



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

⑳ Numer zgłoszenia: 281534

㉑ Data zgłoszenia: 20.09.1989

㉒ IntCl<sup>5</sup>:  
C12P 7/48  
C12N 9/62  
C12R 1:685

CZYTELNI  
OGÓLNA

⑤④ Sposób jednoczesnego otrzymywania preparatu enzymatycznego i kwasu cytrynowego

④③ Zgłoszenie ogłoszono:  
25.03.1991 BUP 06/91

④⑤ O udzieleniu patentu ogłoszono:  
31.01.1994 WUP 01/94

⑦③ Uprawniony z patentu:  
Politechnika Śląska, Gliwice, PL  
Instytut Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowe-  
go, Warszawa, PL

⑦② Twórcy wynalazku:  
Jolanta Bohdziewicz, Gliwice, PL  
Michał Bodzek, Gliwice, PL

- ⑤⑦ 1. Sposób jednoczesnego otrzymywania preparatu enzymatycznego i kwasu cytrynowego z hodowli *Aspergillus niger* na polimerowych membranach półprzepuszczalnych, metodą ultrafiltracji, **znamienny tym**, że płyn pofermentacyjny poddaje się procesowi refiltracji ciągłej z rozcieńczeniem, a otrzymany retentat zatęża się następnie metodą ultrafiltracji, którą prowadzi się do momentu uzyskania retantatu o objętości równej 30-70% objętości retentatu po refiltracji, korzystnie 50%, przy czym proces refiltracji i ultrafiltracji prowadzi się na membranach o tych samych właściwościach transportowo-seperacyjnych, charakteryzujących się przepuszczalnością na wodę niższą od wartości  $0,85 \times 10^{-10} \text{ m/s} \times \text{Pa}$ , o rozdzielczości granicznej w odniesieniu do białek 10 000 - 70 000, korzystnie 40 000 - 60 000, przy ciśnieniu transmembranowym 50 000 - 300 000 Pa, korzystnie 300 000 Pa, liniowej prędkości przepływu roztworu nad powierzchnią membrany 2-4 m/s, korzystnie 3,5 m/s w temperaturze 288-313 K, korzystnie 293-298 K.

# Sposób jednoczesnego otrzymywania preparatu enzymatycznego i kwasu cytrynowego

## Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób jednoczesnego otrzymywania preparatu enzymatycznego i kwasu cytrynowego z hodowli *Aspergillus niger* na polimerowych membranach półprzepuszczalnych, metodą ultrafiltracji, **znamienny tym**, że płyn pofermentacyjny poddaje się procesowi refiltracji ciągłej z rozcieńczeniem, a otrzymany retentat zatęża się następnie metodą ultrafiltracji, którą prowadzi się do momentu uzyskania retentatu o objętości równej 30-70% objętości retentatu po refiltracji, korzystnie 50%, przy czym proces refiltracji i ultrafiltracji prowadzi się na membranach o tych samych właściwościach transportowo-seperacyjnych, charakteryzujących się przepuszczalnością na wodę niższą od wartości  $0,85 \times 10^{-10} \text{ m/s} \times \text{Pa}$ , o rozdzielczości granicznej w odniesieniu do białek 10 000 - 70 000, korzystnie 40 000 - 60 000, przy ciśnieniu transmembranowym 50 000 - 300 000 Pa, korzystnie 300 000 Pa, liniowej prędkości przepływu roztworu nad powierzchnią membrany 2-4 m/s, korzystnie 3,5 m/s w temperaturze 288-313 K, korzystnie 293-298 K.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że refiltrację ciągłą prowadzi się przez ciągłe dodawanie wody z szybkością równą szybkości odbierania filtratu do momentu wypłukania kwasu cytrynowego w ilości wcześniej założonej.

\* \* \*

Przedmiotem wynalazku jest sposób jednoczesnego otrzymywania preparatu enzymatycznego i kwasu cytrynowego z płynu pofermentacyjnego z hodowli *Aspergillus niger* na polimerowych membranach półprzepuszczalnych metodą ultrafiltracji.

Kwas cytrynowy produkowany jest między innymi metodą powierzchniową na podłożu melasowym z wykorzystaniem grzybnia *Aspergillus niger*. Otrzymany w procesie płyn pofermentacyjny ma charakter typowo heterogeniczny w związku z czym, oprócz produktu głównego (kwas cytrynowy) zawiera w swoim składzie składniki w znacznym stopniu zróżnicowane pod względem ich mas cząsteczkowych i utrudniające proces strącania kwasu cytrynowego. Należą do nich liczne produkty przemian metabolicznych a także substancje mineralne, dodawane na wstępie cyklu produkcyjnego w celu poprawienia efektywności procesu fermentacji. Znajdują się tam również enzymy pektynolityczne, które wytwarzane przez szczep *Aspergillus niger* w przeważających ilościach wydzielane są do roztworu pofermentacyjnego.

Znany z polskiego opisu patentowego nr 131 813 sposób jednoczesnego otrzymywania preparatu enzymatycznego i kwasu cytrynowego z zastosowaniem procesu ultrafiltracji, polega na tym, że roztwór pofermentacyjny poddaje się bezpośrednio ultrafiltracyjnemu rozdzielaniu na dwie frakcje: retentat zawierający wielcząsteczkowe enzymy oraz filtrat, z którego następnie izoluje się kwas cytrynowy. Jednak w retentacie oprócz białek pektynolitycznych pozostaje znaczna ilość substancji małychcząsteczkowych, a wśród nich również kwas cytrynowy co prowadzi do zwiększenia jego strat w całym procesie technologicznym. Również ze względu za duże obciążenie płynu pofermentacyjnego, prowadzony proces ultrafiltracji jest mało efektywny ze względu na niską wartość objętościowego strumienia permeatu.

Sposób według wynalazku charakteryzuje się tym, że płyn pofermentacyjny poddaje się procesowi refiltracji ciągłej z rozcieńczeniem, a otrzymany retentat zatęża się następnie metodą ultrafiltracji, którą prowadzi się do momentu uzyskania retentatu o objętości równej 30-70% objętości retentatu po refiltracji, korzystnie 50%, przy czym proces refiltracji i ultrafiltracji prowadzi się na membranach o tych samych właściwościach transportowo-seperacyjnych, charakteryzujących się przepuszczalnością na wodę niższą od wartości  $0,85 \times 10^{-10} \text{ m/s} \times \text{Pa}$ , o rozdzielczości granicznej w odniesieniu do białek 10 000-70 000, korzystnie 40 000-60 000, przy ciśnieniu trans-

membranowym 50 000-300 000 Pa, korzystnie 300 000 Pa, liniowej prędkości przepływu roztworu nad powierzchnią membrany 2-4 m/s, korzystnie 3,5 m/s w temperaturze 288-313 K, korzystnie 293-298 K.

Refiltrację ciągłą prowadzi się przez ciągłe dodawanie wody z szybkością równą szybkości odbierania filtratu do momentu wypłukania kwasu cytrynowego w ilości wcześniej założonej.

Zaletą sposobu według wynalazku jest prawie całkowite odzyskanie kwasu cytrynowego z dodatkowym wyizolowaniem kompleksu białek pektynolitycznych z płynu pofermentacyjnego po biosyntezie kwasu cytrynowego. Wyizolowany tą metodą pektynolityczny preparat enzymatyczny charakteryzuje się wysoką czystością i jest maksymalnie wzbogacony w białka aktywne.

Przykład : 60 dm<sup>3</sup> płynu pofermentacyjnego po powierzchniowej fermentacji cytrynowej o aktywności ogólnej 5830° PM, zawartości kwasu cytrynowego 100,5 kg/m<sup>3</sup> i suchej masie 255,1 kg/m<sup>3</sup> poddano procesowi ultrafiltracji w obiegu zamkniętym. Zastosowano polimerowe membrany ultrafiltracyjne, których przepuszczalność za wodę wynosiła  $0,83 \times 10^{-10}$  m/s  $\times$  Pa a rozdzielczość graniczna w odniesieniu do białek 50 000. Proces prowadzono przy ciśnieniu transmembranowym 300 000 Pa, liniowej przepływu 3,5 m/s w temperaturze 298 K do momentu uzyskania retentatu o objętości 50% objętości nadawy. Otrzymany średni objętościowy strumień permeatu był stosunkowo mały i wynosił  $1,9 \times 10^{-5}$  m/s. Prawie cała ilość białek aktywnych pozostała w retencji (87,2%) jednak zatrzymany w nim został w znacznej ilości kwas cytrynowy (62,3%) i sucha masa (56,1%).

Procesowi refiltracji z rozcieńczeniem (współczynnik rozcieńczenia równy 3) poddano 20 dm<sup>3</sup> płynu pofermentacyjnego o aktywności ogólnej 5651° MP, zawartości kwasu cytrynowego 99,8 kg/m<sup>3</sup> i suchej masie 261 kg/m<sup>3</sup>. Proces prowadzono przy użyciu tych samych membran, stosując te same parametry procesowe. Wskutek wypłukiwania wodą z brzezki pofermentacyjnej substancji rozpuszczonych do refiltratu przeszło 93,4% suchej masy oraz prawie cały kwas cytrynowy (95,1%), zmniejszając tym samym jego straty w procesie technologicznym. W rezultacie natomiast pozostało 95% białek pektynolitycznych. Objętościowy strumień permeatu był wyższy i wynosił  $3,6 \times 10^{-6}$  m/s.

**162 954**

Departament Wydawnictw UP RP Nakład 90 egz.  
Cena 10 000 zł