



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu nr ———

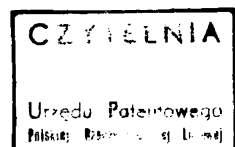
Int. Cl.³ C12N 9/00
C12P 7/48

Zgłoszono: 83 01 21 (P. 240248)

Pierwszeństwo ———

Zgłoszenie ogłoszono: 83 11 21

Opis patentowy opublikowano: 1986 08 29



Twórcy wynalazku: Janusz Milewski, Tadeusz Wiesław Izbicki, Andrzej Zdziemnicki,
Alfreda Lewandowska

Uprawniony z patentu tymczasowego: Instytut Przemysłu Fermentacyjnego,
Warszawa (Polska)

Sposób jednoczesnego otrzymywania preparatu enzymatycznego oraz kwasu cytrynowego

Przedmiotem wynalazku jest sposób jednoczesnego otrzymywania preparatu enzymatycznego, zwłaszcza preparatu pektynolitycznego oraz kwasu cytrynowego z odcieku pofermentacyjnego powstającego podczas hodowli *Aspergillus niger*.

Jak wiadomo, podczas produkcji kwasu cytrynowego przez *Aspergillus niger* metodą powierzchniową, wydzielane są do fazy ciekłej środowiska hodowlanego enzymy, zwłaszcza enzymy pektynolityczne, które mają zastosowanie między innymi w przemyśle spożywczym do klarowania soków owocowych, moszczów winnych, depektynizacji miążg owocowych itp., natomiast podczas hodowli *Aspergillus niger* metodą wglębną wydzielane są głównie enzymy proteolityczne wykorzystywane między innymi w przemyśle paszowym.

Według tradycyjnej technologii kwas cytrynowy zawarty w odcieku pofermentacyjnym poddaje się neutralizacji w wysokiej temperaturze przy użyciu wodorotlenku wapniowego, co powoduje praktycznie całkowitą inaktywację kompleksu enzymów znajdujących się w odcieku.

W literaturze przedmiotu, między innymi z opisu patentowego ZSRR nr 228 651, znany jest sposób otrzymywania preparatu pektynolitycznego i kwasu cytrynowego z cieczy po hodowli *Aspergillus niger* polegający na sublimacyjnym suszeniu całego odcieku i następnie działaniu 55% alkoholem izopropylowym. Enzymy pektynolityczne pozostają w osadzie, a kwas cytrynowy wraz z substancjami balastowymi przechodzi do roztworu, z którego jest odzyskiwany tradycyjnymi metodami.

W czasopiśmie *Prakladnaja Mikrobiologija i Biochimija* 1969 r., nr 3, opisana jest metoda odzyskiwania enzymów z odcieku pofermentacyjnego polegająca na ich adsorpcji na cząsteczkach kwasu benzoowego. Oddzielony adsorbent rozszczepia się alkoholem izopropylowym, a następnie wytrącony preparat enzymatyczny dosusza w temperaturze około 35°C.

W opisie patentowym PRL nr 103 246 przedstawiony jest sposób jednoczesnego otrzymywania preparatu enzymatycznego i kwasu cytrynowego, który polega na tym, że roztwór pofermentacyjny poddaje się neutralizacji w temperaturze poniżej 50°C, po czym po wydzieleniu cytrynianu wapniowego z odcieku, otrzymuje się preparat enzymów pektynolitycznych jedną ze znanych

metod, na przykład poprzez zagęszczanie pod próżnią. Sposobem tym otrzymuje się preparaty enzymatyczne o wysokiej zawartości suchej masy, w tym szczególnie popiołu, co ogranicza jego cechy użytkowe w przemyśle spożywczym.

Celem wynalazku jest opracowanie prostej metody jednoczesnego otrzymywania preparatu o dużej aktywności enzymatycznej przy niskiej zawartości substancji mineralnych oraz kwasu cytrynowego.

Cel ten osiągnięto w sposbie według wynalazku, którego istota polega na tym, że odcinek pofermentacyjny z hodowli *Aspergillus niger* neutralizuje się w temperaturze poniżej 50°C, a następnie wytrącony osad cytrynianu wapnia oddziela się poprzez filtrację. Z osadu odzyskuje się kwas cytrynowy, natomiast filtrat demineralizuje się poprzez elektrodializę przeprowadzoną w temperaturze do 40°C przy gęstości prądu 5 mA/cm²–15 mA/cm², przy czym proces elektrodializy prowadzi się aż do zmniejszenia przewodności elektrycznej do około 30% wartości początkowej.

Podczas elektrodializy substancje wykazujące właściwości elektrolitów przechodzą przez membrany do roztworu zateżanego i w ten sposób filtrat zawierający enzymy praktycznie pozbawiony zostaje soli mineralnych.

Odmineralizowany filtrat zawierający enzymy zagęszcza się na przykład w wyparce próżniowej w temperaturze nie przekraczającej 50°C, bądź utrwała w inny znany sposób. Metodą tą uzyskuje się oczyszczony preparat o wysokiej aktywności enzymatycznej.

Proces według wynalazku prowadzi się w sposób następujący. Odcinek pofermentacyjny z hodowli *Aspergillus niger* poddaje się neutralizacji wodorotlenkiem wapniowym. Podczas neutralizacji temperatura medium nie może przekraczać 50°C. Po oddzieleniu osadu cytrynianu wapnia, filtrat wprowadza się w obieg odsalania elektrodializatora. Proces elektrodializy prowadzi się przy użyciu membran kationo- i aniono- wymiennych ułożonych na przemian. Podczas procesu do elektrod aparatu przyłożone jest napięcie o takiej wartości, aby gęstość prądu wynosiła 5–15 mA/cm² czynnej powierzchni membrany, korzystnie 10 mA/cm². Elektrodializę prowadzi się w temperaturze do 40°C, korzystnie 35°C–40°C, aż do zmniejszenia przewodności elektrycznej roztworu do około 30% wartości początkowej.

Odmineralizowany płyn zagęszcza się w znany sposób otrzymując koncentrat stanowiący preparat o wysokiej aktywności enzymatycznej i dużej czystości.

Natomiast oddzielony osad cytrynianu wapnia zadaje się kwasem siarkowym uzyskując roztwór kwasu cytrynowego i siarczan wapniowy czyli gips. Kwas cytrynowy wyodrębnia się z roztworu na przykład na drodze krystalizacji.

Przykład. 30 dm³ odcieku pofermentacyjnego z hodowli *Aspergillus niger* o aktywności pektynolitycznej 3350°PM i zawartości kwasu cytrynowego 15,7% zadaje się 20% roztworem wodorotlenku wapniowego do uzyskania pH 6,5–7,0. Zneutralizowany odciek przy ciągłym mieszaniu przetrzymuje się przez 60 minut w temperaturze 45°C, po czym filtruje się na błotniarkach. Z oddzielonego osadu cytrnianu wapnia wyodrębnia się tradycyjnym sposobem kwas cytrynowy poprzez działanie na osad kwasem siarkowym. Otrzymuje się kwas cytrynowy oraz siarczan wapniowy. Filtrat, po oddzieleniu osadu cytrnianu wapnia, ma aktywność pektynolityczną 3050°PM, zawiera 0,2% kwasu cytrynowego oraz szereg metali: K — 385 mg/kg, Na — 330 mg/kg, Ca — 630 mg/kg, Mg — 25 mg/kg, Cu — 0,18 mg/kg, Fe — 18 mg/kg, Zn — 2,6 mg/kg, Pb — 0,9 mg/kg. Filtrat ten mający przewodność 20 mS wprowadza się do elektrodializatora. Stos elektrodializatora zestawiony jest z membran aniono- i kationo- wymiennych ułożonych na przemian, przy czym powierzchnia czynna każdej z membran wynosi 200 cm². Podczas procesu elektrodializy do elektrod przyłożone jest napięcie o takiej wartości, by gęstość prądu wynosiła 10 mA/cm² czynnej powierzchni membran. Substancje wykazujące właściwości elektrolitów przechodzą przez membrany do roztworu zateżanego i w ten sposób filtrat zawierający enzymy zostaje pozbawiony soli mineralnych. Proces demineralizacji przerywa się, gdy przewodność elektryczna filtratu wynosi 6 mS. Odmineralizowany filtrat zawierający 210 mg/kg potasu, 180 mg/kg sodu, 360 mg/kg wapnia, 17 mg/kg magnezu, 0,16 mg/kg miedzi, 17 mg/kg żelaza, 1,8 mg/kg cynku, 0,5 mg/kg ołowiu, zateża się w wyparce próżniowej w temperaturze nie przekraczającej 50°C do zawartości 45% ekstraktu. Uzyskano w ten sposób 3,3 dm³ preparatu enzymatycznego o następującej charakterystyce:

Aktywność pektynolityczna	23700°PM
Aktywność proteolityczna	760 J. PG/cm ³
Aktywność amylolityczna	brak
Aktywność celulolityczna	46 J. EN-CMC/cm ³
Aktywność glukoamylazy	26 J. GA/cm ³
Aktywność poligalakturonazy	13330 J. PG/cm ³
Aktywność pektynoesterazy	brak
Zawartość suchej masy	44,7%
Zawartość białka ogólnego	10,9%
Zawartość popiołu	4,7%
Zawartość metali:	
K	420 mg/dm ³
Na	345 mg/dm ³
Ca	750 mg/dm ³
Mg	38 mg/dm ³
Fe	36 mg/dm ³
Zn	4,2 mg/dm ³
Cu	0,4 mg/dm ³
Pb	2,2 mg/dm ³

Zastrzeżenie patentowe

Sposób jednoczesnego otrzymywania preparatu enzymatycznego oraz kwasu cytrynowego z odcieku pofermentacyjnego z hodowli *Aspergillus niger* poprzez neutralizację odcieku w temperaturze poniżej 50°C oraz filtrację wytrąconego cytranianu wapniowego, z którego odzyskuje się kwas cytrynowy, **znamienny tym**, że zawierający enzymy filtrat demineralizuje się poprzez elektrodializę przeprowadzaną w temperaturze do 40°C przy gęstości prądu 5 mA/cm²–15 mA/cm², przy czym proces elektrodializy prowadzi się aż do zmniejszenia przewodności elektrycznej roztworu do około 30% wartości początkowej.