



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

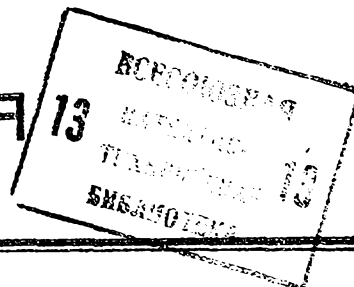
(19) SU (11) 1139375 A

(51) C 12 P 7/56; C 12 R 1/225

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР  
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ



- (21) 3476930/28-13  
(22) 10.08.82  
(31) Р 3131.717.0  
(32) 11.08.81  
(33) ФРГ  
(46) 07.02.85. Бюл. № 5  
(72) Хартмут Фельсков и Дитер Сукач (ФРГ)  
(71) Хехст АГ (ФРГ)  
(53) 577.15(088.8)  
(56) 1. Патент Великобритании № 1157213. кл. C 2 C, опублик. 1969.  
2. Патент ПНР № 63329, кл. 6 в 16/02, опублик. 1971.

(54) (57) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ D-МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ путем сбраживания глюкозы или лактозы бактериями рода *Lactobacillus* в присутствии источника азота, регулятора pH и других питательных минеральных солей в анаэробных условиях при pH 4,5 - 7,0 и температуре 30-50°C с последующим выделением целевого продукта, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода кислоты, из бактерий рода *Lactobacillus* используют штамм *Lactobacillus bulgaricus* DSM 2129.

(19) SU (11) 1139375 A

Изобретение относится к микробиологической промышленности, а именно к способам получения D-молочной кислоты сбраживанием сахаров.

Известен способ получения D-молочной кислоты путем сбраживания глюкозы или свеклосахарной мелассы в присутствии питательных минеральных солей штаммом *Lactobacillus leichmannii* AMCC 4797. Выход за 60 ч составляет 113 г D-молочной кислоты [1].

Наиболее близким к изобретению является способ получения D-молочной кислоты, заключающийся в сбраживании глюкозы или лактозы молочного сахара бактериями рода *Lactobacillus* на питательной среде в присутствии источника азота, карбоната кальция, регулирующего pH среды, и других питательных минеральных солей в анаэробных условиях при pH предпочтительно 5,1 и температуре до 50°C с последующим выделением D-молочной кислоты. Выход кислоты составляет до 70 г [2].

Целью изобретения является повышение выхода D-молочной кислоты.

Поставленная цель достигается тем, что согласно способу получения D-молочной кислоты, предусматривающему сбраживание глюкозы или лактозы бактериями рода *Lactobacillus* в присутствии источника азота, регулятора pH и других питательных минеральных солей в анаэробных условиях при pH 4,5-7,0 и 30-50°C с последующим выделением целевого продукта из бактерий рода *Lactobacillus* используют штамм *Lactobacillus bulgaricus* DSM 2129.

Используемые для получения D-молочной кислоты штамм *Lactobacillus bulgaricus* DSM 2129 выделен из подкисленной молочной пробы и улучшен планомерной селекцией таким образом, что продуктивность его за 48 ч достигает 115 г/л молочной кислоты.

Штамм депонирован в немецкой коллекции микроорганизмов под номером DSM 2129.

Идентификация штамма показывает, что он состоит из длинных грамположительных палочек, отрицательных к каталазе, неподвижных, микроаэрофильных.

Биохимические характеристики.

Обмен веществ. Гомоферментативное молочнокислородное брожение:

газ из глюкозы -

газ из глюконата -

рост при 15°C -

рост при 45°C +

Образование кислоты из:

рибозы -

арабинозы -

ксилозы -

маннита -

сорбита -

глюкозы +

галактозы -

лактозы +

мальтозы -

сахарозы -

трегалозы -

целлобиозы -

мелибиозы -

раффинозы -

салицина -

амигдалина -

Расщепление аргинина: -

Конфигурация молочной кислоты:

D /-/.

Диаминопимелиновая кислота в стенке клетки: никакой.

Штамм *Lactobacillus bulgaricus* DSM 2129 не специализирован на брожении глюкозы, а может сбраживать (ферментировать) молочный сахар почти так же быстро, как и глюкозу, до молочной кислоты. Таким образом, имеющуюся в больших количествах, в качестве отходов молочной промышленности, свежую молочную сыворотку или в виде суспензии порошка молочной сыворотки можно использовать в качестве источника сырья для производства D-молочной кислоты.

Используемые для получения D-молочной кислоты питательные среды состоят из известного образца. Они наряду с глюкозой и/или молочным сахаром содержат также источник азота, например мясной экстракт, кукурузную набухающую в воде муку (Cornstap) или соевую муку. Кроме того, добавляют минеральные соли, витамины и поверхностно-активные средства. В качестве поверхностно-активных средств используют продажные неионные поверхностно-активные вещества, прежде всего жидкие продукты. Эти поверхностно-активные вещества содержат в качестве биологически активного вещества полиоксисалкаты, например продукты взаимодействия спиртов и кислот с этиленоксидом и/или пропиленоксидом.

В качестве спиртов используют одно- и многоатомные спирты. Такие, как жирные спирты, смоляные спирты, глицерин, эритрит, пентаэритрит; или сахарные спирты, такие как сорбит, и маннит; в качестве кислот прежде всего используют жирные и смоляные кислоты. Благоприятны также неполные сложные эфиры из таких многоатомных спиртов и указанных кислот, как оксиэтилаты ангидросорбит-моноолеата.

Так как *Lactobacillus bulgaricus* DSM 2129 чувствителен к кислотам, то образующуюся молочную кислоту нужно связывать с помощью гидрооксидов, или карбонатов щелочных или щелочноземельных металлов, в особенности карбонатом кальция. pH-Значение, таким образом, поддерживается в области 4,5-7,0, предпочтительно 6,5-6,8.

Любую питательную среду перед посевом *Lactobacillus bulgaricus* DSM 2129 стерилизуют, чтобы устранить возможные загрязнения за счет посторонних организмов. Для этого достаточно нагреть питательную среду в течение 15 мин при 121°C.

Как и для всех молочнокислых брожений (ферментаций), для предлагаемого способа требуются анаэробные условия. Для этого достаточно образующейся благодаря нейтрализации молочной кислоты карбонатом кальция, двуокиси углерода или обогащения ферментационной среды азотом.

Молочнокислое брожение осуществляют в температурном интервале 30-50°C. Особенно благоприятный температурный интервал 40-45°C.

Из осаждающейся по предлагаемому способу соли D-молочной кислоты можно получить свободную D-молочную кислоту с помощью ионообменника или в случае лактата кальция путем подкисления серной кислотой.

**Пример 1.** Рост штамма *Lactobacillus bulgaricus* DSM 2129.

Находящийся в пробе сброженного молока штамм *Lactobacillus bulgaricus* выделяют и культивируют в следующей среде 1, г/л:

Казеиновый пептон (триптически усвоенный)	10
Мясной экстракт (Merck)	10
Дрожжевой экстракт	5

Глюкоза	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
Ацетат натрия	5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,05
Неионное поверхностно-активное вещество	1 мл/л

Затем пробы штамма разбавляют и производят посев на агаровые пластинки, которые приготовлены из той же среды с добавкой 1,8% агара. Инокулированные агаровые пластинки затем в течение дня выдерживают при 45°C в анаэробных условиях в термостате. В целом затем извлекают 30 отдельных колоний и, смотря по обстоятельствам, вносят в пробирку, которая содержит следующую среду 4, г/л:

Глюкоза	50
CaCO	70
Дрожжевой экстракт	7
Кукурузная набухающая мука (сухая)	15
Ацетат натрия	5
Неионное поверхностно-активное вещество	1 мл/л

Время культивирования составляет 24 ч при 45°C. Спустя 24 ч отчетливо видна разница между различными хорошо сброженными культурами и образовавшимися количествами D-молочной кислоты. Пробирку с самым большим количеством D-молочной кислоты используют для нового мазка на стекле. Этот процесс повторяют регулярно в течение 8 нед., и при этом содержание сахара в среде повышают сначала до 8% и спустя следующие 5 нед. до 10%. Затем штамм селекционируют следующие 12 нед. до тех пор, пока он не станет способен метаболизировать 100 г глюкозы/л среды в течение 24 ч на 65%, причем образуется 55 г D-молочной кислоты/л. Полное разрушение глюкозы наблюдается спустя 36-40 ч.

**Пример 2.** Полученный согласно примеру 1 штамм *Lactobacillus bulgaricus* помещают в пробирки, которые содержат по 15 мл среды. Пробирки для культуры ставят вертикально при 45°C по меньшей мере на 8 ч и самое большее на 20 ч и затем используют в качестве инокулята для культур в колбах Эрленмейера, которые содержат по 250 мл среды 1. Их также выдерживают при 45°C 8-20 ч. Содержимое 6 указанных колб Эрленмейера затем служит в качестве инокулята для фермента

емкостью 30 л, в который предварительно помещена следующая среда 2, г/л:

Глюкоза	30
CaCO <sub>3</sub>	15
Дрожжевой экстракт	7
Казеиновый пептон	10
Кукурузная набухающая мука (сухая)	20
Ацетат натрия	5

Неионное поверхностно-активное вещество 1 мл/л

Ферментеры перемешивают со скоростью 100 об/мин, и спустя 8-12 ч при 45°C в ферментер загружают содержимое в количестве 270 л, которое содержит либо указанную в примере 1 среду, либо следующую среду 3, г/л:

Глюкоза	30
CaCO <sub>3</sub>	70
Дрожжевой экстракт	7
Соевая мука	15
Ацетат натрия	5

Неионное поверхностно-активное вещество 1 мл/л

После выращивания культуры, т.е. спустя 7 ч, добавляют еще глюкозу.

При добавлении глюкозы руководствуются потреблением глюкозы и образованием кислоты. В целом в течение примерно 45 ч добавляют такое количество глюкозы, которое составляет примерно 10 вес.% питательной среды. Из глюкозы образуется 115 г D-молочной кислоты питательной среды (равно 166 г лактата кальция). Выделение свободной молочной кислоты осуществляют известными способами, а именно осаждением кальция серной кислоты, фильтрацией, выпариванием и очисткой, путем перегонки в виде сложного этилового или метилового эфира.

Применение среды 3 имеет то преимущество, что в целевом продукте не содержится обнаруживаемого количества L-молочной кислоты. Среда 4 имеет преимущество в том, что она после ферментации лучше фильтруется, чем среда 3, так как соевая мука в среде 3 разрушается только частично. Полученный с помощью среды 4 продукт содержит 2% L-молочной кислоты, которая происходит из кукурузной набухающей муки в среде.

После фильтрации возможно расщепление доли L-молочной кислоты путем пропускания фильтрата через ферментивный реактор, который содержит фермент, расщепляющий специфически

L-молочную кислоту. Пригодны системы с L-лактатоксидазой, L-лактатдегидрогеназой или цитохромом b<sub>2</sub>. L-Лактатдегидрогеназа нуждается в качестве кофактора в NAD, который также может быть связан с носителем и затем может регенерироваться и применяться вновь. Для цитохрома b<sub>2</sub> пригоден в качестве кофактора гексацианоферрат, который может снова повторно окисляться с помощью электрического тока на электроде из благородного металла.

Пример 3. Согласно указанному в примере 2 способу готовят штамм-культуру и инокулят, однако в качестве питательной среды применяют следующую среду 5, которая содержит молочный сахар в качестве сбраживаемого субстрата, г/л:

Порошок молочной сыворотки	60
CaCO <sub>3</sub>	70
Дрожжевой экстракт	3
Соевая мука	5
Ацетат натрия	5
Неионное поверхностно-активное вещество	1 мл/л

Как и в примере 2, после выращивания культуры добавляют дополнительно сахарный субстрат, а именно до тех пор, пока добавленное в целом количество молочного сахара не составляет 130 г/л. Образование молочной кислоты длится несколько дольше, чем в примере 2, однако спустя 50 ч заканчивается. В остальном поступают описанным в примере 2 образом. Выход D-молочной кислоты составляет 100 г/л.

Пример 4. Штаммовая культура и инокулят готовятся при насыщении азотом, как в примере 1. Используют среды 3, 4 или 5, однако они сначала не содержат CaCO<sub>3</sub>. Его в сухом виде или в виде 20%-ной суспензии добавляют потом, так, чтобы pH не снижалось ниже 5,5. Спустя 48 ч начинают дополнительное дозирование питательного раствора. Скорость разбавления составляет 0,01 л/ч на литр питательного раствора, причем равные количества жидкости непрерывно извлекают из ферментера. Скорость разбавления медленно увеличивают до величины 0,04 л/ч на литр питательного раствора, причем слив из ферментера имеет содержание D-мо-

лочной кислоты 5-7%. Клеточную массу непрерывно отделяют от слива с помощью непрерывно функционирующего сепаратора и на 90% возвращают в ферментер. В выделенной части устанав- 5 навливают pH 6,5 с помощью гидроксида кальция и упаривают до 1/10 ее первоначального объема. В низкотемпературной ловушке концентрат охлаждают до 4°C, при этом выкристаллизовывается лактат кальция. Концентрированный раствор непрерывно подают в низкотемпературную ловушку, в то время как осадившийся лактат кальция выводят в регулярные интервалы с помощью шибера. Маточный раствор возвращают в ферментер. Выделение молочной кислоты из полученного лактата кальция осуществляется с помощью серной кислоты и путем последующей фильтрации. 20 Выход составляет 110 г D-молочной кислоты на литр питательной среды.

Пример 5. Повторяют непрерывное получение молочной кислоты,

согласно примеру 4 с тем различием, что для регулирования pH используют не  $\text{CaCO}_3$ , а гидроксид натрия. Преимущество этого способа заключается в том, что он позволяет поддерживать pH при 6,5-6,8, благодаря чему скорость брожения *Lactobacillus bulgaricus* DSM 2129 повышается. Образовавшийся раствор лактата натрия пропускают через ионообменные колонки, которые абсорбируют молочную кислоту. Как только колонка будет загружена молочной кислотой, последнюю элюируют соляной кислотой. После регенерации разбавленным раствором гидроксида натрия колонку снова можно использовать для адсорбции молочной кислоты. Выход D-молочной кислоты 115 г на литр питательной среды.

Использование предлагаемого способа обеспечивает более высокий выход целевого продукта и получения его оптически чистым.

Редактор В.Данко      Составитель Н.Привалова  
Техред С.Мигунова      Корректор А.Ильин

Заказ 10711/46      Тираж 525      Подписное  
ВНИИПИ Государственного комитета СССР  
по делам изобретений и открытий  
113035, Москва, Ж-35, Раушская анб., д.4/5

Филиал ИПИ "Патент", г.Ужгород, ул.Проектная, 4