



## POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

# OPIS PATENTOWY

Nr 42346

Kl. 6. b, 16/02

Les Usines de Melle

Melle, Francja

### Sposób wytwarzania kwasów organicznych za pomocą fermentacji aerobowej

Patent trwa od dnia 28 marca 1956 r.

Pierwszeństwo: 11 lipca 1955 r. (Francja).

Kwasy organiczne można wytwarzać za pomocą fermentacji aerobowej glucydów, w obecności pleśniowców. W celu uproszczenia w dalszej części opisu będzie omówiony przede wszystkim sposób otrzymywania kwasu cytrynowego na drodze fermentacyjnej.

Przy wytwarzaniu kwasu cytrynowego w obecności pleśniowców muszą być przestrzegane pewne podstawowe warunki, a mianowicie należy zastosować odpowiedni szczep, przestrzegać ażeby pH było stosunkowo niskie, na ogół równe lub niższe od 3,0 i ażeby do pleśni była doprowadzona dostateczna ilość tlenu. Poza tym należy ograniczyć dawki niektórych składników odżywczych, zwłaszcza kationów fosforu i żelaza.

Pod słowem „składniki odżywcze” rozumie się tutaj każdą nie trującą substancję, która może brać udział w czynnościach biochemicznych organizmu. Do nich należą zwłaszcza azot, fosfor, magnez, potas przyswajalny, czynniki wzrostu, metale ciężkie takie jak cynk, żelazo, miedź, witaminy itd. oraz substancje, które biorą udział w budowie miceli lub katalizują dodatnio lub ujemnie reakcje biochemiczne. Wiadomo, że niektóre z tych składników zwane „składnikami

śladowymi” mogą działać w ilościach znacznie niższych od 1 mg na litr środowiska.

Podczas fermentacji odróżnia się dwa kolejne okresy. W czasie pierwszego okresu micela rozwija się kosztem części cukru, wytwarzając przy tym stosunkowo mało kwasów. W czasie drugiego okresu rozwój ten przebiega wolniej lub szybciej, przy czym równocześnie z większej części pozostałego cukru powstają kwasy. Jeżeli pH utrzymane jest w pobliżu wartości obojętnej tworzy się wówczas przede wszystkim kwas glikonowy, a przy pH między 6,0 i 3,0 przede wszystkim kwas szczawiowy.

Ciężar rozwiniętej miceli zależy głównie od zawartości czynników odżywczych w środowisku, od jej budowy i od pH. Dzięki temu według Shu i Johnson'a (Ind. Eng. Chem. 1948 str. 1202) można ograniczyć kiełkowanie bądź stosując odpowiednią dawkę kationów żelaza, bądź odpowiednią ilość fosforu przyswajalnego. Jeżeli ciężar jest zbyt niski, prędkość fermentacji jest niedostateczna; gdy zaś jest zbyt wysoki, wówczas zużywa się stosunkowo dużo cukru na budowę miceli, w związku z czym cukier ten nie może być już przemieniony na kwas cytrynowy.

Poza tym przy zbyt wysokim ciężarze miceli w czasie fermentacji głębinowej środowisko posiada wysoką lepkość, a dostęp tlenu do organizmu jest utrudniony, w związku z czym trzeba stosować mieszadła; co jest bardzo uciążliwe ze względu na koszt siły napędowej.

Wskazane jest ażeby ciężar miceli przeliczony na suchy produkt, wynosił na ogół 5 — 25 g na litr środowiska.

Ilość fosforu przyswajalnego przeliczona na fosforan jednopotasowy wynosi na ogół 0,02—2,5 g na litr środowiska. Zawartość kationów żelaza jest na ogół różna i wynosi od 4 lub nawet 2 mg na litr środowiska. Według Shu i Johnson'a dla podobnego środowiska zasobnego w składniki odżywcze konstruktywne, ciężar miceli rozwiniętej zmienia się z 18 g na litr przy pH początkowym 4,9 do 7 g na litr dla pH początkowego 1,7. Proponowano (według patentu Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 235771) prowadzenie fermentacji w dwóch odrębnych środowiskach, a mianowicie w okresie rozmnażania w środowisku zawierającym fosfor przyswajalny, a następnie po oddzieleniu i przemyciu miceli, w środowisku zwanym „fermentacyjnym”, pozbawionym fosforu przyswajalnego. Zaznaczono równocześnie, że można stosować to samo środowisko w obydwu okresach pod warunkiem, że dawka fosforu przyswajalnego będzie dostatecznie niska i zostanie przyswojona w całości w okresie rozmnażania.

Liczne patenty zalecają ten drugi sposób postępowania. W przypadkach tych stosuje się fosforan jednopotasowy w ilości na ogół niższej od 0,150 g na litr środowiska.

Na ogół środowiska są uprzednio zakwaszane, lecz środowisko rozmnażania, którego pH początkowe jest niskie staje się odpowiednim tylko wtedy, gdy jest zasobne w składniki odżywcze.

Na ogół trzeba poświęcić dość dużo cukru na utworzenie się miceli, a dopiero w późniejszym okresie następuje przemiana cukru na kwas cytrynowy.

Sposoby oparte na prowadzeniu fermentacji w dwóch fazach kolejnych, z oddzielaniem miceli, można stosować w środowisku fermentacyjnym stosunkowo ubogim w cukier, ponieważ micela powstaje tylko w pierwszej fazie. Wydajność jest wówczas mała. Nadto przeprowadzanie tych sposobów wymaga dużej ostrożności, gdyż micelę należy oddzielać i przemycać aseptycznie. Gdy fermentację prowadzi się tylko w jednej fazie, trzeba stosować środowisko stosunkowo zasobne w cukier, ażeby wydajność była zadowalająca.

Zrozumiałe jest, że stosunkowo łatwo można spełnić warunki odpowiednie dla fermentacji w ośrodkach zawierających czysty cukier handlowy, lecz następują komplikacje gdy stosuje się ośrodki melasowe. Melasa zawiera główną część składników odżywczych w ilościach znacznie wyższych od wyżej podanych. Ponadto, siła buforowa roztworów melasy zawsze jest stosunkowo wysoka i zgodnie z tym co wyżej powiedziano odnośnie ilości cukru w roztworach i o wpływie pH, otrzymanie pH odpowiedniego dla wytworzenia kwasu cytrynowego następuje dopiero po dodaniu poważnej ilości cukru, który zostaje zużyty na potrzeby miceli, bądź zamieniony na kwasy inne niż kwas cytrynowy.

Zaleca się częstokroć uprzednie oczyszczanie melasy na wymiennikach jonowych. Postępowanie takie jest jednak uciążliwe i kosztowne.

Zaleca się również wstępne traktowanie wapnem roztworów melasy w celu wytrącenia mineralnego kwasu fosforowego.

Zawartość metali ciężkich, zwłaszcza kationów żelaza doprowadza się do odpowiedniego poziomu, przez wstępne traktowanie roztworów melasy, rozpuszczalnym żelazocyjankiem lub innym odczynnikiem strącającym albo tworzącym związki kompleksowe. Bez względu na to czy osad został wytrącony czy też nie, melasę podaje się przed fermentacją filtrowaniu; może się wówczas okazać koniecznym dodanie ponownie pewnych składników konstruktywnych takich jak cynk kation. Dawki niezbędnych odczynników określa się na drodze doświadczalnej.

Wszystkie te wstępne przygotowania polepszają zdolność melasy do fermentacji cytrynowej lecz nie zawsze usuwają wszystkie trudności zachodzące podczas fermentacji niektórych melas.

Trudność otrzymania wyników zadawalających przy stosowaniu niektórych melas, jest ściśle określona w pracy Martins'a i Waters'a ogłoszonej w Ind. Eng. Chem. 1952 str. 2229. Dla melas pochodzących z tej samej miejscowości lecz z różnych lat badacze ci otrzymywali, przy jednakowym wstępnym sposobie przygotowywania (żelazocyjanek w ilości uprzednio ustalonej) i przy tym samym sposobie fermentacji, wydajności kwasu cytrynowego wynoszące 9,9 — 70,7% w odniesieniu do użytego cukru.

Stwierdzono, że trudności tych można w znacznym stopniu uniknąć jeżeli początkowo rozmnażanie miceli, tworzącej grzybnie lub zarodniki kadziowe przeprowadza się w środowisku stosunkowo ubogim w melasę (pierwszy okres), a następnie nie usuwając miceli, odżywia się

stopniowo grzybnąć w odpowiednim momencie, a w każdym przypadku kiedy jej pH jest bliskie wartości 3,0 lub niższe od 3,0, roztworami melasy stosunkowo silnymi w taki sposób, aby utrzymać pH bliskie 3,0 lub niższe od 3,0 (drugi okres). Odżywianie to może być prowadzone w sposób ciągły lub okresowy.

Łatwo jest więc regulować w pierwszym okresie dawkę różnych składników odżywczych wpływając poza tym na obfitość grzybni w melasie. Ponieważ moc buforowa roztworu ubożego w melasę jest stosunkowo słaba, to pH środowiska obniża się gwałtownie wskutek tworzenia się różnych kwasów. Gdy następnie grzybnę zasila się roztworami zasobnymi w melasę, wówczas z dodanego cukru otrzymuje się z wysoką wydajnością kwas cytrynowy.

W istocie, niskie pH jest korzystne dla tej przemiany. Poza tym stwierdzono, że gdy pH jest bliskie wartości 3,0 lub niższe od 3,0 wówczas wpływ nadmiaru składników odżywczych na wydajność przemiany cukru na kwas cytrynowy, jest silnie osłabiony. Rozwój miceli jest zahamowany i nie trzeba stosować mieszania, które jest konieczne, jeżeli w środowisku znajduje się nadmiar miceli.

Nie można uniknąć pewnego rozwoju miceli w czasie drugiego okresu, a to zmniejsza średnie stężenie melasy, które można by osiągnąć przy końcu fermentacji. Ten spadek stężenia zależy głównie od obfitości składników odżywczych dla grzybni znajdujących się w zasilającej melasie o określonym składzie. Wydajność kwasu cytrynowego uzyskiwana sposobem według wynalazku jest zawsze o wiele wyższa od wydajności otrzymywanej przy fermentacji prowadzonej w środowisku nie zasilanym.

Dwa doświadczenia opisane poniżej jasno to wykazują.

Roztwór melasy z buraków zawierający 390 g melasy oraz 2,8 g żelazocyjanku potasowego na 1 litr przygotowuje się w temperaturze zbliżonej do temperatury wrzenia tego roztworu, a następnie filtruje. Otrzymany roztwór macierzysty odpowiednio rozcieńczony stosuje się w niżej przytoczonych przykładach.

Przykład I: Do 9,6 l roztworu, zawierającego 180 g melasy/litr, traktowanego żelazocyjankiem potasowym dodaje się na 1 litr roztworu 0,030 g fosforanu jednopotasowego i 0,3 g siedmiowodnego siarczanu magnezowego. Całość sterylizuje się i umieszcza w kadzi zaopatrzonej w mieszadło mechaniczne i w belkotkę powietrzną. Wszystkie części urządzenia stykające się z cieczą winny być odporne na działanie kwasów powstających w czasie fermentacji.

Następnie wysiewa się spory *Aspergillus Wentii*, pochodzące z kultury galaretowatej szczepu dobrze wytwarzającego kwas cytrynowy i napowietrza wyjałowionym i nasyconym wilgocią powietrzem w temperaturze 32°C przy ciągłym mieszaniu.

Powietrze przepuszcza się w ilości 1000 l/h. Wartość pH środowiska wynosząca początkowo 6,05 spada czwartego dnia do 3,05. W tym momencie wolna kwasowość, wyrażona w jednowodnym kwasie cytrynowym oznaczona przez miareczkowanie wynosi 31,5 g na 1 l cieczy, lecz rzeczywista ilość kwasu cytrynowego jest minimalna. W szóstym dniu fermentacji cukier jest już nieobecny, a kwasowość ustala się na 46,2 g/l. Zawartość kwasu cytrynowego oznaczonego przez miareczkowanie wynosi 13,1 g/l, co stanowi 28% kwasowości ogólnej. Tworzy się 7,3 kg kwasu cytrynowego ze 100 kg melasy, a więc uzyskano wydajność wynoszącą 14,6% w stosunku do zużytego cukru.

Przykład II. Do kadzi opisanej w przykładzie I wprowadza się 6 litrów wyjałowionego roztworu, zawierającego w 1 litrze 50 g melasy traktowanej żelazocyjankiem potasowym, 0,050 g fosforanu jednopotasowego i 0,5 g siedmiowodnego siarczanu magnezowego. Następnie wysiewa się tę samą ilość spor i napowietrza się tą samą ilością powietrza wyjałowionego i nawilżonego, jak w przykładzie pierwszym, utrzymując temperaturę 32°C.

Po 36 godzinach kiedy wolna kwasowość wynosi 9,1 g/l jednowodnego kwasu cytrynowego, a pH równa się 2,9, zawartość kadzi zasila się wyjałowionym roztworem, zawierającym 390 g/l melasy traktowanej żelazocyjankiem potasowym bez soli odżywczych, przy czym prędkość zasilania reguluje się tak, aby pH roztworu wynosiło 2,5 — 2,9. W omawianym przykładzie dodaje się 3,6 litra roztworu, w ciągu czterech dni. Dziewiątego dnia cukier jest nieobecny, a kwasowość ustala się na niezmiennym poziomie. Wolna kwasowość wyrażona w jednowodnym kwasie cytrynowym (oznaczona przez miareczkowanie) wynosi 78 g/l a rzeczywista zawartość kwasu cytrynowego 69,2 g/l, co stanowi 88,5% kwasowości ogólnej. Ze 100 kg zużytego cukru otrzymuje się więc 77,7 kg kwasu cytrynowego.

Przykład II ilustruje najprostsze wykonanie sposobu według wynalazku. Jasne jest, że w granicach wynalazku można zmieniać ilość dodawanych soli odżywczych zarówno do grzybni jak i do roztworów zasilających oraz że melasy mogą być poddawane różnej obróbce polepszającej jej właściwości (za pomocą wymienników jono-

wych wapna, żelazocyjanku lub każdego innego odczynnika powodującego strącanie lub tworzenie kompleksów takich jak fitany) oraz że można stosować do przygotowania grzybni i roztworów odżywczych dwie lub więcej melas różnego pochodzenia, różnie obrabianych.

Można również stosować szczep pleśni inny aniżeli *Aspergillus Niger*, na przykład szczep selekcyjonowany *Aspergillus Wentii*. Również melasy z trzciny cukrowej zwane „black strap” lub „high test” mogą być stosowane zamiast melas z buraków.

Jedną z istotnych charakterystycznych cech sposobu według wynalazku jest przeprowadzanie okresu rozmnażania lub rozwijania w środowisku, którego wskaźnik buforowy jest słaby. Wskaźnik ten określa się ilością gramów czystego kwasu solnego (HCl) niezbędnego do obniżenia pH jednego litra środowiska z 6,0 do 3,0. W drugim przykładzie opisanym powyżej wskaźnik buforowy wynosi 1,53. Może się on zmieniać w granicach 0,07 — 6,0 lecz najlepiej powinien być niższy od 3,0.

Można więc, nie wychodząc poza granice wynalazku, przygotować grzybnię z mieszaniny melasy i cukru oczyszczonego handlowego, co zmniejszy wskaźnik buforowy albo nawet z samego cukru.

W czasie pierwszego okresu można również dodawać do środowiska kwasy nie hamując przy tym czynności biochemicznych. Szczególnie korzystne jest dodawanie kwasu cytrynowego, przede wszystkim w postaci ługów macierzystych nie dających się krystalizować, pochodzących z produkcji kwasu cytrynowego.

Kiedy pod koniec drugiego okresu melasa osiągnie pożądaną koncentrację i gdy fermentacja jest całkowicie lub prawie zakończona, wówczas można część brzeczki sfermentowanej odprowadzić i zastąpić ją w czasie trzeciego okresu fermentacji, równą objętością roztworu melasy o takiej samej średniej koncentracji, utrzymując przy tym stałe pH w pobliżu 3,0 lub poniżej tej wartości. Czynności te mogą być dokonywane sposobem ciągłym lub okresowym przez pewien okres czasu, który zmienia się zależnie od rodzaju melasy. Czas ten zależy przede wszystkim od ilości składników odżywczych w melasie i od siły mieszania. W rzeczywistości ilość składników odżywczych wyznacza ciężar miceli, który osiąga gdy stan równowagi jest ustalony. Do niektórych melas, w których brak jest substancji odżywczych, należy te substancje dodawać.

Również może okazać się korzystne zasilanie brzeczki w czasie trzeciego okresu za pomocą

mieszaniny melasy z handlowym cukrem oczyszczonym.

W czasie tego trzeciego okresu fermentacji wprowadzony cukier przemienia się z wysoką wydajnością na kwas cytrynowy, co polepsza w sposób bardzo widoczny średnią wydajność z trzech okresów i pozwala na lepsze zużytkowanie materiału fermentacyjnego.

Sposób według wynalazku stosuje się również do wytwarzania innych kwasów organicznych, które się tworzą przede wszystkim w środowisku, którego pH jest stosunkowo niskie, zwłaszcza kwasu itakonowego.

#### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania kwasów organicznych, zwłaszcza kwasu cytrynowego przez fermentację aerobową z melasy, znamieny tym, że odpowiedni mikroorganizm rozmnaża się w środowisku zawierającym tylko taką ilość cukru ażeby otrzymać wskaźnik buforowy niższy od 6,0, przy czym w środowisku tym obecne są sole odżywcze, a następnie w drugim okresie, po obniżeniu pH środowiska do około 3,0 lub poniżej 3,0 dodaje się do grzybni bez oddzielania utworzonej miceli, rozcieńczonej melasy, ewentualnie z dodatkiem cukrów i soli odżywczych w taki sposób, ażeby pH środowiska było zbliżone do 3,0 lub poniżej 3,0.
2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że rozmnażanie przeprowadza się w środowisku wyjałowionym, zawierającym cukier z melasy, i/lub z cukru oczyszczonego handlowego, przy czym wskaźnik buforowy tego środowiska wynosi 0,07 — 3,0.
3. Sposób według zastrz. 1, 2, znamieny tym, że do środowiska, w którym przeprowadza się rozmnażanie, wprowadza się kwas, który nie hamuje czynności biochemicznych, zwłaszcza kwas cytrynowy, przede wszystkim w postaci ługów macierzystych nie dających się krystalizować, pochodzących z produkcji kwasu cytrynowego.
4. Sposób według zastrz. 1 — 3, znamieny tym, że pod koniec lub prawie pod koniec fermentacji, odprowadza się część cieczy fermentacyjnej i zastępuje ją równą objętością melasy, rozcieńczonej z ewentualnym dodatkiem cukru, regulując jej doprowadzanie tak, ażeby pH środowiska było zbliżone do 3,0 lub leżało poniżej 3,0.

Les Usines de Melle

Zastępca: mgr Józef Kamiński,  
rzecznik patentowy

