



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 233 882** <sup>(13)</sup> **C2**

(51) МПК<sup>7</sup> **C 12 P 7/48, B 01 D 61/14**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2001129862/13, 05.11.2001  
(24) Дата начала действия патента: 05.11.2001  
(43) Дата публикации заявки: 10.09.2003  
(46) Дата публикации: 10.08.2004  
(56) Ссылки: CS 275986, 18.03.1992. ГРАЧЕВА И.М., КРИВОВА А.Ю. Технология ферментных препаратов. - М.: Элевар, 2000, с.109-112. RU 2159286 C1, 20.11.2000. EP 1096020 A1, 02.05.2001. WO 9710350 A1, 20.03.1997. RU 2079555 C1, 20.05.1997.  
(98) Адрес для переписки:  
191104, Санкт-Петербург, Литейный пр., 55,  
ГУ Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых ароматизаторов, кислот и красителей РАСХН

(72) Изобретатель: Шарова Н.Ю. (RU),  
Мушникова Л.Н. (RU), Кулёв Д.Х.  
(RU), Зенькевич В.Б. (RU), Чиванов В.Н.  
(RU), Старевский А.В. (RU)

(73) Патентообладатель:  
Государственное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых ароматизаторов, кислот и красителей РАСХН (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

(57) Изобретение относится к микробиологической промышленности и касается способа очистки растворов лимонной кислоты и сопутствующих ее биосинтезу кислотостабильных амилолитических ферментов, обладающих декстриногенной и сахарогенной активностями. Способ заключается в том, что при температуре  $\leq 32^{\circ}\text{C}$  от ферментированного раствора отделяют мицелий гриба-кислотообразователя

*Aspergillus niger*, очищают полученную культуральную жидкость посредством последовательных процессов фильтрации или сорбции примесей, а затем разделяют ультрафильтрацией через мембрану, удерживающую молекулярную массу в пределах 1000-50000, на растворы целевых продуктов. Способ позволяет одновременно получить два целевых продукта: очищенный раствор лимонной кислоты и комплекс кислотостабильных амилолитических ферментов. 1 табл.

RU 2 233 882 C2

RU 2 233 882 C2



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 233 882** <sup>(13)</sup> **C2**  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **C 12 P 7/48, B 01 D 61/14**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2001129862/13, 05.11.2001

(24) Effective date for property rights: 05.11.2001

(43) Application published: 10.09.2003

(46) Date of publication: 10.08.2004

(98) Mail address:  
191104, Sankt-Peterburg, Litejnyj pr., 55,  
GU Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij  
institut pishchevykh aromatizatorov, kislot i  
krasitelej RASKhN

(72) Inventor: Sharova N.Ju. (RU),  
Mushnikova L.N. (RU), Kulev D.Kh.  
(RU), Zen'kevich V.B. (RU), Chivanov V.N.  
(RU), Starevskij A.V. (RU)

(73) Proprietor:  
Gosudarstvennoe uchrezhdenie Vserossijskij  
nauchno-issledovatel'skij institut  
pishchevykh aromatizatorov, kislot i  
krasitelej RASKhN (RU)

(54) **METHOD FOR PREPARING CITRIC ACID**

(57) Abstract:

FIELD: microbiological industry,  
technical biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to a method  
for treatment of citric acid solutions and  
acid-stable amylolytic enzymes with  
dextrin-forming and sugar-forming activities  
that provide to biosynthesis of citric acid.  
Method involves separation of mycelium of  
acid-forming fungus *Aspergillus niger* from  
the fermented solution, purification of  
obtained cultural fluid by the successive

processes of filtration or sorption of  
impurities followed by their separation by  
ultrafiltration across membrane that retains  
substances with molecular mass in the range  
1000-50000 Da for solution of end products.  
Method provides simultaneous preparing two  
end products: the purified citric acid  
solution and complex of acid-stable  
amylolytic enzymes.

EFFECT: improved preparing method.  
1 tbl, 7 ex

RU 2 2 3 3 8 8 2 C 2

RU 2 2 3 3 8 8 2 C 2

Изобретение относится к микробиологической промышленности и касается способа получения лимонной кислоты ферментацией среды на основе гидролизата крахмала грибом *Aspergillus niger* и выделением ее из ферментированного раствора.

Известный традиционный способ получения кристаллической лимонной кислоты включает много стадий: отделение мицелия фильтрованием культуральной жидкости, термообработка при температуре 80-100°C ферментированного раствора, осаждение целевого продукта в виде цитрата кальция, разложение соли серной кислотой, фильтрацию гипсовой суспензии через активный уголь, кристаллизацию [1].

Использование экологически вредных реагентов значительно усложняет процесс и требует дополнительную очистку растворов лимонной кислоты, регенерацию сорбента, применение дополнительных реагентов, увеличение энерго- и материальных затрат. Кроме того, в способе не предусмотрена возможность выделения кислотостабильных ферментов.

Известен способ получения лимонной кислоты в жидком виде с использованием бентонита и цеолита для очистки раствора кислоты от остатков мицелия и с последующим концентрированием его [2]. Концентрат кислоты характеризуется определенной цветностью и присутствием до 0,5% белковых веществ. Последующее отделение примесей в способе отсутствует.

Известен способ выделения препарата гомогенной  $\alpha$ -амилазы из культуральной жидкости после ферментации питательной среды термофильным штаммом *B. stearothermophilus*. Фильтрат культуральной жидкости, содержащий 5,0 ед. АС/мг белка, концентрируют методом ультрафильтрации до выделения раствора с активностью 10,6 ед. АС/мг белка, затем проводят осаждение комплекса ферментов этиловым спиртом, высушивание осадка, последующую глубокую очистку препарата от сопутствующих ферментов - примесей. Выход чистого препарата  $\alpha$ -амилазы составляет 22,1% [3].

В способе выделения фермента метод ультрафильтрации позволяет провести концентрирование фильтрата культуральной жидкости без фазового превращения при комнатной температуре и при одновременном освобождении от балластных веществ (пигментов, азотистых и других низкомолекулярных соединений).

Однако известный способ не предусматривает получение и выделение из культуральной жидкости двух целевых продуктов: низкомолекулярного соединения и комплекса ферментов.

Известен способ получения лимонной кислоты, включающий ферментацию углеводсодержащего сырья, отделение мицелия гриба *Aspergillus niger*, очистку ферментированного раствора суспензий активированного бентонита с последующим отделением раствора и обработкой активированным углеволокнистым материалом марки АУТ-М, Бусофит-Т, Бусофит-ТМ либо Карбопон-актив, имеющим объем сорбционных пор в пределе 0,30-0,80 см<sup>3</sup>/г, взятом в количестве 2,0-12,0 г на 1 дм<sup>3</sup> раствора.

В результате получают очищенный раствор лимонной кислоты, не содержащий белковые вещества, в том числе и ферменты, с титруемой кислотностью 14,6-14,7%, что на 3,3-4,0% ниже по сравнению с ферментированным раствором (15,2%) [4].

Возможность выделения комплекса ферментов как целевого продукта в способе отсутствует, так как отделение мицелия проводят при температуре выше 70 °С, происходит инактивация ферментов и коагуляция белковых веществ, которые становятся нежелательной примесью.

Наиболее близким предлагаемому изобретению является способ получения кислой фосфатазы из культуральной жидкости, содержащей лимонную кислоту и имеющей активность фосфатазы, путем ультрафильтрации через мембрану, удерживающую молекулярную массу фосфатазы от 5000 до 50000, при температуре 5-50°C, давлении 0,1-0,6 МПа, скорости потока через мембрану 4-60 кг/м<sup>2</sup>·ч. После разделения ультрафильтрацией получают раствор, имеющий активность фосфатазы 5-50  $\mu\text{Kat}\cdot\text{l}^{-1}$  и концентрат, имеющий активность фосфатазы 1500-50000  $\mu\text{Kat}\cdot\text{l}^{-1}$  [5].

Таким образом, известным способом [5] получают из культуральной жидкости раствор лимонной кислоты, недостаточно очищенный от активных ферментов, и концентрат кислой фосфатазы. Раствор лимонной кислоты, имеющий активность 5-50  $\mu\text{Kat}\cdot\text{l}^{-1}$  фосфатазы, требует дальнейшего выделения примесей для получения чистого раствора кислоты.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является выделение из ферментируемого раствора после ферментации среды на основе гидролизата крахмала грибом *Aspergillus niger* достаточно чистого раствора лимонной кислоты и раствора кислотостабильных амилитических ферментов.

Технический результат предлагаемого изобретения достигается способом получения лимонной кислоты из культуральной жидкости, включающим отделение мицелия гриба-кислотообразователя от ферментированного раствора, разделение ферментированного раствора ультрафильтрацией через мембрану, удерживающую молекулярную массу фермента, на раствор лимонной кислоты и раствор фермента, в котором согласно изобретению используют имеющую активность  $\alpha$ -амилазы и глюкоамилазы культуральную жидкость, отделяют мицелий гриба-кислотообразователя *Aspergillus niger* при температуре  $\leq 32^\circ\text{C}$ , до разделения очищают ферментируемый раствор с температурой  $\leq 32^\circ\text{C}$  с помощью фильтрующего или сорбирующего средства, причем используют мембрану с диаметром пор 0,65 мкм или суспензию бентонита или углеволокнистый материал типа Карбопон-актив, затем разделяют очищенный ферментированный раствор через мембрану, удерживающую молекулярную массу 1000-50000, на раствор целевого продукта и раствор кислотостабильных амилитических ферментов.

Сведения, подтверждающие возможность достижения технического результата предлагаемого изобретения, представлены в примерах.

В примерах используют ферментированный раствор, который получают ферментацией среды на основе гидролизата крахмала грибом *Aspergillus niger* и фильтрованием культуральной жидкости [6].

Ферментированный раствор представляет собой жидкость, концентрация лимонной кислоты в котором составляет 100-150 г/дм<sup>3</sup>, значение декстриногенной активности (ДАк) - (0,5-2,5) ед./см<sup>3</sup>, сахарогенной активности (САк) - (20,0-90,0) ед./см<sup>3</sup>, рН 1,3-2,8, оптическая плотность D при  $\lambda_{\max}$  400 нм 1,9-2,5, при  $\lambda_{\max}$  750 нм 2,0 - 3,0, характеризующая соответственно цветность и мутность раствора, содержание белка 1,5 - 5,0 г/дм<sup>3</sup>.

В примерах используют ферментированный раствор, имеющий концентрацию лимонной кислоты 125 г/дм<sup>3</sup>, ДАк 1,8 ед./см<sup>3</sup>, САк 58 ед./см<sup>3</sup>, D при  $\lambda_{\max}$  400 нм 2,4, D при  $\lambda_{\max}$  750 нм 2,34, содержащий 3,5 г/дм<sup>3</sup> белка.

В качестве фильтрующего средства используют мембрану с диаметром пор 0,65 мкм, в качестве сорбирующего средства - активированную суспензию бентонита с содержанием бентонита 10 мас.%, или углеволокнистый материал Карбопон-актив.

Фильтрующие и сорбирующие средства выпускаются отечественной и зарубежной промышленностью. В примерах используют фильтрующую установку "Sartokan" фирмы Sartorius AG, Германия, оснащенную стандартными и минипатронами Sartopure PP 2559, в частности 559 15 05 P7 с нормой удерживания 0,65 мкм. Для ультрафильтрации применен аппарат ВПУ НПК "Биотест", г. Кириши, Россия, и набор мембран с различным удерживанием молекулярной массы (УММ): УМП-50 от 50□10<sup>3</sup>, Мифил-20 ПА от 20□10<sup>3</sup>, полые волокна - 15 ПС от 15□10<sup>3</sup>, Мифил - 10 ПА от 10.10<sup>3</sup>, полые волокна - 5 ПС от 5.10<sup>3</sup>, полые волокна - 1 ПС от 1.10<sup>3</sup>. Характеристика аппарата: рабочее давление составляет 0,1-0,2 МПа, скорость потока - 20-37 дм<sup>3</sup>/м<sup>2</sup>□ч.

В примерах используют известные способы анализа: определение содержания кислоты в растворах титриметрическим методом, определение оптической плотности растворов, декстриногенной и сахарогенной активностей с помощью колориметрического метода, белка - методом Лоури.

Пример 1.

В колбы объемом 750 см<sup>3</sup> помещают 50 см<sup>3</sup> питательной среды и засевают ее подращенным мицелием. Колбы ставят на качалку с числом оборотов 160 мин<sup>-1</sup> и выдерживают в течение 6 сут при температуре 32°С. После ферментации биомассу гриба отделяют на воронке Бюхнера и в ферментированном растворе определяют оптическую плотность раствора, активность кислотостабильных амилалитических ферментов и концентрацию лимонной кислоты.

Ферментированный раствор объемом 2,5

дм<sup>3</sup>, имеющий температуру 20°С, пропускают через фильтрующую мембрану для удаления остатков мицелия, а затем раствор, содержащий кислоту и кислотостабильные амилалитические ферменты, разделяют ультрафильтрацией через мембрану марки УПМ-50 с пределом УММ 50,0.10<sup>3</sup> на раствор кислоты и раствор кислотостабильных амилалитических ферментов.

Результат опыта представлен в таблице.

Пример 2.

Ферментацию и очистку ферментированного раствора от остатков мицелия проводят согласно примеру 1.

Разделение раствора с температурой 15°С проводят ультрафильтрацией через мембрану Мифил - 20 ПА с пределом УММ 20,0.10<sup>3</sup> мкм.

Результат опыта представлен в таблице.

Пример 3.

Ферментацию и отделение мицелия проводят аналогично примеру 1.

Ферментированный раствор объемом 0,5 дм<sup>3</sup> с температурой 20°С пропускают через фильтрующую мембрану для удаления остатков мицелия, а затем раствор, содержащий лимонную кислоту и кислотостабильные амилалитические ферменты, разделяют ультрафильтрацией через мембрану полые волокна - 15 ПС с пределом УММ 15.10<sup>3</sup>.

Данные опыта представлены в таблице.

Пример 4.

Ферментацию, отделение мицелия и очистку ферментированного раствора через фильтрующую мембрану проводят аналогично примеру 3.

Ферментированный раствор с температурой 32°С, содержащий лимонную кислоту и кислотостабильные амилалитические ферменты, разделяют ультрафильтрацией через мембрану полые волокна - 5 ПС с пределом УММ 5.10<sup>3</sup>.

Данные опыта представлены в таблице.

Пример 5.

В условиях примера 1 к ферментированному раствору объемом 2,5 дм<sup>3</sup> добавляют 2 г/дм<sup>3</sup> предварительно подготовленной активированной суспензии с содержанием бентонита 10 мас.% и выдерживают смесь в течение 40 мин, после чего осадок отделяют, а раствор, содержащий два целевых продукта, подвергают ультрафильтрации, разделяя через мембрану Мифил - 10 ПА с пределом УММ 10,0.10<sup>3</sup> на раствор кислоты и раствор комплекса ферментов.

Данные опыта представлены в таблице.

Пример 6.

Ферментацию, отделение мицелия проводят аналогично примеру 1.

Очистку ферментированного раствора объемом 0,5 дм<sup>3</sup> с температурой 25°С проводят пропусканием его через углеволокнистый сорбент, в качестве которого используют нетканое полотно материала марки Карбопон-актив, имеющего объем сорбционных пор 0,80 см<sup>3</sup>/г и взятого в количестве 2,0 г на 1 дм<sup>3</sup> раствора. Очищенный раствор, объемом 0,5 дм<sup>3</sup>, содержащий кислоту и комплекс ферментов, разделяют ультрафильтрацией через мембрану полые волокна - 1 ПС с пределом

УММ  $1,0 \cdot 10^3$  на раствор кислоты и раствор комплекса кислотостабильных амилалитических ферментов.

Данные опыта представлены в таблице.

Пример 7 (по прототипу).

Получение ферментированного раствора проводят аналогично примеру 1. Ферментированный раствор объемом  $1000 \text{ см}^3$ , содержащий 125 г лимонной кислоты и имеющий активность  $\alpha$ -амилазы  $1,8 \text{ ед./см}^3$  и глюкоамилазы  $58 \text{ ед./см}^3$ , подвергают ультрафильтрации при температуре  $20^\circ\text{C}$  через мембрану Мифил - 20 ПА с удерживанием молекулярной массы 20000, при рабочем давлении установки 0,2 МПа, скорости потока  $25 \text{ дм}^3 \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$  и получают  $940 \text{ см}^3$  слабоокрашенного фильтрата, содержащего лимонную кислоту и примеси белка  $1,9 \text{ г/дм}^3$ , и  $60 \text{ см}^3$  концентрированного раствора кислотостабильных ферментов с активностью,  $\text{ед./см}^3$ ,  $\alpha$ -амилазы 28,3, глюкоамилазы 570.

Данные опыта представлены в таблице.

Показатели качества ферментированного раствора, после очистки содержащего кислоту и ферменты, и растворов после разделения представлены в таблице в примерах 1-7.

Сравнение результатов, полученных в примерах 1-6 по предлагаемому способу и в примере 7 - по прототипу, показывает, что использование в примерах 1-6 ферментированного раствора с температурой  $\leq 32^\circ\text{C}$  позволяет после очистки от остатков мицелия с помощью фильтрующего или сорбирующего средства получить раствор, содержащий лимонную кислоту и комплекс ферментов с декстриногенной и сахарогенной активностью, который затем с помощью ультрафильтрации через мембрану с удерживанием молекулярной массы в пределе значений  $(1,0-50,0) \cdot 10^3$  разделяется на раствор кислоты и раствор кислотостабильных амилалитических ферментов в качестве целевых продуктов.

В примере 7 (по прототипу) ферментированный раствор разделяют ультрафильтрацией и получают раствор, содержащий лимонную кислоту и примеси белковых веществ, а также раствор амилалитических ферментов. Примеси белковых веществ -  $1,9 \text{ г/дм}^3$ , повышают цветность ( $D_{\lambda 400} 0,58$ ) и мутность ( $D_{\lambda 750} 0,120$ ) раствора лимонной кислоты, снижают качество ее, вызывают необходимость дальнейшей очистки раствора кислоты.

Таким образом, предлагаемым способом

из ферментированного раствора после ферментации среды на основе гидролизата крахмала плесневым грибом *Aspergillus niger* получают два целевых продукта - чистый раствор лимонной кислоты и раствор комплекса кислотостабильных амилалитических ферментов.

#### ИСТОЧНИКИ ИНФОРМАЦИИ

1. Технологическая инструкция по производству пищевой лимонной кислоты. -Л.: ЛНИИПП, 1981, 130 с.
2. Патент РФ №2129612, МПК 6 С 12 Р 7/48, 1999.
3. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. - М.: Агропромиздат, 1987, с.177.
4. Патент РФ №2159286, МПК 6 С 12 Р 7/48, 2000.
5. Патент  $\checkmark$  №275986, МПК 5 С 12 Р 7/48, 1992.
6. Патент РФ №2132384, МПК 6 С 12 Р 7/48, С 12 N 1/14, 1999.

№ п/п	Наименование продукта	Исходный раствор				Полученный раствор				Комплекс ферментов			
		Активность $\alpha$ -амилазы, ед./см <sup>3</sup>	Активность глюкоамилазы, ед./см <sup>3</sup>	Цветность, $D_{\lambda 400}$	Мутность, $D_{\lambda 750}$	Активность $\alpha$ -амилазы, ед./см <sup>3</sup>	Активность глюкоамилазы, ед./см <sup>3</sup>	Цветность, $D_{\lambda 400}$	Мутность, $D_{\lambda 750}$	Активность $\alpha$ -амилазы, ед./см <sup>3</sup>	Активность глюкоамилазы, ед./см <sup>3</sup>	Цветность, $D_{\lambda 400}$	Мутность, $D_{\lambda 750}$
1	Максимально	1,8	58	0,58	0,120	28,3	570	0,05	0,01	28,3	570	0,05	0,01
2	То же	1,8	58	0,58	0,120	28,3	570	0,05	0,01	28,3	570	0,05	0,01
3	То же	1,8	58	0,58	0,120	28,3	570	0,05	0,01	28,3	570	0,05	0,01
4	То же	1,8	58	0,58	0,120	28,3	570	0,05	0,01	28,3	570	0,05	0,01
5	То же	1,8	58	0,58	0,120	28,3	570	0,05	0,01	28,3	570	0,05	0,01
6	То же	1,8	58	0,58	0,120	28,3	570	0,05	0,01	28,3	570	0,05	0,01
7	То же	1,8	58	0,58	0,120	28,3	570	0,05	0,01	28,3	570	0,05	0,01

#### Формула изобретения:

Способ получения лимонной кислоты из культуральной жидкости, включающий отделение мицелия гриба-кислотообразователя *Aspergillus niger* от ферментированного раствора, разделение ферментированного раствора ультрафильтрацией через мембрану, удерживающую молекулярную массу фермента, на раствор лимонной кислоты и раствор фермента, отличающийся тем, что используют имеющую активность  $\alpha$ -амилазы и глюкоамилазы культуральную жидкость, отделяют мицелий гриба при температуре  $< 32^\circ\text{C}$ , до разделения очищают ферментированный раствор с температурой  $< 32^\circ\text{C}$  с помощью фильтрующего или сорбирующего средства, причем используют мембрану с диаметром пор  $0,65 \text{ мкм}$  или суспензию бентонита, или углеволокнистый материал Карбопон-актив, а затем разделяют очищенный ферментированный раствор через мембрану, удерживающую молекулярную массу в пределах  $1000-50000$ , на раствор целевого продукта и раствор кислотостабильных амилалитических ферментов.

RU 2 233 882 C 2

RU 2 233 882 C 2