



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

206 991

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 24 10 79
(21) PV 7203-79

(51) Int. Cl. C 12 P 7/48

(40) Zveřejněno 15 09 80
(45) Vydáno 01 11 83

(75)

Autor vynálezu LEOPOLD JINDŘICH doc. dr. ing., ULČ JAROSLAV ing., PLZEŇ, ČERNÝ VÁCLAV ing.,
PAŠEK JAROSLAV a TREFIL LADISLAV ing., KAZNĚJOV

(54) Způsob přípravy melasového substrátu pro citronové kvašení

1

Vynález se týká způsobu přípravy melasového substrátu pro citronové kvašení pro produkční kmeny houby *Aspergillus niger* zvláště citlivé vůči inhibitorům v melase.

Jak známo, vyžaduje melasový substrát pro citronové kvašení především úpravu pH, koncentrace fosfátu a přísadu optimálního množství hexakvanoželeznatanu draselného, event. dalších sloučenin, aby spory použitého produkčního kmene houby *Aspergillus niger* dobře vyklíčily a hyfy vyrostly v souvislý mycel, který má přeměnit cukr melasy v kyselinu citronovou. Dále je nutné volit podle daného druhu melasy a použitého kmene vhodný způsob přípravy substrátu, aby bylo dosaženo optimálních výtěžků. Obvykle se melasové roztoky s přísadami vaří s větší než konečnou koncentrací cukru po určitou dobu a doplní biologicky nezávadnou vodou na konečný objem, čímž se zároveň zchladí. Někdy se používá místo varu ohřev na 80 - 95 °C. Melasový roztok lze též vařit s přísadami v konečném objemu a po ukončené operaci zchladit na žádanou teplotu. Existují různé varianty uvedeného všeobecného postupu, například se nechá přitékat melasa s kyselinou sírovou nutnou k její neutralizaci do téměř vroucího roztoku obsahujícího celkovou dávku hexakvanoželeznatanu draselného dle čs. patentu č. 121 832. Při další variantě je roztok hexakvanoželeznatanu okyselen kyselinou sírovou podle čs. patentu č. 130 943. U krátkodobého způsobu se přivede melasový roztok s přísadami do varu, který se udrží pouze 10 - 20 minut, načež se doplní studenou vodou na konečný objem viz čs. autorské osvědčení č. 190 769. Někdy se používá hexakvanoželeznatan draselný

208 881

v kombinaci s etyléndiaminotetraacetátem dle čs. patentu 135 387. Některé melasy vyžadují přídavek zinku ve formě zinečnaté soli. V poslední době byla věnována pozornost řízení koncentrace volného a vysráženého iontu hexakynoželesnatanu, o kterých bylo zjištěno, že mají zásadní vliv na tvorbu kyseliny citronové jak je popsáno v čs. patentu č. 188 969. Ve většině případů vystačíme k získání dobrých výtěžků kyseliny citronové se shora uvedenými způsoby přípravy kvasného substrátu, ať již zpracováváme různé druhy melas nebo používáme různé produkční kmeny houby *Aspergillus niger*. Vyskytují se však kmeny, pro které žádný z dosavadních způsobů přípravy melasového substrátu není vhodný, neboť tyto kmeny houby *Aspergillus niger* jsou vůči doposud neznámým inhibitorům obsaženým v melasách náchylné v tom smyslu, že jejich spory nevyklíčí nebo klíčí opožděně a růst hyf je brzděn, slabý mycel brzy zastaví projevy života, smáčí se a nakonec se potopí. Taková citlivost produkčního kmene vůči většině melas představuje tím větší nedostatek, čím více vyniká dotyčný kmen svou biochemickou aktivitou a schopností skvasit melasový substrát ve větších než obvyklých výškách a s většími koncentracemi cukru, a to s dobrými výtěžky kyseliny citronové. Tímto způsobem lze totiž stávající kapacitu kvasného prostoru značně zvětšit. Podařilo se vypěstovat kmen houby *Aspergillus niger* (s označením L2 naší sbírky a s označením GCM - F - 663 oficiální sbírky mikroorganismů) se shora popsanými vlastnostmi vysoce kvalitního producenta kyseliny citronové, který však vůči většině zkoušených melas, respektive jejich dosud neznámých inhibitorů je tak citlivý, že jej nelze aplikovat v provozu citronového kvašení. Patří tedy do skupiny shora popsaných vysoce aktivních a zároveň citlivých kmenů houby *Aspergillus niger*. Doposud nebyl znám postup, jakým by se daly předpokládané inhibitory melas, které stěžují nebo znemožňují klíčení konidií a růst hyf zmíněného produkčního kmene houby *Aspergillus niger* odstranit nebo rozrušit.

Zmíněné potíže a nedostatky při nasazení citlivého produkčního kmene houby *Aspergillus niger* odstraňuje vynález dvoustupňové přípravy melasového substrátu, přičemž první stupeň probíhá při vyšší teplotě pod tlakem a druhý probíhá při atmosférickém tlaku. V prvním stupni se melasový roztok po úpravě pH a po přísadě hexakynoželesnatanu draselného zahřeje v tlakové nádobě na 105 - 130 °C a tato teplota se udržuje na dobu 10 - 60 minut. Po ukončení reakce prvního stupně se melasový roztok podle vynálezu podrobí druhému stupni, který spočívá v tom, že je roztok přečerpán do běžné varné nádoby, ve které je sředěn vodou na 25 - 30 % cukru a vařen při normálním tlaku dalších 5 - 50 minut. Během této etapy dochází ke stabilizaci koncentrace volného hexakynoželesnatanu; je též možno provést korekci jeho koncentrace buď jeho snížením 15 min. varem s formalínem nebo zvýšením přísadou žádaného množství hexakynoželesnatanu draselného do schlazeného roztoku. Po ukončeném varu je roztok doplněn biologicky nezávadnou vodou na konečný objem, čímž se substrát zároveň ochladí. Nyní se přidá kyselina fosforečná nebo fosfát a podle charakteru melasy též síran zinečnatý nebo jiné přísady. Dávka hexakynoželesnatanu draselného nemusí být v prvním stupni optimální a konečná, neboť se dá během druhého stupně i po jeho ukončení ještě korigovat. První stupeň přípravy substrátu podle vynálezu plní především funkci eliminace inhibitorů klíčení a růstu hyf v melase, zatímco druhý stupeň přípravy podle vynálezu stabilizuje konečné optimální složení substrátu a zaručuje vysoké a reprodukovatelné výtěžky kyseliny

liny citronové. Var pod tlakem v prvním stupni lze provést přímou parou nebo nepřímou topným hadem případně duplikátorem. Prvý a druhý stupeň přípravy podle vynálezu lze též provést pouze v jedné tlakové nádobě, která v tomto případě však musí mít větší obsah, odpovídající konečnému objemu substrátu. Dávkování přísad, zvláště hexakvanoželeznatému draselného, lze rozdělit do dvou stupňů.

Pro demonstraci významu vynálezu byly srovnány kvasné substráty připravené z několika druhů melas jednak podle běžné metody, jednak podle vynálezu. Substráty připravené běžnými metodami jsou zkvasitelné produkčním kmenem L1, ne vždy však produkčním kmenem L2, citlivým vůči inhibitorům těchto melas; kmen L2 však zkvasí substráty připravené podle vynálezu. Výsledky srovnávacích pokusů jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka I: Výtěžky kyseliny citronové po zkvašení melas připravených jak běžným způsobem, tak i podle vynálezu s kmeny L1, K, L2. Výška substrátu 9 cm, doba kvašení 9 dní.

Výtěžnost kyseliny citronové v % na nasazený cukr (15 g)

druh melasy	Substrát běžný způsob kmen	Substrát běžný způsob			Substrát podle vynálezu		
		L1	K	L2	L1	K	L2
I		70,5	64,2	78,6	74,1	68,2	90,5
II		69,8	58,1	x	73,7	65,6	89,2
III		60,5	55,2	62,1	65,3	62,3	86,5
IV		56,8	51,7	x	62,7	63,1	87,0

x - substrát nezkvasitelný kmenem L2

Při srovnání výsledků pokusů uvedených v tabulce I vidíme, že na melasách zpracovaných podle vynálezu získáme lepší výtěžky kyseliny citronové, než ze stejných melas zpracovaných běžným způsobem. U kmene L1 se zvýší výtěžnost kyseliny citronové o 3 - 6 %, u kmene K o 4 - 12 %, a kmen L2 dával nejvyšší výtěžky kyseliny citronové, přestože substráty připravené běžným způsobem byly těžko zkvasitelné, popř. vůbec nezkvasitelné (melasy II a IV). Tato skutečnost ukazuje, že všechny zkoušené kmeny houby *Aspergillus niger* jsou citlivé vůči inhibitorům melas, ale v různé míře. Uvedené nálezy znovu potvrzují známou skutečnost, že substrát a produkční kmen tvoří biologickou jednotu a že výsledek biochemické činnosti je třeba posuzovat jako výslednici tohoto souboru.

Vhodná kvalita substrátu připraveného podle vynálezu se zvláště projevuje u nejcitlivějšího, ale velmi aktivního kmene L2, který je schopen na tomto substrátu efektivně zkvasit vrstvu až do 15 cm výšky, nebo koncentraci cukru až do 18 %, popř. jejich kombinace. Tím docílíme nejen dobrých výtěžků kyseliny citronové, ale současně se zvýší kapacita kvasného oddělení.

P ř í k l a d 1

V tlakové nádobě vybavené míchadlem a přívodem tlakové páry připravíme za studena melasový roztok s koncentrací cukru 40 %, upravíme pH roztoku zředěnou kyselinou sírovou na 6,8 a přidáme předem vyzkoušené množství hexakynoželeznatanu draselného. Po uzavření nádoby zahřejeme roztok přívodem přímé páry na teplotu 115 °C, kterou udržíme po dobu 30 minut. Potom přečerpáme roztok do beztlakové varné nádoby, zředíme ho na koncentraci 30 % cukru a vaříme za míchání dalších 30 minut. Pak ředíme melasový roztok biologicky nezávadnou vodou na koncentraci 15 % cukru, čímž se roztok zároveň zohladí na 60 °C a přidáme 0,09 g kyseliny fosforečné na 1 litr roztoku. Koncentrace volného iontu ferrokyanidu se má pohybovat kolem 10 mg ve 100 ml. Melasový substrát obsahující 15 % cukru je převeden do kvasných misek, zaočkován sporama kmene L2 houby *Aspergillus niger* a zkvašen při 32 °C při výšce vrstvy 9 cm po dobu 9 dní. Výtěžek kyseliny citronové počítaný na nasazený cukr je 87,8 %. Se stejným melasovým substrátem připraveným podle vynálezu a s použitím kmene L1 dává kvasný pokus výtěžek 71,5 kyseliny citronové, s kmenem K 65,0 % kys. citronové. Použitím melasového substrátu připraveného běžným způsobem (1) a s kmenem L1 dává výtěžek 76,5 % a s kmenem K 59,2 %.

P ř í k l a d 2

Kvasný melasový roztok je připraven stejným způsobem jako u příkladu 1 s tím rozdílem, že ohřev je proveden duplikátorem. Výtěžky kyseliny citronové jsou obdobné jako u příkladu 1.

P ř í k l a d 3

Kvasný melasový roztok je připraven podle příkladu 1 nebo příkladu 2, avšak v tlakové nádobě takového rozměru, aby roztok po tlakovém varu mohl být v ní ředěn a vařen při atmosférickém tlaku. V této nádobě se provádí i ředění na konečný objem, takže celý proces dvoustupňové přípravy substrátu probíhá v jedné nádobě.

P ř í k l a d 4

Kvasný melasový roztok je připraven podle příkladu 1 s tím rozdílem, že je celkové množství hexakynoželeznatanu draselného rozděleno do 1. i 2. stupně přípravy a to tak, že se polovina celkového množství hexakynoželeznatanu draselného přidá do 1. stupně a druhá polovina do 2. stupně přípravy substrátu. Optimální množství přidaného hexakynoželeznatanu draselného se v tomto případě liší od množství uvedeného v příkladu 1 a je obvykle nižší.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob přípravy melasového substrátu pro citranové kvašení vyznačený tím, že se provádí ve dvou stupních, přičemž v prvním stupni probíhá var podtlakem při teplotě 105 až 130 °C po dobu 10 až 60 minut a v druhém stupni při atmosférickém tlaku po dobu 5 až 60 minut, přičemž kyselina fosforečná nebo fosfát se přidá až do zchlazeného substrátu a ferrokyanid draselný se přidá v prvním stupni nebo se rozdělí na oba stupně.