

Получение L(+)-молочной кислоты при электроактивировании сыворотки

И. И. Вуткарева*, Г. К. Балан, М. К. Болога

*Институт прикладной физики, Молдавский государственный университет,
г. Кишинев, MD-2028, Молдова,*

** e-mail: irinavutkareva@yahoo.com*

Поступила в редакцию 17.11.2022

После доработки 23.05.2023

Принята к публикации 30.05.2023

Приведены результаты исследования получения L(+)-оптического изомера молочной кислоты из сыворотки разных видов: исходной, ферментированной, концентрированной в аппарате электролизного типа с разделяющей диафрагмой. Определена скорость получения изомера L(+)-молочной кислоты в анодной камере электролизера в зависимости от концентрирования сыворотки.

Ключевые слова: молочная кислота, изомеры молочной кислоты, угол поляризации

УДК 637.344.2

<https://doi.org/10.52577/eom.2023.59.3.55>

ВВЕДЕНИЕ

Известны технологии получения молочной кислоты как на основе химического синтеза, так и при помощи ферментации различного сырья молочнокислыми микроорганизмами. Последние становятся более предпочтительными из-за роста стоимости углеводородного сырья для химического синтеза и экологически неблагоприятных аспектов крупнотоннажных химических производств. Немаловажен и тот факт, что биотехнологические способы получения молочной кислоты в большинстве случаев позволяют получать определенный оптический изомер (L (+) либо D (-)), тогда как при химическом синтезе неизбежно образование рацемической смеси (DL), что не позволяет достичь высоких прочностных характеристик продукта полимерализации молочной кислоты – полилактида.

Будучи термопластичным, полимер молочной кислоты может использоваться в качестве упаковочного материала для пищевых и медицинских продуктов, отдельных предметов или конструкций из конкретного полимера. Такие полимеры могут служить подходящим материалом для основных пластмасс, поскольку полимер молочной кислоты не является благоприятной растительной средой для микробов и вследствие этого более безопасен, чем пластики на основе целлюлозы. Полимер молочной кислоты способен легко модифицироваться в микроволокна и использоваться в текстильных изделиях, которые из-за низкой поглощаемости влаги, быстрой сушки, отсутствия складок, пониженной воспламеняемости, хорошей оптической плотности, способности к очистке могут

применяться для замены таких природных материалов, как шелк и хлопок [1].

Чистый немодифицированный полимер молочной кислоты, не содержащий добавок, представляет собой разлагаемый при температуре 57 °С материал в период от нескольких дней до двух недель в зависимости от используемой технологии. Полимер молочной кислоты может разлагаться без компостирования, но для этого требуется продолжительное время.

Продукты на основе модифицированной молочной кислоты, предназначенные для внешнего использования и подлежащие применению при различных продолжительностях потребления и биodeградируемости, способны разлагаться в течение времени от нескольких месяцев до двух лет, что также приемлемо для естественных условий. В соответствии с определенными требованиями может быть изготовлен пластик на основе полимера молочной кислоты, который способен подвергаться деградации под воздействием влаги и/или почвенных микроорганизмов [2, 3] и его можно сжигать, поскольку при горении образуется мало дыма, не выделяются ядовитые газы, а продуктами горения являются исключительно диоксид углерода и вода.

Молочная (2-гидроксипропионовая, α -гидроксипропионовая) кислота – это простейшая гидроксикислота, имеющая асимметричный атом углерода, обеспечивающий существование двух оптических изомеров – D (или R) и L (или S) форм. При этом L-молочная кислота усваивается организмом, а D-изомер – нет [4].

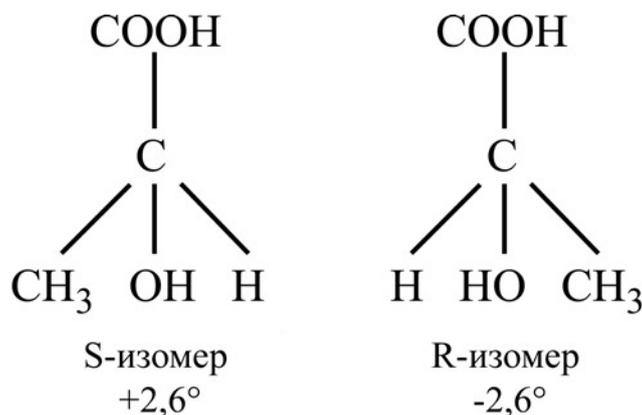


Рис. 1. Энантиомеры молочной кислоты.

Структурные изомеры обладают различными физическими и химическими свойствами. Энантиомеры, наоборот, имеют одинаковую температуру плавления и кипения, растворимость, плотность, реакционную способность по отношению к ахиральным реагентам. Различие между ними проявляется только в хиральных условиях, например, энантиомеры ведут себя по-разному в ферментативных реакциях, поскольку все ферменты хиральны [5]. Отличаются они также по отношению к плоскополяризованному свету. Вещество, состоящее из хиральных молекул одного вида, способно вызвать поворот плоскости колебаний поляризованного света. Такое вещество обладает оптической активностью и, если при прохождении света через него плоскость колебаний поворачивается по часовой стрелке, вещество называют правовращающим и углу поворота придается положительное значение (+). Если поворот происходит против часовой стрелки, то вещество левовращающее и угол будет отрицательным (-). Энантиомеры – хиральные молекулы с противоположной абсолютной конфигурацией вращают плоскость поляризации в противоположных направлениях на один и тот же угол. Пример энантиомерных молочных кислот приведен на рис. 1.

В ходе химического синтеза лактата получается рацемическая DL-молочная кислота, поэтому интерес представляет биосинтез оптически чистой молочной кислоты в обеих ее оптических формах. Оптическая чистота молочной кислоты критична для физических свойств полилактата и, в отличие от рацемата, может быть полимеризована до высококристаллической полимолочной кислоты, пригодной для коммерческого использования. Штаммы дикого типа *Corynebacterium glutamicum* успешно используются для получения оптически чистого L-лактата в анаэробных условиях, однако при этом синтезируются в больших количествах и такие побочные продукты, как сукцинат и ацетат.

Известно, что превращение пирувата, одного из промежуточных метаболитов гликолиза, в лактат управляется ферментом лактатдегидрогеназой [6].

Оптическая активность обусловлена наличием в молекуле асимметричного атома углерода, то есть атома, связанного с четырьмя различными заместителями. Примером может служить молочная кислота: $\text{CH}_3\text{C}^*(\text{OH})\text{COOH}$ (асимметрический атом углерода отмечен звездочкой). Согласно тетраэдрической модели атома углерода, заместители располагаются в углах правильного тетраэдра, в центре которого находится атом углерода. Химические свойства оптических антиподов идентичны; одинаковы и их физические свойства, за исключением оптической активности: одна форма вращает плоскость поляризации света влево [l- или (-) форма], другая – на тот же по величине угол вправо [d- или (+) форма]. Две формы одного и того же вещества с противоположными знаками вращения имеют зеркально-противоположные конфигурации. Одинаковый знак вращения разных веществ не служит доказательством сходства их конфигураций, а вещества с противоположным знаком вращения могут иметь одинаковые конфигурации, как, например, левовращающая молочная кислота и ее правовращающие эфиры [7]. Для обозначения генетической связи веществ применяют знаки L и D, отражающие конфигурационное родство определенного оптически активного вещества с L- или D-глицериновым альдегидом или соответственно с L- или D-глюкозой. Левовращающая молочная кислота оказывается принадлежащей к D-ряду и обозначается как D(-)-молочная кислота, правовращающая – к L-ряду и обозначается как L(+)-молочная кислота.

L-изомер в природе встречается чаще. Согласно US FDA (Food and Drug Administration), чистая L-молочная кислота признана безвредной пищевой добавкой, в то время как D-лактат может оказывать вредное

воздействие на метаболизм человека, даже вызывать ацидоз и декальцификацию. Однако производство основывается на биосинтезе по ряду причин, в основном в результате химического синтеза получается рацемизированная DL-молочная кислота, а не оптически чистые изомеры.

Смесь равных количеств оптических антиподов ведет себя как индивидуальное химическое соединение, лишенное оптической активности и сильно отличающееся по физическим свойствам от каждого из антиподов. Такое вещество называют рацемическим соединением, или рацематом [d-, l-или (\pm) форма]. При химических превращениях, при которых образуются новые асимметричные атомы углерода, всегда получают рацематы, так как вероятности образования правовращающей и левовращающей форм равны.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Используемые продуценты включают микроорганизмы, вырабатывающие чистые L(+)- или D(-)-стереоизомеры молочной кислоты, однако предпочтительными штаммами являются те, которые продуцируют L(+)-молочную кислоту, поскольку L-лактат и его производные имеют широкую область применения. Среди таких штаммов предпочтительными являются штаммы вида *L. Acidophilus*, обладающие толерантностью к высокой температуре, которые авторы и применяли в исследованиях.

Ферментация проводилась при следующих параметрах: температура – 37 °С, длительность культивации 48 часов, производительность при концентрации до 4,5 г/л в 1 час. Решающим фактором обеспечения эффективной ферментации является низкое содержание остаточных сахаров в среде. Используемые продуценты обеспечивали утилизацию лактозы при конечной концентрации раствора 8–10%. Относительно высокие температуры ферментации и возможность регулирования pH в интервале 4,5–6,3 при электролизе позволили объединить электрообработку с ферментацией, сохраняя подходящие условия для протекания обоих процессов и минимизируя степень микробиологического загрязнения. Выделение молочной кислоты из ферментационной среды может осуществляться с использованием электролитического удаления кислоты в анодную камеру электролизера.

Иногда термин «электроактивация» заменяют на «униполярную электрохимическую обработку», так как в процессе электрохимической активации обработку жидкости ведут, как правило, в зоне одного основного электрода, в то время как в зоне электрода противоположной полярности

(вспомогательного) поддерживают минимально возможный расход активируемой жидкости, либо заполняют ее специальной буферной жидкостью. Например, при обработке сброженной сыворотки в зоне отрицательного электроактиватора зону положительного электрода заполняли водным раствором бикарбоната натрия. Для предотвращения протоков жидкости из одной зоны в другую использовали диафрагму, разделяющую анодную и катодные зоны. При наложении электрического поля в результате катодного восстановления образуются гидроксил-ионы, которые переносятся через анионообменную мембрану в камеру концентрирования.

Процесс электрообработки осуществляли в диафрагменном электролизере, разделенном ионоселективной мембраной МА, со стальным катодом и графитовым анодом. Электролиз проводили при поступлении сыворотки с pH от 4,3 до 5,9 в катодную камеру. Величину тока контролировали в процессе эксперимента при постоянном напряжении 29В. Отбор проб осуществляли из катодной камеры электролизера в процессе электрообработки. Так как расстояние между катодом и анодом составляет около 3 см, а катодное и анодное пространство разделяется диафрагмой, перемешивание и отбор электролита из отдаленных от катода зон исключается. Отбор электролита из прилегающего к катоду слоя, исходя из толщины диффузионного слоя (около 0,1 см), проводился через равные промежутки времени после начала электролиза. Продолжительность опыта – 55 минут. Анодную камеру заполняли – 0,1% раствором бикарбоната натрия.

Электровосстановление органических соединений, содержащих карбонильную группу, в целом изучено довольно подробно [8, 9]. Карбонильная группа обладает достаточно выраженной полярностью благодаря смещению электронов в сторону атома кислорода. Вследствие этого смещения углеродный атом карбонильной группы несет положительный заряд и адсорбция карбонильного соединения на отрицательно заряженной катодной поверхности (карбонильное соединение восстанавливается при отрицательных потенциалах) протекает по углеродному атому.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В кислых растворах процесс сопровождается обычно выделением больших количеств водорода. В щелочных растворах, где концентрация ионов водорода понижена, большая часть тока расходуется на восстановление карбонильного соединения с образованием анион-

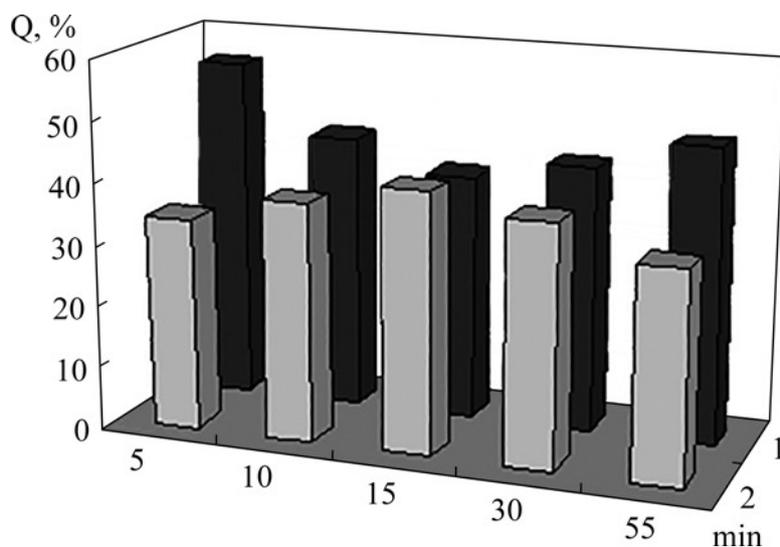


Рис. 2. Изменение содержания молочной (1) и пировиноградной (2) кислот в катодной камере электролизера.

Таблица 1. Изменение ферментированной молочной сыворотки (2 дня) в процессе электрообработки

t, мин	Сыворотка, ферментированная в продолжение двух дней					
	рН катодной камеры	Окислительно-восстановительный потенциал катодной камеры, мВ	рН анодной камеры	Окислительно-восстановительный потенциал анодной камеры, мВ	Угол поляризации, градусы	
					Катодная камера	Анодная камера
Исходная	– 4,37					
5	2,06	+224	8,9	–219		+0,01
10	6,3	+16	8,82	–116		+0,03
20	6,45	+6	4,25	+154	+0,6	+0,03
40	8,82	–113	2,35	+265	+0,8	+0,03
55	10,73	–224	2,32	+260	+2,6	+0,04

Таблица 2. Изменение неферментированной молочной сыворотки в процессе электрообработки

t, мин	Сыворотка неферментированная					
	рН катодной камеры	Окислительно-восстановительный потенциал катодной камеры, В	рН анодной камеры	Окислительно-восстановительный потенциал анодной камеры, мВ	Угол поляризации, градусы	
					Катодная камера	Анодная камера
исходная	– 4,6					
5	5,14	+103	9,0	–442		
10	8,26	–79	3,6	+184		+0,04
40	9,6	–157	2,3	+286		+0,05
55	9,0	–80	3,0	+180	+2,0	+0,08

радикалов, которые более склонны к димеризации, так как их восстановление затруднено по сравнению со свободным радикалом.

Так, при восстановлении пировиноградной кислоты в катодной камере электролизера получена молочная кислота и небольшое количество одного из изомеров янтарной кислоты.

Пировиноградная кислота (пируват) рассматривается как промежуточное соединение для получения продуктов тонкого органического синтеза. Использование высокой исходной концентрации L-молочной кислоты приводит к ингибированию активности фермента гликолатоксидазы (фермента образования пирувата), который в свою очередь ограничивает скорость окисления молочной кислоты.

В первые минуты электрообработки количество молочной кислоты уменьшается из-за миграции в анодную камеру (как видно на рис. 2), но, так как в катодной камере происходит процесс ее восстановления, через определенное время замечается существенный ее рост за счет накопления гидроксильных ионов при разложении воды.

При молочнокислом брожении пировиноградная кислота (пируват) под действием фермента лактатдегидрогеназы восстанавливается в молочную кислоту.

Пировиноградная кислота образует комплекс фермент–субстрат, который в дальнейшем легко распадается с образованием уксусного альдегида, тиаминпирофосфата и углекислоты.

Таблица 3. Изменение концентрированной до 8% сухих веществ молочной сыворотки в процессе электрообработки

t, мин	Сыворотка, концентрированная до 8% сухих веществ					
	рН катодной камеры	Окислительно- восстановительный потенциал катодной камеры, мВ	рН анодной камеры	Окислительно- восстановительный потенциал анодной камеры, мВ	Угол поляризации, градусы	
					Катодная камера	Анодная камера
Исходная – 4,36, исходная конц. – 4,46						
5	6,91	+1	4,35	+148	+2,6	+0,02
10	8,11	–70	4,43	+143	+2,7	+0,03
20	10,46	–206	5,0	+82	+2,4	+0,04
40	10,56	–212	3,5	+200	+3,1	+0,38

Таблица 4. Изменение концентрированной до 10% сухих веществ молочной сыворотки в процессе электрообработки

t, мин	Сыворотка, концентрированная до 10% сухих веществ					
	рН катодной камеры	Окислительно- восстановительный потенциал катодной камеры, мВ	рН анодной камеры	Окислительно- восстановительный потенциал анодной камеры, мВ	Угол поляризации, градусы	
					Катодная камера	Анодная камера
исходная – 4,62; исходная конц. – 5,98						
5	5,07	+106	6,39	+29	+2,2	+0,02
10	6,86	+2	2,80	+237	+2,6	+0,07
40	10,11	–187	1,67	+303	+4,1	+0,09
55	10,52	–211	1,98	+286	+1,8	+0,23

Скорость всей ферментативной реакции зависит от кислотности среды и способности СС-оксигруппы отдавать свой протон. Большое значение имеют состав раствора, особенно рН и температура.

Целью авторов также было определение зависимости получения изомера L(+)-молочной кислоты от степени концентрирования сыворотки. Предполагаем, что существует зависимость электропроводности от концентрации сухих веществ и активной кислотности творожной сыворотки при различных температурах, благодаря которой возможно определить рациональные технологические параметры концентрирования творожной сыворотки [6] в аппарате эжекторного типа.

На основании литературных данных [10, 11] и предварительных экспериментальных исследований тепловую нагрузку системы поддерживали 55 °С, давление – 6–11 кПа, температуру поверхности конденсатора – 25–30 °С. В качестве объектов исследований применяли сыворотку с массовой долей жира 0 и 5%. Концентрирование данных продуктов проводили при температуре 20–60 °С сыворотки в выпарном аппарате эжекторного типа, учитывая его меньшее разрушающее воздействие на белок исходного продукта.

Температурный режим выбран с учетом органолептических и физико-химических показателей, кинетики процесса и удельных затрат теплоты на 1 кг удаленной влаги. Следует отметить, что сыворотку можно сгущать при различных температурах и разной продолжительности в зависимости от необходимой массовой доли сухих веществ в концентрируемом продукте.

Лучшие результаты получены с ферментированной молочной сывороткой, когда чистый изомер L(+)-молочной кислоты концентрировался в катодной камере электролизера (табл. 1), в отличие от образца с неферментированной сывороткой (табл. 2).

В экспериментах с подсушенной (концентрированной) молочной сывороткой наблюдали наличие чистого изомера L(+) в катодной камере в первые 5–10 минут работы электролизера (табл. 3, 4). Существует различная оптическая величина структурных изомеров (попытки Ги и Крум–Броуна отыскать зависимость между величиной и направлением вращения и массой одноатомных групп, связанных с асимметрическим углеродным атомом [12]); отмечены явления изменения величины оптической деятельности и даже перемены ее знака для растворов молочной

кислоты в зависимости от концентрации этих растворов [13].

ВЫВОДЫ

Совершенствование технологии производства молочной кислоты должно быть основано на использовании перспективных источников углеводов для биоконверсии в целевой продукт, оптимизации технологических параметров на всех стадиях ее получения.

Совершенствование методов концентрирования и очистки растворов молочной кислоты, использование отходов производства позволит снизить энергоемкость и антропогенную нагрузку на окружающую среду.

В катодной камере с более концентрированной сывороткой наблюдается плавный переход в щелочную зону, она является камерой концентрирования именно L(+)-молочной кислоты.

Молочная кислота, получаемая на стадии катодного восстановления, предпочтительно имеет изомерную чистоту, составляющую по меньшей мере 99%.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Масаказу Сузуки (JP); Есиеки Саито (JP); Есито Икада (JP); Хью Хйон Суон (JP). Способ модификации медицинского материала из поли-L-молочной кислоты. Патент РФ № 2050162 С1. Оpubл. 1995.12.20. www.fips.ru
2. Глотова, В.Н., Новиков, В.Т., Яркова, А.В., Иженбина, Т.Н., Гордеева, О.С., Концентрирование растворов молочной кислоты для получения лактида, *Фундаментальные исследования*, 2013, № 8, с. 580.
3. Глотова, В.Н., Новиков В.Т., Ушакова Т.В., Получение олигомера молочной кислоты, *Изв. вузов. Химия и хим. технология*, 2019, т. 62, № 6, с. 23. <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20196206.5859>.
4. Морозов, В.Ю., Штамм бактерий *Enterococcus faecium* В-2240D – продуцент оптически чистой L(+)-молочной кислоты и промышленный способ получения L(+)-молочной кислоты и ее солей. Патент RU 2205216 С2. Оpubл.: 2003.05.27. www.fips.ru
5. Шинкарев, С.М., Самуйленко, А.Я., Неминущая, Л.А., Скотникова, Т.А., и др., Совершенствование микробиологического синтеза молочной кислоты, *Вестн. Казанского технологич. унив.*, 2017, т. 20, № 18, с. 165.
6. Дворецкий, Д.С., Зюзина, О.В., Маркин, И.В., Козодаева, М.В., и др., Совершенствование условий биосинтеза молочной кислоты лактобактериями, *Вестн. Казанского технологич. унив.*, 2017, т. 20, № 8, с. 126.
7. Колеснов, А.Ю., Володина, Е.М., Альперович, Е.Д., Ферментативный анализ изомеров молочной кислоты в молочных продуктах и сыре, *Пищевая промышл.*, 1997, № 3, с. 32.
8. Томилов, А.П., Электрохимическая активация – новое направление прикладной электрохимии, *Жизнь и безопасность*, 2002, № 3, с. 302.
9. Томилов, А.П., Развитие отечественной электрохимии органических соединений (1940–2002 гг.), *Рос. химич. журнал*, 2005, т. XLIX, № 5, с. 4.
10. Соколовская, Л.Н., Ракова, Е.А., Дымар О.В., Ферментативный гидролиз в технологии сгущенной сыворотки, *Продукт ВУ* (Минск), 2017, № 7(183).
11. Попов, А.М., Турова, Н.Н., Стабровская, Е.И., Совершенствование процесса выпаривания творожной сыворотки методом прямого нагрева при производстве быстрорастворимых напитков, *Хранение и переработка сельхозсырья*, 2019, № 3, с. 64.
12. Choksi, N. and Desai, H., Synthesis of biodegradable polylactic acid polymer by using lactic acid monomer, *J. Appl. Chem.*, 2017, vol. 13, no. 2, p. 377.
13. Илиел, Э., Вайлен, С., Дойл, М., *Основы органической стереохимии*. М.: Бинном. Лаборатория знаний, 2007. 703 с.

Summary

The results of investigations of obtaining the L(+) optical isomer of lactic acid from different types of whey are presented – of the initial, fermented, and concentrated in an electrolysis-type apparatus with a separating diaphragm. The rate of obtaining the L(+) isomer of lactic acid in the anode chamber of the electrolyzer was determined depending on the concentration of whey.

Keywords: lactic acid, lactic acid isomers, polarization angle