

C12d 1/04



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ OPIS PATENTOWY

Nr 43794

Kl. 6 b, 16/02

Miles Laboratories, INC

Elkhart, Indiana, Stany Zjednoczone Ameryki

Sposób wytwarzania kwasu cytrynowego na drodze fermentacji

Patent trwa od dnia 28 czerwca 1957 r.

Pierwszeństwo: 5 lipca 1956 r. (Stany Zjednoczone Ameryki).

Wynalazek dotyczy otrzymywania kwasu cytrynowego sposobem fermentacji dolnej, a w szczególności zastosowania ulepszanego źródła pożywki zawierającej azot, niezbędnej dla właściwego rozwoju szczepu pleśniaków wytwarzających kwas cytrynowy, takich jak kropidlak czarny (*Aspergillus niger*).

W różnych metodach technicznych wytwarzania kwasu cytrynowego przez fermentację dobiera się środowisko, które wpływa korzystnie na silny wzrost organizmów z grupy pleśniaków, zdolnych do przemiany cukrów na kwas cytrynowy. Wiadomo, że oprócz cukru i mineralnych środków odżywczych, środowisko to powinno zawierać źródło azotu. Azot ten zazwyczaj wprowadza się w postaci soli nieorganicznych, z których najbardziej wydajną jest, zgodnie z patentem Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 2492667, węglan amonowy.

Przyczyny wyższości węglanu amonowego nad innymi solami, zawierającymi azot, nie zostały dotychczas ostatecznie wyjaśnione. Jest on stosowany, ponieważ wywiera wpływ na podwyższanie wydajności kwasu cytrynowego i poza tym powoduje zmniejszenie lub zahamowanie wytwarzania kwasu szczawiowego i innych niepożądanych kwasów. Jednakże stosowanie węglanu amonowego jako głównej pożywki połączone jest z pewnymi niedogodnościami. Węglan amonowy, nawet w postaci proszku, tworzy podczas składowania twarde trudne do rozbicia bryły, powstające prawdopodobnie na skutek stapiania się kryształów. W celu rozdrobnienia tych brył na małe kawałki, które dostatecznie szybko rozpuściłyby się po wprowadzeniu ich do środowiska fermentacji, trzeba stosować młot powietrzny. Ta praca przy przygotowywaniu węglanu amonowego odbywa się w niekorzystnych warunkach na skutek wy-

dzielania się gazowego amoniaku i jeżeli nie ma silnej wentylacji, robotnicy muszą pracować w maskach gazowych. Poza tym powstają w tym przypadku straty spowodowane ulatnianiem się amoniaku do atmosfery. Również trudność oznaczenia szybkości rozpuszczania się poszczególnych partii węglanu amonowego uniemożliwia dokładną kontrolę ilości pożywki. Powyższe fakty dowodzą, że jest szereg poważnych niedogodności, związanych ze stosowaniem węglanu amonowego przy metodach dolnej fermentacji.

Jednym z celów wynalazku jest zastosowanie takiego źródła azotu, które pozwoliłoby na dokładną kontrolę zarówno ilości dodanego azotu w postaci pożywki, jak i pH środowiska fermentacji.

Celem wynalazku jest również dobranie pożywki azotowej w takiej postaci, która eliminowałaby trudności związane z przygotowywaniem i wprowadzaniem jej do środowiska fermentacji, jak to ma miejsce w przypadku węglanu amonowego.

Dalszym celem wynalazku jest zastosowanie takiego źródła azotu, które nie hamowałoby przemiany węglowodanów na kwas cytrynowy i nie powodowało powstawania podczas fermentacji innych niepożądanych kwasów, jak szczawiowego i glukonowego.

Wymienione cele osiąga się według wynalazku przez stosowanie gazowego amoniaku jako źródła azotu przy wytwarzaniu kwasu cytrynowego metodą dolnej fermentacji z surowców zawierających węglowodany.

Zastąpienie węglanu amonowego amoniakiem nie wywołuje żadnych zmian morfologicznych, hodowlanych i fizjologicznych u organizmów grupy pleśniaków. Porównanie wyników obu

tych metod przedstawione jest szczegółowo w poniższych przykładach.

Przykład I. Przy wytwarzaniu kwasu cytrynowego z grukozы sposobem dolnej fermentacji porównywano działanie gazowego amoniaku (o czystości odpowiadającej wymaganiom chłodnictwa) jako źródła azotu z działaniem węglanu amonowego (odpowiadającego wymaganiom Farmakopei Stanów Zjednoczonych Ameryki). Środowiska zawierające: 0,065% NH_3 lub 0,2% $(NH_4)_2CO_3$, 0,14% KH_2PO_4 , 0,1% $MgSO_4$, 500 części na milion morfiliны, — 6 części na milion $CaCl_2$ (jako Ca), 18 części na milion MoO_3 , 18 części na milion H_2O_2 , 0,5 do 5,0 części na milion Zn oraz około 13% zdekationizowanego węglowodanu, doprowadzono za pomocą chemicznie czystego HCl do pH = 2,6. Całość sterylizowano w autoklawie pod ciśnieniem 775,7 mm Hg przez 10 minut i następnie odprowadzono po 4000 ml do wysterylizowanych kolumnowych kadzi fermentacyjnych ze szkła, opisanych w patentcie Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 2492667. Podczas przygotowywania środowiska fermentacyjnego wprowadzono 0,068% gazowego amoniaku do roztworu cukru, zawierającego wszystkie konieczne dodatki wraz z technicznym kwasem solnym w ilości dostatecznej do osiągnięcia końcowego pH = 2,6. Fermentację przeprowadzano za pomocą kropidlaku czarnego w temperaturze 30 — 32°C. Warunki fermentacji i metody analizy były takie, jakie podano w patentach Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 2476159 i nr 2492667. Tabela I podaje wydajności kwasu cytrynowego otrzymanego w środowisku zawierającym amoniak gazowy oraz w środowisku zawierającym węglan amonowy.

Tabela I.

Źródło azotu % N	Zn ⁺⁺ części na milion	Czas fermentacji w dniach	Kwasowość w %	Początkowa zawartość cukru (jako dekstrozy)	Przemiana cukru początkowego w %
NH_3 0,054	0,5	10	10,12	12,8	79,06
$(NH_4)_2CO_3$ 0,054	5,0	10	10,68	12,8	83,44
5,0	0,5	10	10,15	13,5	75,19
	5,0	10	10,20	13,5	75,56

Poza nieco wyższą wydajnością kwasu przy zastosowaniu gazowego amoniaku, nie stwierdzono różnicy w cechach morfologicznych i fizjologicznych pleśniaków przy stosowaniu obu źródeł azotu.

Przykład II. Przeprowadzono dwie fermentacje w zbiornikach zawierających takie składniki, jak podano w przykładzie 1. Do środowisk fermentacyjnych wprowadzono 0,065% amoniaku gazowego z taką ilością powietrza

aby wystarczyło ono do dokładnego wymieszania roztworu i amoniaku. Następnie za pomocą technicznego kwasu solnego doprowadzono środowisko do pH = 2,6, wysterylizowano parę w kadziach fermentacyjnych a po ochłodzeniu zaszczerpiono 15 g zarodników kropidlaka czarnego. Roztwory fermentacyjne dotle-

niano i mieszano za pomocą suchego powietrza, doprowadzonego w ilościach 5,2 l/sek. Wszystkie inne warunki fermentacji były takie, jakie opisano w patencie Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 2476159. Pod koniec 9 i 10 dnia fermentacji ustalono analitycznie wyniki zawarte w tabeli II.

Tabela II.

Źródło azotu % N	Zn ⁺⁺ części na milion	Czas fermentacji w dniach	Kwasowość w %	Początkowa zawartość cukru (jako dekstrozy) w %	Przemiana cukru początkowego w %
NH ₃ 0,054	0,5	9	10,5	13,00	80,77
(NH ₄) ₂ CO ₃ 0,054	0,5	10	10,35	12,45	83,13

Morfologia komórek pleśniaków i wydajność kwasu były podobne do zaobserwowanych w przykładzie 1.

Przykład III. Przeprowadzono dwie fermentacje w takim środowisku, jako podano w przykładzie I i II, z tą różnicą, że użyto 22 części Zn⁺⁺ na milion, zamiast 0,5 albo 5,0 części na milion. Odważone ilości gazowego amoniaku dodawano do zdemineralizowanego roztworu cukru użytego do przygotowania śro-

dowisk. Następnie środowisko doprowadzono za pomocą kwasu solnego do pH = 2,6 sterylizowano przez godzinę w kadziach fermentacyjnych w temperaturze 71°C a po ochłodzeniu do około 33°C zaszczerpiono zarodnikami kropidlaka czarnego. Roztwory fermentacyjne dotleniano i mieszano suchym powietrzem. Przez cały czas trwania fermentacji utrzymywano temperaturę stałą 33°C. Otrzymano wyniki podane w tabeli III.

Tabela III.

Źródło azotu % N	Zn ⁺⁺ części na milion	Czas fermentacji w dniach	Kwasowość w %	Początkowa zawartość cukru (jako dekstrozy) w %	Przemiana cukru początkowego w %
NH ₃ 0,054	22	11	12,06	14,28	84,45
(NH ₄) ₂ CO ₃ 0,054	22	11	12,40	14,67	84,53

Fermentacja przebiegała jak w przykładzie I i II i nie stwierdzono żadnych różnic morfologicznych czy fizjologicznych w pleśniakach przy zastąpieniu węglanu amonowego gazowym amoniakiem.

Sposób według wynalazku nadaje się szczególnie do prowadzenia dolnej fermentacji na skalę techniczną, w przypadku gdy środowisko stanowią niezupełnie oczyszczone przez rafinację węglowodany, jak inwertowana melasa, krochmal kukurydziany, produkty hydrolizy, melasa buraczana, melasa cytrusowa itp. Zazwyczaj środowiska te wykazują zmniejszoną zawartość składników mineralnych co osiąga

się przez zetknięcie się ich z wymienniczkami kationów, pracującym w cyklu wodorowym, co opisano np. w patentach Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej nr 2492667 i nr 249673.

Sposób według wynalazku umożliwia zarówno doprowadzenie pH do właściwej wielkości, jak i dodawanie w sposób prosty najmniejszej ilości pożywki azotowej, przy wykorzystaniu gazowego amoniaku.

Poniższe przykłady ilustrują tok procesów fermentacji sposobem według wynalazku, przy zastosowaniu węglowodanu w postaci syropu kubańskiego o następujących właściwościach:

całkowita zawartość części stałych	80,9 — 82,1‰
całkowita zawartość popiołu (jako siarczany)	1,5 — 2,2‰
równoważnik dekstrozy (stałej)	90,5 — 93,9‰
pH	5,3 — 5,6‰
żelazo	4,6 — 45,0 części na milion.

Syrop ten oczyszczony w sposób zwykle przyjęty, polegający na dodawaniu do niego stechiometrycznych ilości wodorotlenku wapniowego i kwasu fosforowego, mieszanemu w temperaturze 82°C przez wymagany okres czasu i następnie odsączeniu wytrąconego osadu.

W każdym z procesów, podanych niżej w przykładach IV — IX, syrop oczyszczony rozcieńczano wodą (1:3 do 1:4) i nastawiano na pH = 7,0 — 7,5. Następnie przepuszczano roztwór przez wymienniczkę jonów pracującą w cyklu wodorowym, np. sulfonowaną żywicę polistyrenową, znaną w handlu pod nazwą Dowex — 50. Po tej operacji pH roztworu wynosiło około 1,5 — 1,7.

We wszystkich przypadkach fermentację przeprowadzano w kadziach fermentacyjnych, przy czym środowisko fermentacyjne zawierało:

KH ₂ PO ₄	0,014‰
MgSO ₄	0,10‰
CuSO ₄	0,1 — 0,5‰ (AsCu ⁺⁺)
FeSO ₄	0,1 — 0,5‰ (AsFe ⁺⁺)
CaCl ₂	150 części na milion (AsCa)

Po napełnieniu kadzi mieszano jej zawartość w celu całkowitego rozprowadzenia chemicznej i wprowadzano gazowy amoniak aż do osiągnięcia końcowego pH = 2,81 — 2,89. Zawartość azotu wynosiła 0,040 do 0,070‰ wagowych. Następnie przeprowadzano fermentację za pomocą kropidłaka czarnego w warunkach opisanych w patentach Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 2476159 i nr 2492667 w temperaturze 30 — 32°C.

Otrzymano następujące wyniki:

	% cukru w środowisku fermentacyjnym	Wartość pH nastawione na	Wydaźność kwasu cytrynowego
Przykład IV	17,14	2,83	80,4
Przykład V	20,02	2,87	74,3
Przykład VI	15,36	2,81	79,3
Przykład VII	16,16	2,81	77,1
Przykład VIII	18,00	2,85	77,4
Przykład IX	19,53	2,89	73,1

Najważniejszą zaletą wynikającą ze stosowania gazowego amoniaku jest to, że gazowy amoniak jest trwalszy od węglanu amonowego. Jak wyżej wspomniano węglan amonowy rozkłada się podczas składowania z wydzieleniem amoniaku, co powoduje znaczne różnice zawartości azotu w poszczególnych partiach. Odważone ilości stałego węglanu amonowego nie dają dokładnych danych o ilości pożywki azotowej, którą wprowadza się do naczynia fermentacyjnego, podczas gdy przy stosowaniu aparatury zamkniętej, przy użyciu gazu, można wprowadzić do środowiska ściśle odważone ilości gazowego amoniaku. Poza tym w przypadku stosowania gazowego amoniaku unika się zwłoki, jaka występuje podczas rozpuszczania stałego węglanu amonowego. Wymienione okoliczności sprawiają, że ilości amoniaku można dokładnie regulować, co ma zasadnicze znaczenie dla reakcji, a poza tym pozwala na proste i dokładne regulowanie właściwego pH, co z kolei przyczynia się do otrzymania bardzo wysokiej wydajności kwasu cytrynowego. Stosując do częściowego zobojętniania kwaśnego środowiska gazowy amoniak, unika się również niepożądanego pienienia się środowiska, co ma miejsce w przypadku stosowania węglanu amonowego na skutek wydzielania się dwutlenku węgla. Dalszą zaletą występującą przy stosowaniu gazowego amoniaku jest jego niższa cena (obecna cena rynkowa amoniaku wynosi tylko 13% ceny węglanu amonowego).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania kwasu cytrynowego drogą dolnej fermentacji roślinnej wzbogaconego środowiska węglowodanowego, w którym roztwór niezupełnie czystego węglowodanu poddaje się najpierw działaniu wymienniczką kationową, pracującą w cyklu wodorowym, a następnie po dodaniu

soli odżywczych fermentacji, za pomocą szczepu kropidlaka czarnego (*Aspergillus niger*) wytwarzającego kwas cytrynowy, znamienny tym, że do środowiska węglowodanowego, po jego przejściu przez wymiennik kationów, a przed fermentacją, dodaje się gazowego amoniaku.

Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że gazowy amoniak wprowadza się w ilości dostatecznej dla potrzeb kropidlaka czarne-

go oraz dla podwyższenia wartości pH środowiska przed fermentacją.

3. Sposób według zastrz. 2, znamienny tym, że gazowy amoniak przed wprowadzeniem do środowiska rozcieńcza się powietrzem.

Miles Laboratories, INC

Zastępca: inż. Józef Felkner

rzecznik patentowy