

5 sierpnia 1929 r.



RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

OPIIS PATENTOWY

c12d1/06

Nr 10083.

Kl. 12 o 11.

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

Sposób sporządzania kwasu cytrynowego drogą fermentacji.

Zgłoszono 2 marca 1928 r.

Udzielono: 28 lutego 1929 r.

Jak wiadomo, pewne rodzaje gatunku citromyces, mucor, aspergillus i pencillium w sprzyjających warunkach produkują wydatnie kwas cytrynowy, jednakże mała aktywność tych grzybów i długość okresu fermentacji stwarza duże niebezpieczeństwo infekcji. Wychodząc z tego założenia nowoczesna technika wyraża naogół pogląd, że do wytwarzania kwasu cytrynowego drogą fermentacji na skalę przemysłową nadają się szczególnie pożywki stałe (galaretowate), które mogą infekcję lokalizować, a jednocześnie przyspieszają tworzenie się kwasu. Oddawna już wiadomo, że rodzaje aspergillus i mucor na stałych pożywkach wysiewają się na możliwie dużej powierzchni, zaś mycele na takich pożywkach rosną nietylko bardzo

prędko, ale równomiernie i w dużej masie. Agar-agar i podobne substraty tak podrożają fabrykację kwasu cytrynowego na drodze fermentacji, że przestaje się opłacać. Próbowano również uniknąć niebezpieczeństwa infekcji przez użycie kombinacji sztucznych soli odżywczych z dodatkiem węglowodanów jako roztworów odżywczych. Na takich pożywkach infekcja przez drożdże i bakterie jest o wiele mniejsza, niż przy użyciu jak zwykle w przemyśle fermentacyjnym substancji odżywczych naturalnych, zawierających węglowodory bezpośrednio pochodzące z roślin; przemysłowe jednak zastosowanie tego procesu jest za drogie.

Przekonano się, że nie jest koniecznym używanie do wytwarzania kwasu cytryno-

wego wyłącznie pewnych morfologicznie ściśle określonych rodzajów pleśniaków z gatunków *mucor*, *citromyces*, *aspergillus* i *penicillium*, gdyż dają się użyć do fermentacji cytrynowej kultury tych gatunków specjalnie szczepione, z pomocą których można nawet za pożywkę stosować wprost melas. Tak np. zaobserwowano wielokrotnie, że *aspergillus niger* z reguły wytwarza kwas szczawiowy, co daje się stwierdzić. Stwierdzono natomiast, że rozmaite kultury tych gatunków wytwarzają również kwas cytrynowy, a przy odpowiednich temperaturach i pożywkach tworzą tylko kwas cytrynowy, choć nie można było scharakteryzować morfologicznie tych kultur. Chodzi jednak tylko o to, aby od całości oddzielić najczynniejsze kultury za pomocą znanych metod analizy technicznej, np. zapomocą hodowli jednokomórkowej, przy doświadczalnym porównywaniu zdolności tworzenia kwasu cytrynowego przy stosunkowo niższej temperaturze. W podobny sposób dochodzi się przez wybór odpowiednich kultur *citromyces*, *mucor* i *penicillium* do kultur, które przy zachowaniu odpowiednich warunków również i na płynnych pożywkach, szczególnie na melasie mogą dawać kwas cytrynowy z dobrą wydajnością. Gatunki grzybów, używane dotychczas do wytwarzania kwasu cytrynowego na roztworach melasu o stężeniach, potrzebnych do uzyskania należytej wydajności, rosną nieregularnie i dają chorobliwą pleśń.

W ten sposób można z melasu otrzymywać kwas cytrynowy drogą fermentacji z dobrą wydajnością, przyczem nie trzeba przykładać wielkiej wagi na zupełnie aseptyczny sposób pracy, lecz tylko należy zważyć, aby fermentacja odbywała się przy stosunkowo niskiej temperaturze. Ta sprzyjająca w tem znaczeniu temperatura wynosi np. dla *aspergillus'a* około 20°—30°C. Jeśli podczas fermentacji zapomocą gatunków *aspergillus* temperatura nie przekra-

cza znacznie 20°C, to otrzymuje się nietylko wysokie wydajności, ale również najskuteczniej przeciwstawia się infekcji. Pleśń rosnąca w tak niskiej temperaturze zachowuje również i w następnych pokoleniach zdolność obfitego tworzenia kwasu cytrynowego. Jeśli grzyb rozwija się w wyższej temperaturze, to rośnie co prawda bardzo dobrze i daje dużo kwasu cytrynowego, ale kwas ten przy podwyższaniu temperatury w coraz większych ilościach utlenia się na kwas szczawiowy. Prócz tego zarodniki pochodzące z pleśni, która się rozmnażała w ciągu jednej lub paru generacji w wyższej temperaturze, przy wysiewaniu na odpowiednich pożywkach tracą zdolność tworzenia kwasu cytrynowego. Również ze wzrostem temperatury zwiększa się znacznie niebezpieczeństwo infekcji. Jeśli się natomiast pracuje ściśle aseptycznie, to można stosować również i wyższe temperatury, przez co fermentacja wymaga o wiele krótszego czasu. Ponieważ melas stanowi wszystek materiał potrzebny do fermentacji cytrynowej i jest stosunkowo tani, ten rodzaj otrzymywania kwasu cytrynowego może być zastosowany na wielką skalę w przemyśle. Oczywiście dzięki pewnym zabiegom można w melasie zmniejszyć zawartość soli przez pewne dodatki (np. fosforany), lub też przez rafinację melasu częściowo uwolnić ją od pewnych soli zwłaszcza potasowych.

Pozostałe warunki pracy są znane. Zaleca się rozlewać ciekłą pożywkę w płaskich otwartych naczyniach, tak, by zapewnić rosnącym grzybom wielką powierzchnię. Wysokość warstwy ograniczona jest z tego powodu, że ciecz musi być dobrze przekwaszona w celu ochrony przed infekcją.

Kwas cytrynowy wydobywa się z cieczy pożywki w znany sposób. Powstający podczas fermentacji kwas cytrynowy można w roztworze pożywki neutralizować zapomocą alkaliów lub ziem alkalicznych, choć

to nie jest niezbędne. Obok innych ziem alkalicznych nadaje się tu wodorotlenek barowy. Zubożnianie roztworu pożywki zapomocą tlenku, wodorotlenku lub węgla barowego daje tę korzyść, że cytrynian baru jest w niższej temperaturze mniej rozpuszczalny niż cytrynian potasu i z tego powodu już na zimno wypada. Bar można później zupełnie usunąć jako siarczan.

Przy dotychczas znanych próbach i pracach nad otrzymaniem kwasu cytrynowego z cukru przez fermentację zapomocą podanych powyżej pleśniaków przyjęto, że roztwór musi zawierać stosunkowo mało azotu. Przypuszczenie, że dotychczasowy podział pleśniaków na gatunki dające kwas szczawiony i cytrynowy jest nietrafny, było słuszne; ale niesłusznie wyciągnięto stąd wniosek, że zasadniczą różnicę powoduje zawartość azotu w roztworze pożywki.

Słuszność powyższego wyniku z następujących prób, z których pierwsza stanowi jednocześnie próbę wykonania sposobu według wynalazku.

1. 300 kg melasu o zawartości 50% cukru, 1,35% N , 5,72% K_2O i 0,026% P_2O_5 rozcieńczono wodą do 1000 litrów i dodano jeszcze 200 g kwaśnego fosforanu potasu KH_2PO_4 , a następnie zubożniono kwasem siarkowym aż do obojętnej reakcji lakmu. Otrzymany roztwór pożywki zawiera w litrze: 150 g cukru, 4,05 g N , 17,76 g K_2O , 0,078 g P_2O_5 i 0,30 g MgO ; rozlewa się do płaskich naczyń. Następnie zawartość naczyń zaszczebia się zarodnikami *aspergillus niger*, chodowanego w sposób powyżej podany, i pozostawia fermentacji w temperaturze 25°C. Po dwunastu dniach przerywa się fermentację, ciecz odsącza się, powłokę pleśni wyciska i przemywa wodą, a otrzymany roztwór strąca się we wrzącym stanie mlekiem wapiennym. Z wyjściowych 150 kg cukru 70 kg uzyskuje się jako surowy cytrynian wapnia o zawartości 68,4% kwasu cytrynowego obok 1,02% kwasu szczawowego; w ługach znajdują się je-

szcze 53 kg sfermentowanego cukru. Użytkano więc 48 kg kwasu cytrynowego, co wynosi 32% na całą ilość cukru, a 48% na cukier zużyty.

Przy takiej próbie po 14 dniach cały cukier przefermentował, a wydajność kwasu cytrynowego wyniosła 53% wyjściowego.

2. W takich samych warunkach zapomocą takich samych zarodników pleśniaków sfermentowano sztuczny roztwór cukru o małej zawartości azotu. Roztwór ten według danych w literaturze nadaje się najlepiej do fermentacji cytrynowej (azot w postaci azotanu amonu NH_4NO_3). Roztwór zawiera w litrze: 150 g cukru, 0,7 g N , 0,345 g K_2O , 0,52 g P_2O_5 , 0,03 g MgO . Fermentowano 1000 l ze 150 kg cukru przez 12 dni. Uzyskano 8 kg cytrynianu wapnia o 69% kwasu cytrynowego obok 1,5% kwasu szczawowego i 92 kg cukru odpadkowego. Wydajność 5,5 kg kwasu cytrynowego na 150 kg całkowitej ilości cukru i 58 kg użytego cukru, to jest 3,7% kwasu cytrynowego na ilość całego cukru, a 9,5% na cukier zużyty. Sztuczny roztwór cukru fermentuje w tych samych warunkach (technicznie użyteczna wysokość cieczy fermentacyjnej) ze znacznie gorszym technicznym efektem, niż melas.

3. Dla porównania w zupełnie tych samych warunkach fermentowano sztuczny roztwór cukru z temi samemi ilościami substancyj odżywczych, jakie zawierał roztwór melasu w przypadku 1. Substancje odżywcze dodano pod postacią nieorganicznych soli jak w przypadku 2 (azot jako NH_4NO_3 , fosfor jako KH_2PO_4 , potas prócz poprzedniego jako K_2SO_4). Zawartość w litrze: 150 g cukru, 4,03 g N , 17,2 g K_2O , 0,08 g P_2O_5 i 0,08 g $MgSO_4$. Sfermentowano 1000 litrów, to jest 150 kg cukru i otrzymano po 12 dniach 12 kg cytrynianu wapnia o zawartości 62% kwasu cytrynowego i 3,2% kwasu szczawowego oraz 45 kg odpadkowego cukru. Wydajność wyniosła zatem 7,4 kg kwasu cytrynowego ze 150 kg ogólnego cukru

i 105 kg zużytego cukru, to jest według ilości całego cukru 4,9%, a według zużytego 7%.

W tym przypadku wydajność obliczona na zużyty cukier jest jeszcze mniejsza, niż w przypadku 2.

Zastrzeżenie patentowe.

Sposób sporządzania kwasu cytrynowego drogą fermentacji zapomocą pleśniaków przy użyciu ciekłych odżywek, znamienny tem, że wybiera się czynne grupy kultur ga-

tunków citromyces, mucor, aspergillus i penicillium przez doświadczalne porównanie ich zdolności tworzenia kwasu cytrynowego przy stosunkowo niskiej temperaturze według znanych metod analizy mykologicznej i te grupy używa do wytwarzania kwasu cytrynowego na pożywcę melasowej.

Montan- und Industrialwerke
vormals Joh. Dav. Starck.

Zastępca: Inż. S. Pawlikowski,
rzecznik patentowy.