



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

203545
(11) (B1)

[51] Int. Cl.³
C 12 P 7/48

[22] Přihlášeno 15 11 78
[21] (PV 7441-78)

[40] Zveřejněno 30 06 80

[45] Vydáno 15 01 83

(75)

Autor vynálezu

ŠIROKÝ LUBOMÍR ing., KAZNĚJOV a LEOPOLD JINDŘICH doc. dr. ing.,
PLZEŇ

(54) Způsob přípravy kvasného melasového média pro citrónové kvašení

1

Vynález se týká způsobu intenzivnější výroby kyseliny citrónové při zkvašování melas za současného potlačení tvorby kyseliny glukonové.

U průmyslových kmenů houby *Aspergillus niger* je vedle vysoké produktivity kyseliny citrónové ceněna též ta vlastnost, že netvoří žádné nebo pouze zanedbatelné množství vedlejších kyselin, především kyseliny šťavelové a kyseliny glukonové. Vedlejší kyseliny vznikají na účet hlavního produktu a ztěžují jeho izolaci ze zkvašeného roztoku a jeho vyčištění. Kyselina šťavelová se vyskytuje častěji než kyselina glukonová. Studium výskytu kyseliny šťavelové během citrónového kvašení ukázalo, že sklon k větší či menší, (resp. žádné) tvorbě kyseliny šťavelové je dán jednak specifitou použitého kmene houby *Aspergillus niger*, jednak specifitou zkoušené melasy, která může produkovat kyseliny šťavelové u jednotlivých kmenů indukovat ve větší či menší míře (Leopold J. a Zd. Valtr, Zentrabl. Bakteriologie II. Abt. 113, 24, 1960). Jak známo, podporuje všeobecně neutrální a zvláště alkalická reakce tvorbu kyseliny šťavelové. Totéž se projevuje i při vzniku kyseliny glukonové, o podmínkách její tvorby během citrónového kvašení je však známo méně. V principu pro ni platí totéž,

2

co pro kyselinu šťavelovou, že totiž sklon k produkci kyseliny glukonové je jednak vlastností použitého kmene houby *Aspergillus niger* (Leopold J., Die Nahrung 3, 987, 1959) a jednak může být tvorba kyseliny glukonové indukována použitou melasou, jak dokazují v dalším uvedená pozorování. Zatímco lze výskyt kyseliny šťavelové během citrónového kvašení potlačit tím, že se v substrátu nastaví určitý poměr alkálií a fosfátu a že se během celého procesu udržuje pH kolem 2,0 (USA patent 3 335 067, 1967, Process for producing citric acid. Miles Laboratories), není podobný zásah pro eliminaci kyseliny glukonové doposud znám. U některých bakterií (*Klebsiella aerogenes*) vzniká kyselina glukonová dehydrogenací a následující defosforylací glucoso-6-fosfátu (D. M. Neijssel, D. W. Tempest, Arch. Microbiol. 105, 183, 1975), zatímco substrátem glucosooxydasy z houby *Aspergillus niger* je glukóza. Apoenzym glucosooxydasy se skládá ze dvou identických podjednotek a jako koenzym slouží flavinadeninnukleotid (Harubito T., N. Osamu, O. Kazuji, J. Biochem. - Tokio, 78, 835, 1976). Během tvorby kyseliny glukonové houbou *A. niger* je potlačena cesta Embden-Meyrhopf (Franke W., Zentralbl. Bakteriologie II. Abt. 191, 194, 1963), čímž je hůře

zásobován trikarboxylový cyklus a snížena produkce kyseliny citrónové. Celá řada cukrů, zvláště však glukóza a některé organické kyseliny indukují tvorbu glukosooxydasy [Franko W., L. Nöckel, K. Acye, Arch. Mikrobiol. 51, 323, 1965]. Vedle prací, které se snažily o potlačení tvorby cizích kyselin, neúčehaly snahy zintenzívnit tvorbu hlavního produktu t. j. kyseliny citrónové přísadou některých látek do kvasného média. Před léty byla doporučena přísada arsenu, resp. kyanidusodného (Chughatal T. D. a T. Walker, Biochem. J. 48, 524, 1951; 51, 484, 1954), síranu draselného (Leopold J., Z. Valtr, čsl. pat. 92291 — 1960 a 97292 — 1960), alkoholů (Quadar M. A. et al., Pakistan J. Biochem. 1, 43, 1968) jakož i jablečné tresti a sladovného květu (Ilczuk Z., Zentralbl. Bakteriologie. II. Abt. 593, 1972). Podle čs. patentu 135387 — 1970 (Krčmář S., J. Tachmyna, J. Tomovičová) lze zvýšit výtěžek kyseliny citrónové přísadou etyléndiamintetraacetátu do kvasného melasového média.

Při provedeném studiu melas, vyrobených z odrůd cukrovky pěstovaných v subtropické oblasti kolem Středozemního moře, bylo zjištěno, že se při jejich zkvašení na kyselinu citrónovou produkčním kmenem houby *Aspergillus niger*, který na tuzemských melasách produkuje vždy pouze kyselinu citrónovou bez vedlejších kyselin, tvoří vedle kyseliny citrónové též značné množství kyseliny glukonové. Je to tedy příklad, kdy melasa indukují v produkčním kmenu tvorbu kyseliny glukonové. Zmíněné melasy mají navíc tu zvláštnost, že výtěžek kyseliny citrónové při optimální dávce ferrokyanidu draselného (tj. té dávce, při které se docílí optimální výtěžek kyseliny citrónové bez dalších zásahů do kvasného roztoku) je nízký a závislý na počátečním pH kvasného média, které však též ovlivňuje tvorbu kyseliny glukonové. Pro ilustraci jsou uvedeny v tabulce 1 výsledky kvasných pokusů jednoho druhu melas z řečené oblasti. Zatím co zde použitý kmen houby *A. niger* dává na tuzemských melasách vysoké výtěžky kyseliny citrónové (70 až 80 %) a neprodukuje žádné cizí kyseliny, je i optimální výtěžek kyseliny citrónové na cizí melase velmi nízký a tvorba kyseliny glukonové nezvykle vysoká. Nápadná je citlivá závislost tvorby obou kyselin na původním pH kvasného média. Při pH 7,10 je tvorba kyseliny ci-

trónové maximální, tvorba kyseliny glukonové minimální; čím víc se od optimálního pH odchylujeme, tím víc se mění poměr obou kyselin v neprospěch kyseliny citrónové. V tabulce 2 jsou uvedeny výtěžky obou kyselin u dalších 4 druhů melas téhož typu (nepodtržená čísla); maximální výtěžky kyseliny citrónové jsou o něco vyšší, výtěžky kyseliny glukonové se pohybují v podobných hranicích jako u vzorku z tabulky 1 a projevuje se jejich velká závislost na pH média. U všech uvedených pokusů je poměr obou kyselin takový, že již nelze mluvit o citrónovém kvašení, ale o smíšeném kvašení kyseliny citrónové a glukonové, které je pro průmyslové účely bezcenné. Takové melasy by nebyly s příjatelnými ekonomickými výsledky provozně zpracovatelné.

Tabulka 1

Vliv pH kvasného média na výtěžky kyseliny citrónové (v % na nasazený cukr) při optimální dávce ferrokyanidu draselného

pH	Výtěžky v %	
	kyseliny citrónové	kyseliny glukonové
7,25	26,8	25,6
7,10	34,7	12,7
6,90	27,7	14,5
6,80	20,9	20,2
6,55	15,1	24,5

Uvedené nedostatky odstraňuje vynález, jehož podstata spočívá v působení etyléndiamintetraacetátu dvojsodného (chelatonu 3, EDTA) na kvasné médium. Kvasný melasový roztok je uvařen s optimální dávkou ferrokyanidu draselného a po doplnění a ochlazení vodou se v něm při 50 až 60 °C nebo při nižší teplotě rozpustí EDTA. Pro daný druh melasy je podle vynálezu třeba předem vyzkoušet optimální pH kvasného média (6,0 až 7,2) a též optimální dávku EDTA, přibližně 0,001 mol/l. Vliv etyléndiamintetraacetátu na výtěžky kyseliny citrónové a kyseliny glukonové u několika druhů řečeného typu melas (I až IV) je patrný z výsledku pokusů, uvedených v tabulce 2. Optimální koncentrace EDTA zde byla 0,001 mol/l média; jeho přísadou se pH z média mírně snížilo.

Tabulka 2

Vliv etyléndiamintetraacetátu (EDTA) na výtěžek kyseliny citrónové a kyseliny glukonové (v % na nasazený cukr) při různých pH kvasného média u různých melas (I–IV)

č.	melasa I: pH	kys. citr. v %	kys. gluk. v %	melasa II: pH	kys. citr. v %	kys. gluk. v %
1	7,30–7,19	27,0–49,0	24,8–10,5	7,70–7,33	41,6–44,3	32,2–14,4
2	7,15–6,98	36,6–46,7	13,1–7,8	7,10–6,77	40,6–43,5	23,5–18,2
3	6,93–6,77	28,7–39,3	15,7–22,2	6,88–6,45	41,8–56,1	18,2–0
4	6,77–6,67	21,7–58,4	21,0–0	6,73–6,38	38,9–52,5	23,5–1,2
5	6,60–6,47	16,6–33,6	25,0–22,2	6,50–6,20	26,0–48,4	31,3–14,4
č.	melasa III: pH	kys. citr. v %	kys. gluk. v %	melasa IV: pH	kys. citr. v %	kys. gluk. v %
1	6,93–6,80	41,7–53,4	26,1–19,6	7,15–7,00	40,2–45,2	7,5–5,2
2	6,75–6,65	37,6–58,4	26,1–18,2	6,95–6,77	38,8–51,8	7,9–1,3
3	6,55–6,35	35,4–60,6	27,4–19,6	6,77–6,65	32,7–46,6	15,7–4,0
4	6,32–6,15	35,6–59,3	23,5–24,8	6,60–6,45	23,5–42,2	31,3–10,4

Hodnoty nepodtržené, resp. podtržené, od povídají pokusům bez přísady, resp. s přísadou EDTA

U každého zkoušeného druhu melas se projevuje citlivá závislost výtěžků kyseliny citrónové a kyseliny glukonové na pH kvasného média. Optimální, avšak nízké výtěžky kyseliny citrónové (od 36,6 do 41,7 %) jsou doprovázeny výtěžky kyseliny glukonové od 7,5 do 3,13 %. Přísada EDTA podle vynálezu zvýší při horním pH u každého druhu melas výtěžky kyseliny citrónové velmi výrazně, a to u melasy I z 36,6 na 58,4 %, u melasy II z 41,8 na 56,1 %, u melasy III z 41,7 na 60,6 % a u melasy IV z 40,2 na 51,8 %, to je o 11 až 29 %. Současně je podle vynálezu výskyt kyseliny glukonové u melasy I a II zcela potlačen a u melasy IV byl její výtěžek snížen na 1,3 %; přesto, že u melasy III nebylo snížení výtěžků kyseliny glukonové tak efektivní (z 27 % na 19 %), vzrostl výtěžek kyseliny citrónové z 35 % na 60 %. K maximální stimulaci tvorby kyseliny citrónové a zároveň k nejefektivnějšímu potlačení vzniku kyseliny glukonové je třeba vyzkoušet u každého druhu použité melasy optimální pH kvasného média a optimální dávku etyléndiamintetraacetátu. Aplikací vynálezu lze tedy zkvasit melasy, které by nebyly provozně zpracovatelné, s přijatelnými až dobrými výtěžky kyseliny citrónové a technologicky nezávadným množstvím kyseliny glukonové.

Již citovaným čs. patentem č. 135387 je přísada etyléndiamintetraacetátu do kvasného média doporučena ku zvýšení výtěžku kyseliny citrónové. Mezi tímto patentem a předloženým vynálezem jsou však některé zásadní rozdíly. Podle citovaného patentu se melasový substrát připravuje s množstvím ferrokyanidu draselného o 20 až 40 % nižším, než je optimální dávka a nejdříve po 30 min. se přidá 0,0005 až 0,001 mol etyléndiamintetraacetátu na 1 l při teplotě nad 60 °C, čímž se zvýší výtěžek kyseliny citrónové o cca 20 %. Oproti tomuto postupu je u navrženého vynálezu substrát vařen s celou optimální dávkou ferrokyanidu draselného a etyléndiamintetraacetát se přidá do hotového substrátu při teplotě 60 °C a nižší. U vynálezu je pozorován velký vliv pH na změnu výtěžku kyseliny citrónové a kyseliny glukonové v rozmezí 6,0 až 7,2, zatímco se čs. patent

č. 135387 spokojuje zmínkou o úpravě pH na 7,0 až 7,2 [viz. příklad 1 citovaného patentu]. A konečně další výrazný rozdíl mezi oběma srovnávanými vynálezy: u námi předloženého vynálezu vykazuje EDTA ještě další efekt, a sice velmi intenzivní snížení respektive zastavení tvorby kyseliny glukonové během citrónového kvašení. Navržený vynález se tedy liší od citovaného patentu v zásadních bodech.

Příklad 1

V 660 dílech vody rozpustíme za míchání a zahřívání na 80 °C 800 dílů melasy, 0,46 dílů kyseliny fosforečné (s. hm. 1,25), 2,0 díly kyseliny sírové (s. hm. 1,565) a 3,2 díly ferrokyanidu draselného. Roztok (s obsahem cca. 32 % cukru) se přivede do varu, v němž se určuje 3/4 hodiny, načež se připustí studená, biologicky nezávadná voda do konečného objemu (koncentrace cukru je 15 %). Teplota resultujícího roztoku je asi 55 °C, pH 6,65. Přidáme 0,001 mol etyléndiamintetraacetátu dvojsodného na 1 l, čímž se pH roztoku posune na 6,50. Po 8 až 9denním kvašení se vytvoří 60,6 % kyseliny citrónové (v % na nasazený cukr) a pouze stopy kyseliny glukonové. Bez přísady etyléndiamintetraacetátu jsou výtěžky kyseliny citrónové 36,0 % a kyseliny glukonové 18,7 %, počítáno v % na nasazený cukr.

Příklad 2

S jiným druhem melasy je připraven kvasný roztok stejným způsobem jako u příkladu 1 až na okolnost, že je použito 1,8 dílů kyseliny sírové a 2,9 dílů ferrokyanidu draselného; pH hotového roztoku je 6,95. Po přísadě 0,0013 mol etyléndiamintetraacetátu dvojsodného do 1 l substrátu klesne pH na 6,79. Výtěžek kyseliny citrónové ve zkvašeném roztoku je 58,7 % (počítáno na nasazený cukr), kyselina glukonová nebyla dokazatelná. V kontrolním pokusu bez přísady etyléndiamintetraacetátu jsou výtěžky kyseliny citrónové 32,4 % a kyseliny glukonové 27,1 % (počítáno na nasazený cukr).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy kvasného melasového média pro citrónové kvašení za použití ferrokyanidu draselného a etyléndiamintetraacetátu dvojsodného, vyznačený tím, že se melasový roztok vaří s optimální dávkou ferrokyanidu draselného, to je dávkou, při které se docílí optimální výtěžek kyseliny

citrónové bez dalších zásahů do kvasného roztoku při daném druhu melasy, načež se do zchlazeného roztoku při teplotě 40 až 60 °C přidá etyléndiamintetraacetát dvojsodný v koncentraci 0,0005 až 0,002 mol na 1 l kvasného média a pH kvasného média se upraví na 6,0 až 7,2.