup> – 10 <sup>-7</sup>
Растворимые полисахариды (галактоза, арабиноза, галактоза, ксилоза)	10 <sup>-4</sup> – 10 <sup>-6</sup>
Свободные жирные кислоты (стеариновая, олеиновая, линолевая, линоленовая)	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-7</sup>
Полипептиды, свободные аминокислоты	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-6</sup>
Вещества фенольной природы (флавоноиды)	10 <sup>-6</sup> – 10 <sup>-7</sup>
Фитогормон Индолил-3-уксусная кислота	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-6</sup>

В качестве посевного материала для биосинтеза молочной кислоты используются бактерии рода *Lactobacillus* (штамм *Lactobacillus delbrueckii* L-3) *Lactobacillus delbrueckii* L-20, *Lactobacillus delbrueckii* B-8744, приведенные в табл. 3-5 и на рис. 2-4.

Культивирование молочнокислых бактерий осуществляется на питательной среде (содержание редуцирующих сахаров 5%), основой которой является очищенная микроводорослями рода *Chlorella vulgaris* сточная вода, при аэрации газовой воздушной смесью в течение 24-35 часов. Это позволяет обеспечить максимальный прирост биомассы за счет активного поглощения бактериями редуцирующих сахаров, присутствующих в питательной среде и достижение максимально возможной концентрации бактерий в суспензии. Создание стрессовых условий в течение последующих 24-35 часов активизирует процесс молочнокислого брожения и позволяет обеспечить накопление максимального количества молочной кислоты.

Использование в качестве посевного материала молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* и питательной среды приведенного в табл. 1 состава при наличии метаболитов, приведенных в табл. 2, позволяет обеспечить продуктивность по молочной кислоте до 3,45 г/(л·ч).

Подтверждением эффективности предлагаемого метода являются результаты культивирования, приведенные в табл. 3. и на рис. 1.

Таблица 3- результаты культивирования штамма *Lactobacillus delbrueckii L-3*

Время культивирования, часы	Количество клеток, млн кл/мл	Выход молочной кислоты, % (масс.)
0	20	0
12	550	51.6
24	1500	78.6
36	600	87.4
48	40	98.0

Таблица 4- результаты культивирования штамма *Lactobacillus delbrueckii B-8744*

Время культивирования, часы	Количество клеток, млн кл/мл	Выход молочной кислоты, % (масс.)
0	20	0
12	600	55.6
24	1800	81.2
36	650	89.7
48	42	98.8

Таблица 5- результаты культивирования штамма *Lactobacillus delbrueckii* L-20

5	Время культивирования, часы	Количество клеток, млн кл/мл	Выход молочной кислоты, % (масс.)
	0	20	0
10	12	490	48.3
	24	1230	72.4
	36	480	83.4
15	48	34	96.0

Рисунок 1 - кинетика накопления молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*  
 Полученные данные позволяют заключить, что предлагаемый способ  
 20 культивирования молочнокислых бактерий позволяет получить культуральную  
 жидкость с повышенным содержанием молочной кислоты.

#### (57) Формула изобретения

Способ получения молочной кислоты, предусматривающий внесение молочнокислых  
 25 бактерий рода *Lactobacillus* в питательную среду, содержащую в г/л: рассиропную,  
 отстерилизованную свекловичную мелассу - 600, сточные воды, предварительно  
 очищенные с помощью биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* в течение 4-7 суток  
 - 200 и дистиллированную воду - 200; культивирование молочнокислых бактерий в  
 течение 24-35 часов при температуре 37-50°C, начальном уровне рН 6,5-7,5,  
 30 интенсивности перемешивания 50-80 об/мин, аэрации на стадии накопительного  
 культивирования газовой смеси 60-80 л/ч с последующим обеспечением  
 анаэробных условий в течение 24-35 часов, при этом в питательной среде используют  
 сточные воды, очищенные до содержания внеклеточных метаболитов, моль/л:  
 водорастворимые витамины В2, В12 -  $10^{-4}$ - $10^{-7}$ , галактоза, арабиноза, ксилоза -  $10^{-4}$ - $10^{-6}$ ,  
 35 жирные кислоты - стеариновая, олеиновая, линолевая, линоленовая -  $10^{-5}$ -  $10^{-7}$ ,  
 полипептиды, свободные аминокислоты -  $10^{-5}$ - $10^{-6}$ , вещества фенольной природы -  
 флавоноиды -  $10^{-6}$ - $10^{-7}$ , индолил-3-уксусная кислота -  $10^{-5}$ - $10^{-6}$ .

40

45

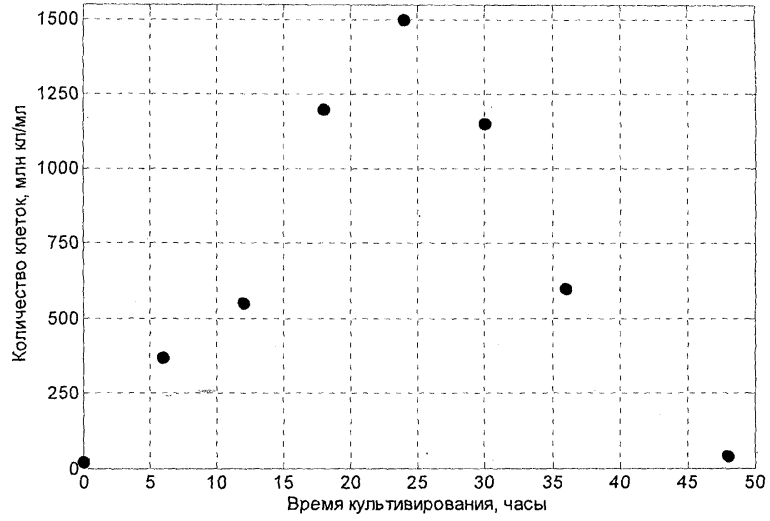


Рис. 1