



Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu nr ———

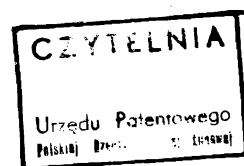
Int. Cl.³ C12P 7/48
C12N 9/00

Zgłoszono: 83 01 21 (P. 240249)

Pierwszeństwo ———

Zgłoszenie ogłoszono: 83 11 21

Opis patentowy opublikowano: 1986 08 29



Twórcy wynalazku: Tadeusz Wiesław Izbiński, Janusz Milewski, Regina Sawicka-Żurkowska

Uprawniony z patentu tymczasowego: Instytut Przemysłu Fermentacyjnego,
Warszawa (Polska)

Sposób jednoczesnego otrzymywania preparatu enzymatycznego oraz kwasu cytrynowego

Przedmiotem wynalazku jest sposób jednoczesnego otrzymywania preparatu enzymatycznego zwłaszcza pektynolitycznego oraz kwasu cytrynowego z odcieku pofermentacyjnego powstającego podczas hodowli *Aspergillus niger*.

Jak wiadomo podczas produkcji kwasu cytrynowego przez *Aspergillus niger* metodą powierzchniową wydzielane są do fazy ciekłej środowiska hodowlanego enzymy, zwłaszcza enzymy pektynolityczne, które mają zastosowanie między innymi w przemyśle spożywczym do klarowania soków owocowych, moszczów winnych, depektynizacji miążg owocowych itp, natomiast podczas hodowli *Aspergillus niger* metodą wglębną wydzielane są głównie enzymy proteolityczne wykorzystywane między innymi w przemyśle paszowym.

Według tradycyjnej technologii, kwas cytrynowy zawarty w odcieku pofermentacyjnym poddaje się neutralizacji w wysokiej temperaturze przy użyciu wodorotlenku wapniowego, co powoduje praktycznie całkowitą inaktywację kompleksu enzymów znajdujących się w odcieku.

W literaturze przedmiotu, między innymi z opisu patentowego ZSRR nr 228 651, znany jest sposób otrzymywania preparatu pektynolitycznego i kwasu cytrynowego z cieczy po hodowli *Aspergillus niger* polegający na sublimacyjnym suszeniu całego odcieku i następnie działaniu 55% alkoholem izopropylowym. Enzymy pektynolityczne pozostają w osadzie, kwas cytrynowy wraz z substancjami balastowymi przechodzi do roztworu, z którego jest odzyskiwany tradycyjnymi metodami.

W czasopiśmie Prikladnaja Mikrobiologija i Biochimija 1969 r., nr 3, opisana jest metoda odzyskiwania enzymów z odcieku pofermentacyjnego polegająca na ich adsorpcji na cząsteczkach kwasu benzoowego. Oddzielony adsorbat rozszczepia się alkoholem izopropylowym, a następnie wytrącony preparat enzymatyczny dosusza w temperaturze około 35°C.

W opisie patentowym PRL nr 103 246 przedstawiony jest sposób jednoczesnego otrzymywania preparatu enzymatycznego i kwasu cytrynowego, który polega na tym, że roztwór pofermentacyjny poddaje się neutralizacji w temperaturze poniżej 50°C, po czym, po wydzieleniu cytrynianu wapniowego z odcieku, otrzymuje się preparat enzymów pektynolitycznych jedną ze znanych metod, na przykład poprzez zagęszczanie pod próżnią. Sposobem tym otrzymuje się preparaty

enzymatyczne o wysokiej zawartości suchej masy, a tym szczególnie popiołu, co ogranicza jego cechy użytkowe w przemyśle spożywczym.

Celem wynalazku jest opracowanie prostej metody jednoczesnego otrzymywania preparatu o dużej aktywności enzymatycznej przy niskiej zawartości substancji mineralnych oraz kwasu cytrynowego.

Cel ten osiągnięto w sposobie według wynalazku którego istota polega na tym, że odcinek pofermentacyjny po hodowli *Aspergillus niger* rozdziela się na dwie frakcje poprzez ultrafiltrację przy użyciu błon półprzepuszczalnych uzyskując w ten sposób retenat zawierający roztwór kwasu cytrynowego, który może być wydzielony jedną ze znanych metod.

Proces według wynalazku prowadzi się w sposób następujący.

Odcinek pofermentacyjny z hodowli *Aspergillus niger* o znanej aktywności enzymatycznej i zawartości kwasu cytrynowego wprowadza się do aparatu do ultrafiltracji. Proces ultrafiltracji prowadzi się przy użyciu błon półprzepuszczalnych o rozdzielczości granicznej od 2 000 do 100 000, korzystnie od 10 000 do 50 000, w temperaturze od 4°C do 55°C, korzystnie 400 kPa. Po kilku godzinach prowadzenia procesu ultrafiltracji uzyskuje się retenat, czyli frakcję zagęszczoną zawierającą enzymy oraz filtrat stanowiący roztwór kwasu cytrynowego. W celu dokładniejszego, prawie całkowitego oddzielenia kwasu cytrynowego z frakcji enzymatycznej, stosuje się rozcieńczenie retenatu wodą w stosunku 1 : 1 do 1 : 10, korzystnie 1 : 5 i ponownie prowadzi się proces ultrafiltracji w warunkach przedstawionych powyżej.

Z frakcji zawierającej enzymy można otrzymać preparat enzymatyczny bardziej zatężony, bądź preparat w postaci stałej np. na drodze zatężania pod próżnią, wytrącania rozpuszczalnikami organicznymi, suszenie rozprężowe lub sublimacyjnego.

Natomiast roztwór kwasu cytrynowego, pozbawiony enzymów, poddaje się tradycyjnemu procesowi neutralizacji wodorotlenkiem wapniowym w wysokiej temperaturze.

Przykład I. 300 cm³ odcieku pofermentacyjnego z hodowli powierzchniowej *Aspergillus niger* o ogólnej aktywności pektynolitycznej 4 000 PM i zawartości kwasu cytrynowego 15,7% wprowadza się do aparatu Amicon 402. Proces ultrafiltracji prowadzi się przy użyciu membrany PM-10 w temperaturze 20°C i przy ciśnieniu 400 kPa. Po sześciu godzinach prowadzenia procesu ultrafiltracji otrzymuje się 50 cm³ retenatu wykazującego aktywność pektynolityczną 21 500°PM i zawierającego 15,9% kwasu cytrynowego, co stanowi 16,9% początkowej ilości kwasu cytrynowego, oraz 250 cm³ filtratu o zawartości 15,5% kwasu cytrynowego, 50 cm³ retenatu rozcieńczono następnie wodą destylowaną w stosunku 1 : 3, uzyskując płyn o aktywności pektynolitycznej 5 400°PM i zawartości kwasu cytrynowego 4,0%. Płyn ten poddano ultrafiltracji w aparacie Amicon typ 402 przy użyciu membrany XM-50 w temperaturze 20°C i ciśnieniu 300 kPa. Po czterech godzinach procesu ultrafiltracji uzyskano 29 cm³ retenatu o aktywności enzymatycznej 28 800°PM i zawartości kwasu cytrynowego 1,3% oraz 171 cm³ filtratu o zawartości 4,45% kwasu cytrynowego.

Przykład II. 14,8 dm³ odcieku pofermentacyjnego o ogólnej aktywności pektynolitycznej 6 600°PM i zawartości kwasu cytrynowego 13,3% poddano ultrafiltracji w aparacie Amicon typ TC 1D przy użyciu membrany PM-10, w temperaturze 20°C i ciśnieniu roboczym 700 kPa. Stosując jednokrotne rozcieńczenie retenatu wodą w stosunku 1 : 4 oraz prowadząc proces ultrafiltracji za każdym razem w takich samych warunkach otrzymano 1,6 dm³ retenatu o aktywności pektynolitycznej 57 500°PM oraz dwie frakcje filtratu: 12,0 dm³ o zawartości 13,2% kwasu cytrynowego i 11,4 dm³ o zawartości 2,2% kwasu cytrynowego.

Charakterystyka otrzymanego preparatu enzymatycznego przedstawia się następująco:

Aktywność pektynolityczna	57 500°PM
Aktywność poliglakturonazy	46 670 j. PG/cm ³
Aktywność pektynoesterazy	6 j. PE/cm ³
Aktywność proteolityczna	570 JH/cm ³
Aktywność amylolityczna	brak
Aktywność celulolityczna	200 j. EN-CMC/cm ³
Zawartość suchej masy	10,4%
Zawartość białka ogólnego	23,5%
Zawartość popiołu	1,01%

Zawartość metali:

K	1290 mg/dm ³
Na	130 mg/dm ³
Ca	250 mg/dm ³
Mg	6,7 mg/dm ³
Fe	12,6 mg/dm ³
Zn	0,2 mg/dm ³
Cu	<0,05 mg/dm ³
Pb	0,1 mg/dm ³

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób jedoczesnego otrzymywania preparatu enzymatycznego oraz kwasu cytrynowego z odcieku pofermentacyjnego z hodowli *Aspergillus niger*, **znamienny tym**, że odcinek pofermentacyjny rozdziela się na dwie frakcje poprzez ultrafiltrację przez błony półprzepuszczalne o rozdzielczości granicznej 2000–100000, korzystnie 1000–50000, przy ciśnieniu 10 kPa–700 kPa, korzystnie 400 kPa, w temperaturze 4°C–55°C, korzystnie 20°C, uzyskując retenat zawierający wielkocząsteczkowe enzymy oraz filtrat, z którego następnie oddziela się kwas cytrynowy.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że retenat rozcieńcza się wodą, najkorzystniej w stosunku 1 : 1–1 : 10, po czym płyn ten poddaje się procesowi ultrafiltracji przez błony półprzepuszczalne o rozdzielczości granicznej 2000–100000, korzystnie 10000–50000, przy ciśnieniu 10 kPa–700 kPa, korzystnie 400 kPa, w temperaturze 4°C–55°C, korzystnie 20°C.