



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 198 422

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 20 10 76
(21) PV 6750-76

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³ C 12 P 7/48

(40) Zveřejněno 17 09 79
(45) Vydáno 01 7 82

(75)

Autor vynálezu LEOPOLD JINDŘICH doc.dr.ing., PLZEŇ, BURIAN MIROSLAV ing.,
ČERNÝ VÁCLAV ing. a PAŠEK JAROSLAV, KAZNĚJOV

1

(54) Způsob přípravy melasového substrátu pro citronové kvašení řízením koncentrace hexakvanoželeznatanu v roztoku a ve sraženině

Vynález se týká způsobu přípravy melasového substrátu pro citronové kvašení, které umožňuje úpravu žádané koncentrace hexakvanoželeznatanu (hkž) v roztoku a ve sraženině, zaručující optimální výtěžky kyseliny citronové po zkvašení produkčním kmenem houby *Aspergillus niger*.

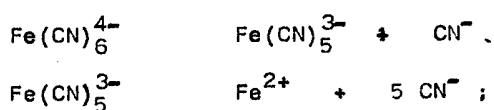
Při použití řepné melasy jako suroviny pro citronové kvašení, je třeba upravit vlastní melasový roztok tak, aby v něm vyklíčily konidie a vyrostl mycel produkční houby *Aspergillus niger*, a aby tento přeměnil co možná veškerý cukr, obsažený v melase v kyselinu citronovou. Kromě neutralizace melasy a doplnění obvyklého nedostatku fosfátu je nejdůležitější článkem úpravy vaření melasového roztoku s optimální koncentrací hexakvanoželeznatanu (hkž), který především vysráží těžké kovy, navíc však ještě mnoho draslíku a něco vápníku a hořčíku (Leopold a Valtr, *Die Nahrung* 8, 37, 166 /1960/-9.335 /1965/). Z těžkých kovů je v největším množství zastoupeno železo a jeho odstranění, respektive značné snížení jeho koncentrace, stejně jako ostatních těžkých kovů (zinek, mangan, měď, kobalt, nikl, molybden), je předpokladem dobrého růstu houby *A. niger* a její intenzivní produkce kyseliny citronové. Již zmíněný hkž je první, nejosvědčenější a nejužívanější prostředek k tomuto účelu. Často se používají také iontoměniče (Perlman D., Kita D.A., Peterson W.H., *Arch. Biochem.* 11,123-1946; Karow C.E., Waksman S.A., *Ind. Eng. Chem.* 39, 821-1947; Aquello L.A., Kieber R.J., *Ind. Eng. Chem.* 53,253-1961), dále se doporučuje aktivní uhlí (Kovats J., Le-

wicka M., Przem.Rolny a Spož. 8,343-1954/ nebo komplexony (Choudhary Q., Pirt S.J., J.Gen. Microbiol. 43,71-1966) a jejich kombinace s hkž (Krčmář et al. čs. pat. 135387-1970). Není vždy sledováno úplné odstranění těžších kovů, často je přítomnost malého množství žádoucí, což záleží na specifitě použitého produkčního kmene houby *Aspergillus niger*. Poměry jsou tím komplikovanější, že část některých kovů může být, podle složení melasy, více nebo méně maskována vysokomolekulárními sloučeninami melasy. Toxický vliv zmíněných kovů na růst houby *A. niger* může být zeslaben přítomností komplexotvorných organických kyselin jako kyselinou citronovou, jablečnou, pyrohroznovou, fumarovou (Sastri K.S. et al., Arch. Biochem. Biophys. 99,351-1962). Dále se mohou projevit určité antagonismy kovů, kdy například toxicita kobaltu, niklu a zinku je snížena nebo odstraněna přítomností hořčíku nebo železa (Sastri K.S. et al. Biochem. J. 85,486-1962) nebo měď potlačí vliv železa (Miles Laboratories, Inc. Brit. 742,972, Ch. A. 1956, 14176). Hkž, který nebyl vysrážen a nachází se v roztoku, má podle koncentrace stimulační nebo inhibiční vliv. Někteří autoři (Horitsu H. a Clark D.S., Canad. J. Microbio. 12,901-1966) nepřipisují hkž přímý vliv na enzymy terminálních metabolismů submersně pěstovaného mycelia houby *A. niger* a přikládají příznivý vliv na kvasný proces jeho indirektnímu působení jako srážedla těžkých kovů a zároveň jako stimulatoru růstu hyf a produkce kyseliny citronové. Vyšší koncentrace hkž v roztoku působí na metabolismus houby toxicky (Martin S.M., Can. J. Microbiol. 1,644-1952). Mechanismus působení hkž na zvýšení tvorby kyseliny citronové není jasný. Při submerením kvašení považují někteří autoři určitou koncentraci hkž v roztoku, která zaručuje tvorbu mycelia ve formě aktivních měkkých kuliček, za důležitou pro biosyntézu kyseliny citronové (Akbar M., Ahmad F., Choudhary M.A.Q., Pakistan J. Scient. and Ind. Res. 10,184-1967). Nerozpustný hkž-komplex s těžkými kovy prý působí jako pufr, který uvolňuje kovy, zvláště železo, ve vhodné koncentraci pro maximální produkci kyseliny citronové do roztoku (Choudhary A.Q., Pirt S. J., J. Gen. Microbiol. 43,71-1966).

Následují nové, neuveřejněné poznatky, o které se vynález opírá, a které byly námi získány na melasových substrátech, připravených z různých melas různými způsoby. Každý druh melasového roztoku byl vařen stoupajícími koncentracemi hexakvanoželeznatému drasel-ného (hkž-K). Byly stanoveny koncentrace hkž v roztoku a ve sraženině, koncentrace těžkých kovů (Fe, Zn, Mn, Cu) a po kvašení jednotlivých roztoků koncentrace vyprodukované kyseliny citronové. Nižší dávky hkž jsou úplně vysráženy spolu se všemi těžkými kovy a přesto je množství kyseliny citronové po zkvašení roztoku malé. Indukce intenzivní tvorby kyseliny citronové nastane teprve po takové dávce hkž-K, po které se objeví poprvé nízká koncentrace volného hkž v melasovém roztoku. Velikost této dávky hkž je závislá na druhu melasy a na způsobu přípravy substrátu. Odstranění pouze těžkých kovů z roztoku není tedy přímou příčinou produkce kyseliny citronové, nýbrž *conditio sine qua non*, po jejímž splnění nastane sice produkce kyseliny citronové, avšak až po vyšší dávce hkž, kdy určitý jeho malý podíl se objeví v roztoku. Intenzivní tvorba kyseliny citronové pokračuje paralelně se stoupající koncentrací volného hkž v roztoku až k maximu, po jehož dosažení často klesá, někdy však zůstává konstantní, podle druhu melasy, způsobu přípravy substrátu a druhu kmene houby *Aspergillus niger*. Pro výtěžek kyseliny citronové však není rozhodující pouze určitá

koncentrace volného hkž v roztoku, ale také určitá koncentrace hkž ve sraženině, neboť hkž vysráží mimo těžké kovy a jiné kationty také některé inhibitory citronového kvašení. Vařili-li totiž melasový roztok s malou dávkou hkž-K, která sice stačí k vysrážení těžkých kovů, mikoli však k dosažení optimální koncentrace volných $\text{Fe}(\text{CN})_6$ -iontů v roztoku a doplníme-li chybějící množství přísadou hkž-K za studena (ze které tedy nic nepřejde do sraženiny), zvýší se po zkvašení roztoku produkce kyseliny citronové významně, aniž by však dosáhla optima. Toho dosáhneme teprve tehdy, je-li melasový roztok vařen s vyšší dávkou hkž-K nebo po delší dobu, popřípadě při kyselé reakci. Tím se vysráží větší množství $\text{Fe}(\text{CN})_6$ -iontů s látkami, inhibujícími produkci kyseliny citronové. Přebytek $\text{Fe}(\text{CN})_6$ -iontů vázaný ve sraženině je prakticky bez účinku na houbu *A.niger*. K dosažení maximálních výtěžků kyseliny citronové na melasových roztocích je tedy třeba zajistit optimální koncentraci volného hkž v roztoku a jeho dostatečné množství ve sraženině k vázání inhibitorů kvašení. U dosavadních běžných způsobů přípravy melasového roztoku pro citronové kvašení a při neznalosti funkce obou frakcí hkž se používá substrát v nahodilém složení, které se právě vyskytne, tedy bez kontroly a bez úpravy množství těchto frakcí.

Oproti dosavadnímu řečenému nedostatku tkví přednost způsobu přípravy melasových substrátů pro citronové kvašení podle vynálezu v tom, že se při použití kteréhokoli způsobu vaření reguluje koncentrace hkž v roztoku, respektive ve sraženině po předešlém stanovení jejich množství. Je třeba poukázat na to, že neexistuje nějaká všeobecně platná optimální koncentrace hkž v roztoku nebo ve sraženině, neboť závisí na druhu melasy, na způsobu přípravy kvasného roztoku a na kmenu houby *Aspergillus niger*. Je-li koncentrace hkž v roztoku příliš nízká, lze ji o stanovený podíl zvýšit podle vynálezu přidáním hkž-K do roztoku za obvyčejné teploty, maximálně do 55 °C; při této teplotě hkž ještě zůstává v roztoku. Je-li však koncentrace hkž příliš vysoká, je nutno přebytečnou část odstranit. K tomu účelu byly doposud známy dvě metody: vysrážení síranem zinečnatým, jak je u submersního citronového kvašení melasových substrátů provádí Clark D.S. (Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Develop. 1, 59-1962), které však nelze doporučit, neboť podle vlastních pokusů neprobíhá reakce vždy stechiometricky, zvláště ne za provozních podmínek a v melasovém roztoku a není vždy reprodukovatelná. Druhý způsob je reakce hkž s diethionitátem sodným (SSSR-pat. č. 455992-1975), kterou se nám nepodařilo reprodukovat ani ve vodních ani v melasových roztocích. Používáme proto metodu podle vynálezu založenou na reakci mezi $\text{Fe}(\text{CN})_6$ -ionty a formaldehydem, kterou jsme vypracovali a prověřili za čtvrtprovozních a provozních podmínek. Podle Schwarzkopfa P. (Chem. Zentralhalle 83, II/4, 1536-1912) se $\text{Fe}(\text{CN})_6$ -ionty ve vodním roztoku za varu z malé části rozkládají podle rovnic:



vzniklé CN-ionty váže HCOH , a tím posunuje rovnováhu ve smyslu rozkladu dalších $\text{Fe}(\text{CN})_6$ -iontů. Podle vynálezu se postupuje tak, že se po ukončení varného procesu přidá, aniž by byl var přerušen, 2,5-násobek, tj. 555ml 40%ního formaldehydu na 1 m³, takového množství formalínu, které se po schlazení a doplnění na konečný objem přidává jako antisepti-

kum pro kvasný proces (580 ml formalínu na 2640 l konečného objemu) Roztok se v přítomnosti formalínu vaří 15 minut, načež se zchladí vodou a doplní se na konečný objem. Během 15 minut varu se spotřebuje z původního množství formalínu (především na reakci s $\text{Fe}(\text{CN})_6$ -ionty a v malé míře vytěkáním) $3/5$, tj. 333 ml a zbylé množství (222 ml) zůstává v melasovém roztoku jako preventivní antiseptikum pro kvasný proces. Souvislost mezi koncentrací $\text{Fe}(\text{CN})_6$ -iontů v hotovém melasovém roztoku a v témže roztoku po varu s formalínem ukazuje obr. 1. Je-li podíl $\text{Fe}(\text{CN})_6$ -iontů (hkž) zbylých v roztoku po působení formalínu menší, než bylo požadováno, lze jej snadno doplnit přísadou hkž-K za studena podle vynálezu.

Z celkového přidaného množství hkž-K přechází varem substrátu převážný podíl do sraženiny a daleko menší část zůstává v roztoku. U různých způsobů přípravy substrátu jsou tyto podíly různé. U dosavadních způsobů se nezdá vyskytnout nedostatek toho druhu, že určitému množství hkž ve sraženině odpovídá příliš velký nebo malý podíl hkž v roztoku. Stane se například, že při vaření se stoupajícími dávkami hkž-K zůstává koncentrace hkž v roztoku nízká a konstantní, nebo že se hkž v roztoku neobjeví, zatímco ve sraženině přibývá. Tyto nedostatky lze, podle vynálezu, odstranit tím, že příliš nízkou koncentraci volného hkž v roztoku zvýšíme jeho doplněním za studena a příliš vysokou koncentraci snížíme 15 min varem s formalínem. Některé melasy vyžadují k odstranění inhibitorů větší podíl hkž ve sraženině, což lze realizovat větší dávkou hkž-K nebo patřičným (déle trvajícím nebo kyselým) způsobem varu. V tabulce 1 jsou konfrontovány výsledky kvasných pokusů se substráty připravenými z různých melas běžnými metodami (a) a na týchž substrátech, jejichž hkž-fractiony byly korigovány (b). Jedná se vesměs o čtvrtprovozní a provozní pokusy. Čarami oddělené pokusy v tabulce 1 jsou přímo srovnatelné. Ukazuje se, že optimální koncentrace volného hkž v jednotlivých substrátech jsou různé, podle druhu melasy nebo podle způsobu přípravy substrátu, neboť korespondující hkž-fractiony ve sraženině určují koncentraci volného hkž v roztoku. Úpravou podle vynálezu (pokusy b), tj. povařením hotového substrátu s HCOH , respektive přísadou hkž-K do substrátu za studena lze kvasný roztok přizpůsobit tak, že na něm dosažené výtěžky kyseliny citronové jsou vyšší než na původním neupraveném substrátu. U pokusů č. 1 až 2 a č. 12 až 13 bylo množství hkž v roztoku sníženo varem s HCOH stejně jako u pokusů č. 5 až 7 a č. 10 až 11, kde však přílišné snížení hkž muselo být korigováno přísadou hkž-K za studena (č. 7 a 4.11). Příliš nízké množství hkž v roztoku u pokusů č. 3 až 4 a 4. 8 až 9 bylo vyrovnáno přísadou hkž-K za studena. Pokusnou serií č. 14 až 16 lze demonstrovat skutečnost, že lze nedostatek volného hkž doplnit buď přísadou hkž-K za studena, nebo někdy vhodným způsobem varu (například krátkodobým), u kterého zůstává větší podíl hkž v roztoku. Pozoruhodná je pokusná série č. 17 až 19, a to tím, že se zde jedná o tak zvanou tupou melasu, u které zůstává široké koncentrační pásmo hkž v roztoku (12,9 až 21,0 až 26,3 mg hkž/100 ml) prakticky bez vlivu na výtěžek kyseliny citronové. Tyto tři koncentrace hkž v roztoku byly dosaženy přímým varem (pok. č. 17), redukcí hkž vařením s HCOH (pok. č. 18) a přísadou hkž-K za studena (pok. č. 19).

T a b u l k a 1

Výsledky kvasných pokusů na substrátech z různých melas, připravených běžnými metodami (a) a na týchž substrátech, jejichž hkž-frakce byly korigovány (b) podle vynálezu

čís. pokusu	způsob přípravy substrátu	Množství hkž v mg/100 ml roztoku:				Výtěžek kyseliny citronové v % nasazeného cukru
		před varem	po varu	po varu s HCOH	po přísadě hkž za studena	
1	a-s	26,5	10,9	-	-	50,0
2	b	26,5	10,9	4,5	-	55,3
3	a-n	30,0	3,5	-	-	49,0
4	b	30,0	3,5	-	14,0	56,8
5	a-s	50,0	7,0	-	-	54,3
6	b	50,0	7,0	1,5	-	49,0
7	b	50,0	7,0	1,5	4,0	60,3
8	a-n	100,0	1,9	-	-	48,1
9	b	100,0	1,9	-	5,1	62,3
10	a-s	60,0	10,0	-	-	58,2
11	b	60,0	10,0	3,0	7,0	66,3
12	a-n	90,0	14,5	-	-	56,3
13	b	90,0	14,5	8,1	-	63,0
14	a-n	110,0	2,5	-	-	60,0
15	b	110,0	2,5	-	12,5	65,6
16	b ^x)	110,0	12,5	-	-	64,9
17	a-s	51,0	21,0	-	-	65,9
18	b	51,0	21,0	12,9	-	64,3
19	b	51,0	21,0	-	26,3	66,2

hkž rovná se $\text{Fe}(\text{CN})_6$ -ionty, a-s je starý způsob, a-n je nový způsob neutrální (Leopold a Valtr, Nahrung 13,11,68 (1969))

x) nový krátkodobý způsob varu

P ř í k l a d y p r o v e d e n í

1 a) Kontrolní pokus je proveden podle starého způsobu. V 660 l vody ve varné nádobě rozpustíme za míchání a zahřívání přímou parou na 80 °C 800 kg melasy, 460 ml kyseliny fosforečné (s. hmot. 1,25), 2,0 l kyseliny sírové (s. hmot. 1,565), čímž dosáhneme pH roztoku 6,6 až 6,8 a 3,2 kg hkž-K; koncentrace cukru v roztoku je cirká 32 %. Roztok se přivede do varu, ve kterém se udržuje 3/4 hodiny, načež je přívod páry zastaven, ne však míchání. Po 1/4 hodině připustíme studenou, biologicky nezávadnou vodu do konečného objemu 2 640 l, přičemž teplota roztoku klesne na 55 °C; koncentrace cukru je asi 15 %. Do roztoku přidáme množství hexakynoželeznatanu draselného (hkž-K) odpovídá 60,1 mg $\text{Fe}(\text{CN})_6$ -iontů ve 100 ml (hkž/100 ml), z nichž se nachází ve zchlazeném roztoku 16,4 mg/100 ml. Přidáme 30 g síranu zinečnatého a 580 ml formalínu (40%) jako preventivní antiseptikum kvasného procesu. Roz-

198 422

tok je zkvašen v miskách provozní kvasné komory provozním kmenem houby *Aspergillus niger* při 32 °C po dobu 8 až 9 dnů. Výtěžek kyseliny citronové, vztažený na sazený cukr, je 52,5 %.

b) Podle vynálezu provedeme, oproti kontrolnímu pokusu, tu změnu, že po 3/4 hodinovém varu přidáme 1 450 ml formalínu (40 %) a vaříme dále 15 min. Var ukončíme zastavením přívodu páry a ihned chladíme. Před varem s formalínem obsahuje roztok, stejně jako u kontrolního pokusu, 16,4 mg hkž/100 ml, kteréžto množství je však varem v přítomnosti formalínu redukováno na 8,1 mg. Vodou doplněný a zchlazený roztok je zkvašen po přísadě síranu zinečnatého, avšak bez další přísady formalínu. Výtěžek kyseliny citronové je 60,1 % vztaženo na nasazený cukr.

c) Je připraven melasový substrát stejným způsobem jako sub a), avšak s 2,0 kg hkž-K, což odpovídá 37,7 mg hkž/100 ml. V hotovém substrátu je obsaženo 1,5 mg hkž/100 ml; po přísadě 0,35 kg hkž-K do zchlazeného roztoku stoupne množství hkž na 8,1 mg/100 ml, tedy stejnou hodnotu jako u pokusu b). Přesto však dává kvasný pokus nižší než očekávaný výtěžek kyseliny citronové, totiž pouze 55,1 %. Tento výsledek indikuje, že množství hkž ve sraženině je příliš nízké. Podle vynálezu se zvýší tím, že se melasový substrát připraví s větší dávkou, a to s 2,4 kg hkž-K, odpovídající 45,2 mg hkž/100 ml. Substrát obsahuje po varu 3,5 mg hkž/100 ml roztoku, kteréžto množství je přísadou 0,24 kg hkž-K za studena zvýšeno na 8,0 mg hkž/100 ml. Po zkvašení roztoku je výtěžek kyseliny citronové 61,2 %.

2 a) Kontrolní pokus je proveden stejně jako u příkladu 1 a), avšak s jinou melasou, k jejíž přípravě je použito 2,5 kg hkž-K, čemuž odpovídá 47,3 mg hkž/100 ml. Hotový zchlazený roztok obsahuje 3,6 mg hkž/100 ml. Po zkvašení je dosažen výtěžek kyseliny citronové 55,4 %.

b) Podle vynálezu je oproti kontrolnímu pokusu provedena ta změna, že přidáme do hotového zchlazeného roztoku 0,21 kg hkž-K, čímž zvýšíme koncentraci volného hkž v roztoku z 3,6 mg na 7,7 mg ve 100 ml. Po zkvašení korigovaného roztoku je dosažen výtěžek kyseliny citronové 63,8 %.

3 a) Kontrolní pokus je proveden podle nového neutrálního způsobu. V 7,3 dílech vody rozpustíme 0,053 dílů hkž-K, zahřejeme na 95 až 100 °C a za míchání a za stálého udržování uvedené teploty připouštíme 8,8 dílů melasy. S přítokem ředěné kyseliny sírové (celkem 0,022 dílů, s. hmot 1,565), potřebné k neutralizaci melasy, počneme tehdy, když natekl do varné kádě asi 1 díl melasy; pH roztoku se udržuje při 6,6 až 6,8. Kyselina fosforečná (0,005 dílů) se přidá kdykoli během přítoku. Po jeho ukončení se roztok povaří asi 20 min, načež se zchladí a doplní biologicky nezávadnou vodou na konečný objem (29 dílů), takže roztok obsahuje 15 % cukru. Z původně do roztoku přidávaných 90 mg hkž/100 ml jich po varu zůstalo 2,1 mg. Zchlazený roztok, do něhož se přidá 0,006 dílů formalínu (40 %) jako antiseptika, je zkvašen při 32 °C 8 až 9 dnů. Výtěžek kyseliny citronové je 62,5 %.

b) Podle vynálezu se postup kontrolního pokusu pozmění tak, že se po ukončení 20 min varu

přidá 0,016 dílů formalínu (40 %), a že se vaří dále 15 min, načež se zchladí a dokončí jako u kontrolního pokusu. Přísada formalínu jako antiseptika odpadá. Původní koncentrace hkž, totiž 20,1 mg/100 ml je působením formalínu redukována na 9,2 mg. Výtěžek zkvašeného roztoku je 70,6 % kyseliny citronové, vztaženo na nasazený cukr.

4 a) Kontrolní pokus je vařen krátkodobým neutrálním způsobem: smícháme za studena 7,3 díly vody s 8,8 dílů melasy a přidáme 0,011 dílů kyseliny sírové (s. hmot. 1,565), 0,0066 dílů kyseliny mravenčí (85 %), která působí jako antiseptikum za horka a částečně nahrazuje kyselinu sírovou, 0,005 dílů kyseliny fosforečné (s. hmot. 1,25) a 0,0277 dílů hkž-K, čemuž odpovídá 47,3 mg hkž/100 ml konečného roztoku; pH roztoku je 6,75. Roztok se za míchání přivede do varu, ve kterém se udrží 15 min, načež se zchladí vodou a zároveň doplní na konečný objem (29 dílů). Roztok obsahuje 15 % cukru a 10,7 mg hkž ve 100 ml. Po přísadě 0,0006 dílů síranu zinečnatého je roztok zkvašen. Výtěžek kyseliny citronové je 63,1 %.

b) Podle vynálezu se postupuje stejně jako sub a) s tím rozdílem, že se roztok vaří pouze 5 min, načež se přidá 0,016 dílů formalínu a vaří se dále 15 minut; potom se roztok zchladí a postupuje se dále jako sub a). Koncentrace volného hkž je působením formalínu redukována z 10,7 mg na 3,6 mg ve 100 ml. Výtěžek kyseliny citronové je 71,2 %.

5.a) Kontrolní pokus je vařen krátkodobým kyselým způsobem. Za studena smícháme, stejně jako u příkladu 4, 7,3 díly vody, 8,8 dílů melasy a přidáme 0,088 dílů kyseliny sírové, 0,005 dílů kyseliny fosforečné, přivedeme roztok do varu, který udržujeme 15 minut, načež přidáme 0,0264 dílů hkž-K, vaříme dále 5 min a zchladíme vodou. Přebytek kyseliny neutralizujeme 50 % roztokem techn. NaOH. Z původních 45,1 mg hkž/100 ml zůstalo v hotovém roztoku 12,9 mg. Po přísadě 0,0006 dílů síranu zinečnatého je roztok zkvašen. Výtěžek kyseliny citronové je 66,2 %.

b) Podle vynálezu je postupováno stejně jako u pokusu a) s tím rozdílem, že na 5 min var s hkž-K navazuje ještě 15 min var s 0,016 díly formalínu, po jehož ukončení se roztok zchladí, neutralizuje, a po přísadě síranu zinečnatého se zkvasí. Koncentrace volného hkž v roztoku klesla z 12,9 mg na 4,9 mg/100 ml. Výtěžek kyseliny citronové je 63,5 %.

c) Je-li opakován pokus b) a je-li do zchlazeného roztoku přidáno 0,00157 dílů hkž-K, zvýší se koncentrace hkž z 4,9 mg na 7,6 mg ve 100 ml roztoku. Po zkvašení upraveného roztoku je dosažen výtěžek kyseliny citronové 74,0 %, vztaženo na nasazený cukr.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy melasového substrátu pro citronové kvašení řízením koncentrace $\text{Fe}(\text{CN})_6$ -iontů v roztoku a ve sraženině, vyznačený tím, že se při vaření melasového roztoku používá minimálně takové množství hexakvanoželeznatanu draselného, aby se v roztoku dala dokázat přítomnost volných $\text{Fe}(\text{CN})_6$ -iontů.

198 422

2. Způsob přípravy melasového substrátu podle bodu 1, vyznačený tím, že koncentrace $\text{Fe}(\text{CN})_6$ -iontů v roztoku se sníží povařením hotového roztoku před nebo po doplnění vodou na konečný objem s takovým množstvím formaldehydu, aby jeho zbytek v roztoku neinhiboval růst a produkci produkčního kmene houby *Aspergillus niger*.
3. Způsob přípravy melasového substrátu podle bodů 1 a 2, vyznačený tím, že koncentrace $\text{Fe}(\text{CN})_6$ -iontů v roztoku se zvýší na žádanou hodnotu přidáním vypočteného množství hexa-kyanoželeznatanu draselného do hotového zchlazeného substrátu o teplotě nižší 55 °C.