

5 października 1929 r.

URZĄD PATENTOWY



RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

OPIS PATENTOWY

C12 d. 1104

Nr 10544.

Kl. 12 o 11.

Montan- und Industrialwerke vormals Joh. Dav. Starck
(Dolní Rychnov, Czechosłowacja).

Spesób wytwarzania kwasu cytrynowego przez fermentację.

Zgłoszono 21 kwietnia 1928 r.

Udzielono 27 maja 1929 r.

Pierwszeństwo: 16 grudnia 1927 r. (Czechosłowacja).

Wiadomo, że pewne określone pleśniami z grup *Aspergillus*, *Citromyces*, *Mucor*, *Penicillium* i innych mogą z roztworu cukru zawierającego pożywkę tworzyć i gromadzić większe ilości kwasu cytrynowego. Powyższą obserwację (z *Cytromycetami*) zrobił Wehmer (1893), uzyskując pierwszy odnośny patent (patent niemiecki Nr 72957 z 20 lutego 1894 r.). Wehmer pracował z odmianą *Penicillium*, którą później oznaczył jako *Cytromyces*. W patencie niemieckim Nr 91891 z 13 kwietnia 1897 r. fermentacja cukru na kwas cytrynowy zapożyczoną z *Mucor piriformis* została opatentowana przez „Fabriques de produits chimiques de Thann et de Mulhouse”. B. Zahorski odkrył działanie *sterigmatocystis* ni-

gra, odmiany *Aspergillus*, przy fermentacji na kwas cytrynowy, co zastrzegł sobie w patencie amerykańskim Nr. 1066358 z 1 lipca 1913 r. Późniejsze badania wykazały, że własność przemiany cukru na kwas cytrynowy w określonych warunkach posiadają tylko czarne odmiany *Aspergillus*, a mianowicie, że grzyby te w warunkach sprzyjających wielokrotnie przewyższają działanie uprzednio wymienionych. Ostatnimi czasy owa „fermentacja cytrynowa” (na kwas cytrynowy) stała się przedmiotem wielu prac naukowych; poniżej są podane najnowsze prace opierające się na starszych pracach lub je krytycznie omawiające:

J. N. Currie: „The citric acid ferment-

tation of *Aspergillus niger*". The Journal of the Biological Chemistry. Tom XXXI (1917). Strona 15—37.

K. Bernhauer: „Ueber die Säurebildung durch *Aspergillus niger* I—III". Biochemische Zeitschrift. Tom 172 (192). Strona 296—349.

H. Amelung: „Beiträge zur Säurebildung durch *Aspergillus niger*" Hoppe-Syeller's Zeitschr. für physiologische Chemie. Tom 116 (1927). Strona 161—209.

Z literatury powyższej wynika następujący obraz obecnego stanu naszych wiadomości o fermentacji cytrynowej:

Jako substrat fermentacji nadaje się nie tylko cukier trzcinowy, lecz również maltoza, cukier inwertowy, glukoza i inne rodzaje cukru oraz alkohole o 3, 5 i 6 atomach węgla. Należy tu dodać jeszcze sole odżywcze, a mianowicie nieorganiczne związki azotu (sole amonowe lub azotany), następnie sole potasowe, kwas fosforowy, siarkę, sole magnezjowe i wapniowe obok śladów soli ciężkich metali.

Szczególnie duże znaczenie nadaje się zawartości azotu w cieczy fermentacyjnej, choć wyniki rozmaitych prac na ten temat nie są zgodne. Naogół zauważyć można, że względnie duże ilości azotu w środowisku fermentacyjnym powodują silny wzrost myceli, oraz złą wydajność kwasu cytrynowego. Niektórzy autorzy wogóle uzależniają dobrą wydajność kwasu cytrynowego od braku azotu. Currie podaje następujący najlepszy skład roztworu (na 1000 cm³) dla fermentacji cytrynowej za pomocą *Aspergillus niger*:

Sacharoza	125 do 150 g
NH ₄ NO ₃	2,0 „ 2,5 g
KH ₂ PO ₄	0,75 „ 1,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20 „ 0,25 g

zakwaszone kwasem solnym (5—4 cm³ n/5 HCl) aż do początkowej kwasowości o Ph 3,4 do 3,5.

Temperatura, w której przebiega fermentacja, zależy od użytych pleśniaków, leży między 10° i 40°C.

Oprócz wymienionych na początku patentów fermentacji cytrynowej dotyczą również następujące patenty:

Patent austriacki Nr 101009 (z 28 lutego 1925 r. dr. Josef Szücs), według którego dla specjalnie dobranego rodzaju czynnych pleśniaków przy fermentacji stosuje się melasę jako roztwór odżywczy (pożywkę); patent niemiecki Nr 426926 (z 29 marca 1926 r., dr. Richard Falck), w którym za substrat fermentacyjny służą stałe substraty, zawierające skrobię, i angielskie patenty Nr 266 414 oraz 266 415 (z 28 lutego 1927 r., Auguste Fernbach, John Lewis Yuil i Rowntree & Co. Ltd.), według których fermentuje się roztwór sacharozy lub innego cukru o początkowej wysokiej kwasowości, wywołanej przez dodatek mocnych kwasów; dzięki temu sterylizacja gorąca staje się zbyteczna, zaś procesowi fermentacji ułatwia się lub zapewnia jałowość. W dalszych dodatkowych zastrzeżeniach patentowych fermentacja jest gospodarczo opracowana.

Jak widać, wynalazcy dążą do ujęcia przebiegu fermentacji cytrynowej w formę pewnego, pod względem gospodarczym i technicznym, opracowanego sposobu; jest to również celem niniejszego patentu.

Warunki ekonomicznego fabrycznego wytwarzania kwasu cytrynowego, prócz celowego wyboru taniego surowca, są następujące: cukier powinien być przetwarzany na kwas cytrynowy z możliwie wysoką wydajnością, wytworzony kwas cytrynowy nie powinien być dalej odbudowywany, przetworzenie cukru na kwas cytrynowy winno odbywać się szybko, a więc z dużą wydajnością na jednostkę czasu i wytwarzanie kwasu cytrynowego winno się odbywać w takich technicznych urządzeniach, by na jednostkę włożonego kapitału inwestycyjnego uzyskać możliwie dużą wydajność

kwasu cytrynowego. Ważniejszym prócz momentów natury gospodarczej jest uzyskanie stałej pewności i równomierności wydajności procesu. Tutaj najważniejszą rolę odgrywa wybór i trwałość grzyba o właściwościach fermentacyjnych.

Wybór i hodowla grzyba winna się odbywać zapomocą znanych metod analizy mykologicznej i hodowli mykologicznej w taki sposób, aby grzyb w warunkach późniejszego procesu dawał najwyższą wydajność. Stwierdzono, że najodpowiedniejszymi do przeprowadzania fermentacji cytrynowej są określone czyste kultury *Aspergillus niger*. Następnie przekonano się podczas rozpoczynania hodowli względnie trwałej hodowli grzyba, że przy hodowli na żelatynie, na agar-agar lub na stałych pożywkach, podczas której zbiera się zarodniki (spory) dla wysiewu przy fermentacji technicznej, należy przeprowadzać co pewien czas przy sprzyjających przemysłowych warunkach fermentację dolną (Kleingärung) oraz zmiany cyklu rośnięcia, przyczem jako pożywki używa się owoce i części roślin, zawierające pewne kwasy organiczne i bogate w witaminy. Jako takie nadają się cytryny, pomarańcze, pomidory i podobne owoce. Okazało się, że przy tego rodzaju hodowli otrzymane zarodniki (spory) kwaszą wyjątkowo czysto, a siła fermentacji kolonii utrzymuje się stale.

Przy badaniach nad fermentacją cytrynową cukru stwierdzono, że jest to proces przebiegający w komórkach grzyba przy działaniu tlenu, koniecznego do tej reakcji. Dla wyników technicznych jest obojętne, czy tworzenie kwasu cytrynowego jest procesem życiowym, czy fermentacyjnym. Stwierdzono natomiast, że chodzi tu o proces bardzo skomplikowany, który tylko w zupełnie określonych warunkach odbywa się czysto i z najlepszą wydajnością na jednostkę czasu i jednostkę użytego cukru.

Przy fermentacji cytrynowej w celach przemysłowych używa się jako roztwór cukru zacier fermentacyjny tego rodzaju, który służy przy fabrykacji spirytusu za surowiec fermentacji alkoholowej. Najdogodniejszymi rodzajami cukru jest sacharoza i maltoza. Przy wytwarzaniu zacieru przez scukrzenie surowców, zawierających skrobę lub inne spolimeryzowane węglowodany okazuje się, że dla dalszego kwaszenia ma wielkie znaczenie rodzaj procesu scukrzania. Tylko zupełnie określone sposoby scukrzania dają zacier najprzystatniejszy do fermentacji; dają się tu również użyć z dobrym wynikiem diastatyczne zdolności grzyba obok innych znanych środków pomocniczych.

Dla przeprowadzenia fermentacji cytrynowej oprócz cukru ważne są sole odżywcze, wymienione na początku. Są one zawarte w zacierze technicznym, zawierającym cukier, lub też winny być dodane w odpowiednich ilościach.

Co do ilości dodatków celem otrzymania najlepszej wydajności poniższe rozważania dają odpowiednie wnioski:

Cukier znajdujący się w roztworze fermentacyjnym, lub inne węglowodany i związki węgla zdolne do fermentacji, jest użyty po pierwsze do nadbudowy samego organizmu grzyba, po drugie jako źródło węgla dla tworzenia kwasu cytrynowego i mniej lub więcej niepożądanych produktów ubocznych fermentacji cytrynowej, a po trzecie do oddychania, a więc jako źródło energii procesów życiowych grzyba i ewentualnie procesów tworzenia kwasu cytrynowego. Z powyższego przeglądu wynika, że im więcej cukru zużywa się na tworzenie kwasu cytrynowego, t. j. na gospodarczo-twórczą część procesu fermentacji, tem mniej cukru zostaje zużyte na budowę komórek i tworzenie energii. Na budowę komórek ma wpływ według znanych praw wzrostu pożywka znajdująca się w minimalnych ilościach. Ten wpływ jest o tyle

ograniczony, o ile pożywka przedostaje się do komórki. Należy tedy przebieg fermentacji tak dobrać, by wzrastanie i dostarczanie energii było ograniczone do minimum. Odbywa się to w ten sposób, że używa się, jako dający się regulować czynnik wzrostu, składnik roztworu fermentacyjnego, który w technicznym roztworze cukru znajduje się już w minimalnej ilości. Ewentualnie przez uprzednie chemiczne lub mechaniczne przerobienie technicznego roztworu cukru, jednakże bez zepsucia go, można zmniejszyć do pewnego dającego się regulować minimum składnik powodujący wzrost, np. zawartość kwasu fosforowego. Przy tem rozważaniu należy wziąć pod uwagę, że w komórce powinien zachodzić wzrost grzyba i proces tworzenia kwasu cytrynowego, przyczem odgrywa tu pewną rolę wpływ procesów w cieczy fermentacyjnej (dyfuzja w spoczywającym roztworze fermentacyjnym, umyślnie wywołana konwekcja w ruchomym roztworze pożywki) na stan wewnętrzny komórki oraz stan ścian komórkowych (które są funkcją morfologicznych rodzajów grzybów i sposobu hodowli). Przebieg dyfuzji przy spokojnej fermentacji górnej zależy od wysokości warstwy roztworu fermentacyjnego, która ze względów gospodarczych winna być dostatecznie duża. Z tych rozważań widać, jak ważną jest znajomość właściwej ilości ciał odżywczych przy półciąglym lub ciągłym sposobie fermentacji cytrynowej.

Dotychczasowe dane w literaturze i opatentowane sposoby nie biorą pod uwagę jakości ciał odżywczych. Okazało się, że w jednakowych warunkach ma wielkie znaczenie rodzaj związków azotowych, w których azot ma działanie odżywcze. Pewne określone organiczne związki azotu są najdogodniejsze, gdyż według wszelkiego prawdopodobieństwa dostają się do komórki wraz z cukrem w pewnym dogodnym stosunku i w komórce zostają bez szczególnego nakładu energii przetworzone na

protoplazmę i fermenty, sprzyjające tworzeniu kwasu cytrynowego. Do pożywek azotowych tego rodzaju należą przede wszystkim aminokwasy oraz inne produkty rozkładu i odbudowy białek. Mogą się one znajdować uprzednio w określonym technicznym roztworze cukru lub mogą być do niego dodane w postaci ługów po rozkładzie białek, otrzymanych w znany sposób (np. przy hydrolizie kleju lub podobnych ciał) lub w postaci ługów pozostałych z poprzednich fermentacji. Można również do roztworów, zawierających azot organicznie związany, dodawać mniejsze lub większe ilości azotu nieorganicznie związanego w postaci soli amonowych lub azotanów albo obu razem. Ilość i rodzaj dodatków azotowych reguluje się w zależności od warunków fermentacji, szczególnie od sposobu, w jaki przerabiany cukier ma być doprowadzony do komórki.

Następnie okazało się, że dla nagromadzenia kwasu cytrynowego i otrzymywania go w stężeniach dla celów technicznych, t. j. do możliwie całkowitego przerobienia cukru na kwas cytrynowy nie rozkładając dalej ten ostatni, należy do fermentującego roztworu dodać substancje, któreby nie wpływały na przebieg procesu fermentacji, a wiązały natomiast zupełnie kwas cytrynowy lub unieszkodliwiały jego własności kwasowe. Wehmer i inni proponowali, by przy fermentacji do zobojętniania kwasu dodawać kredę. Jest to jednak związane z szeregiem niedogodności (wywiązywanie dwutlenku węgla, alkaliczne działanie zhydrolizowanego węglanu wapnia, co powoduje wywiązywanie amoniaku i t. d.). Te wady odpadają, gdy do powyższego celu używa się substancje organiczne, zawierające lub niezawierające azotu, tak, że osad zupełnie się nie wytwarza. Takie substancje mogą być uprzednio zawarte w technicznym roztworze cukru jako roztwór właściwy lub koloidalny albo też mogą być sztucznie dodane. Należą tu ciała białkowe

i ich produkty rozkładu, następnie węglowodany o wielkiej cząsteczce nie fermentujące i nie wywołujące fermentacji oraz inne podobne związki.

Substraty fermentacyjne podane wyżej poddaje się fermentowaniu na kwas cytrynowy według znanego sposobu, poczem w wiadomy sposób kwas cytrynowy otrzymuje się z ługów. Pozostałości ługów można przerabiać dalej w znany sposób.

Poniżej podano kilka przykładów wykonania sposobu według wynalazku.

Przykład I. W 1000 cm³ wody rozpuszcza się 150 g cukru, 2 g azotanu amonowego, 1 g drugorzędowego (kwaśnego) fosforanu potasowego i 0,2 g siarczanu magnezowego. Roztwór wlewa się jałowo do naczynia fermentacyjnego. Po ostudzeniu szczepi się świeżo wydzielonym nie hodowanym jeszcze *Aspergillus niger*. W normalnym czasie fermentacji po 15 dniach przy temperaturze 25°C otrzymuje się 42 g cytrynianu potasu, t. j. 28% użytego cukru. Po fermentacji pozostaje 14 g cukru jako odpadki.

Przykład II. Użyto roztworu fermentacyjnego jak poprzednio w przykładzie I, ale zaszczerpiono go zarodnikami (sporami) *Aspergillus niger*, który już był poprzednio hodowany w podany sposób. Po 15 dniach otrzymano 70 g cytrynianu potasu, co odpowiada 46,6% wydajności, przy czem 12 g cukru pozostało.

Przykład III. Użyto zacieru fermentacyjnego, składającego się 1000 cm³ scukrzonego roztworu zacieru (o zawartości 15% cukru), do którego dodano 4 g azotu pod postacią zhydrolizowanego roztworu kleju, 0,4 g kwaśnego fosforanu potasu, 0,2 g siarczanu magnezowego i 1 g siarczanu potasowego. Zacier fermentacyjny nastawiono na stężenie jonów wodorowych $P_h = 6$, wyjałowiono i wprowadzono do naczynia fermentacyjnego. Po ostudzeniu zaszczerpiono zarodnikami *Aspergillus niger*, hodowanymi na tym samym roztwo-

rze zasadniczym (macierzystym) w zastosowaniu okresów fermentacyjnych w sposób wyżej podany. Po 15-dniowym okresie fermentacji przy 25°C otrzymano 10 g odpadków cukru, 104 g cytrynianu potasowego, co odpowiada wydajności 69,3% cytrynianu potasowego (z 1 cząsteczką wody krystalizacyjnej) na ilość użytego cukru.

Rozumie się samo przez się, że przykłady te służą jedynie do zobrazowania zasady niniejszego wynalazku i że wynalazek nie ogranicza się tylko do przytoczonych danych.

Zastrzeżenia patentowe.

1. Sposób wytwarzania kwasu cytrynowego przez fermentację roztworów cukru lub innych węglowodanów lub zdolnych do fermentacji związków węgla zapomocą pleśniaków, znamienny tem, że wybrane pleśniaki hoduje się w taki sposób, iż przy hodowli grzybów na żelatynie, agar-agar lub na stałych pożywkach, z których pobiera się zarodniki (spory) zdolne do rozmnażania, stosuje się okresy pracy, podczas których pozwala się porastać grzybowi na ciekłej pożywce, odpowiadającej warunkom fermentacji, stosowanym w przemyśle, a następnie okresy rośnięcia na takich naturalnych pożywkach, jak np. owoce, zawierające organiczne kwasy (np. kwas cytrynowy lub garbnikowy) i jednocześnie bogate w witaminy, jak np. cytryny, pomarańcze lub podobne.

2. Sposób wytwarzania kwasu cytrynowego przez fermentację cukru lub innych węglowodanów i związków węgla zdolnych do fermentacji zapomocą pleśniaków hodowanych według zastrz. 1, znamienny tem, że za środowisko odżywcze (pożywkę) służy techniczny zacier, taki jaki się używa do otrzymywania spirytusu, z substancjami odżywczymi, których ilość jest

tak dobrana, że wzrost organizmu grzyba, przy uwzględnieniu prądu rozpuszczonych ciał, płynącego do komórki i z komórki, wymaganego przy wykonywaniu sposobu, jest sprowadzony do koniecznego minimum tak, że stwarza się warunki do najkorzystniejszego przerobu cukru na kwas cytrynowy.

3. Sposób wytwarzania kwasu cytrynowego przez fermentację według zastrz. 1 i 2, znamienny tem, że w roztworze fermentacyjnym azot odżywczy całkowicie lub częściowo znajduje się w postaci organicznych związków azotu, sprzyjających kwa-

śnieniu, a przedewszystkiem w postaci aminokwasów organicznych.

4. Sposób według zastrz. 1—3, znamienny tem, że roztwór fermentacyjny zawiera substancje unieszkodliwiające własności kwasowe kwasu cytrynowego względnie wiążą go w duże kompleksy cząsteczkowe, które nie mogą prędko dostawać się do komórek.

Montan- und Industrialwerke
vormals Joh. Dav. Starck.

Zastępca: Inż. S. Pawlikowski,
rzecznik patentowy.