

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

УДК 661.183.9+547.477.1

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА СОЛЕЙ ЛИМОННОЙ И ИЗОЛИМОННОЙ КИСЛОТ ИЗ ФЕРМЕНТАЦИОННОГО РАСТВОРА

А. Е. АГАДЖАНЫН

Научно-исследовательский институт «Биотехнология», Ереван

Поступило 21 III 2005

Изучен процесс обессоливания и обесцвечивания раствора смеси солей лимонной кислоты путем последовательного пропускания пермеата цитратного ферментационного раствора через три ионообменные колонки, заполненные сульфокатионитом в Na^+ - форме, среднеосновным анионитом в цитратной форме и ионосорбентом в Cl форме. Определены оптимальные параметры ионитового способа обессоливания и обесцвечивания цитратного пермеата. Разработан эффективный способ регенерации анионита, позволяющий возврат основного количества сорбированного на нем цитрат-иона в технологический цикл. Определены технологические параметры выделения и очистки цитрата натрия из обессоленного и обесцвеченного пермеата. Разработан метод выделения и очистки монокальевой соли изолимонной кислоты из цитратного маточника. Разработанный способ позволяет в укороченном цикле с минимальным расходом щелочи и большой удельной производительностью ионообменных смол получать высокоочищенные соли лимонной кислоты.

Рис. 2, библи. ссылок 18.

Соли лимонной кислоты широко используются в пищевой, фармацевтической, химической промышленности и т.д. [1-5]. Изолимонная кислота и ее соли используются в медицине, биохимических исследованиях и т.д. [6].

Обычно цитраты щелочных металлов получают путем взаимодействия лимонной кислоты с соответствующей щелочью [7]. Известно, что лимонная кислота из ферментационного раствора выделяется путем ее осаждения известковым молоком с последующим растворением цитрата кальция серной кислотой, отделением сульфата кальция из раствора и получением лимонной кислоты из фильтрата обесцвечиванием, обессоливанием, выпаркой,

кристаллизацией и сушкой. Таким образом, получение цитратов вышеуказанным способом является многостадийным, трудоемким и дорогим.

В литературе приводятся и другие способы получения цитратов щелочных металлов [8,9].

Нами разработан способ получения цитрата натрия из ферментационного раствора, минуя стадию выделения лимонной кислоты [10-11].

Целью настоящей работы была оптимизация отдельных стадий выделения цитрата натрия из ферментационного раствора и разработка способа выделения соли изолимонной кислоты из цитратного маточника.

Условия эксперимента

Обессоливание и обесцвечивание цитратного пермеата (рН 4,6), состоящего из эквимольной смеси одно- и двухзамещенных солей цитрата натрия, осуществляли путем последовательного пропускания пермеата цитратного ферментационного раствора по направлению снизу вверх через три ионообменные колонки, заполненные сульфокатионитом КУ-2х8 в Na^+ -форме, анионитом ЭДЭ-10П в цитратной форме и ионсорбентом ИА-1р в Cl^- форме. Скорость подачи раствора регулировали перистальтическим насосом «Masterflex» (США). Ионообменные колонки имели следующие размеры – сечение 7 см², высота 40 см. Пермеат цитратного раствора получали пропусканием фугата ферментационного раствора через капроновую мембрану с размером пор 0,1 мкм марки МИФИЛ (Республика Беларусь). Регенерацию смолы и их перевод в вышеуказанные формы осуществляли известным способом [12]. Концентрацию лимонной кислоты и ее солей определяли спектрофотометрическим методом, основанным на измерении оптической плотности (ОП) пентабромацетона, получаемого из лимонной кислоты путем ее окисления и бромирования. Измерение ОП хлороформного экстракта пентабромацетона проводили на спектрофотометре “Perkin – Elmer 550 S” UV-VIS (США) при длине волны 245 нм [13]. Содержание лимонной кислоты и ее солей определяли также комплексометрическим титрованием [14]. Изолимонную кислоту определяли энзиматическим методом [15]. Содержание сухих веществ (СВ) в растворе определяли рефрактометрическим методом на рефрактометре “RL-3” (Польша), катионитов – атомно-абсорбционным методом на приборе “AAS-1” (Германия). Цветность раствора определяли измерением оптической плотности раствора по отношению к дистиллированной воде при длине волны 440 нм. Содержание анионов (Cl^- , SO_4^{2-}) в цитратном растворе определяли согласно методу [16]. Вакуум-упаривание цитратных растворов проводили при остаточном давлении 0,08–0,13 МПа и температуре 55–60°C.

Приведенные в работе результаты усреднены по данным трех опытов.

Результаты и их обсуждение

Ферментационный раствор соли лимонной кислоты, полученный культивированием штамма дрожжей *Yarrowia lipolytica* в питательной среде, содержит 75-80 г/л цитрата натрия [9]; солевой состав ферментационного раствора, без учета в нем иона натрия, по катиону составляет 0,037 г-экв/л.

Для эффективного осуществления сорбционного способа обессоливания цитратного раствора необходимо выяснить формы сорбируемых ионов в пермеате. В цитратном ферментационном растворе (рН 4,6) остальные металлы, за исключением кальция, в основном находятся в катионной форме (Na^+ , K^+ , Mg^{2+}). Так как при вышеуказанном значении рН в пермеате кальций находится в CaHCit форме [17], на стадии обессоливания для очистки раствора от него необходимо соединение перевести в заряженную форму. В зависимости от рН среды кальций в растворе лимонной кислоты находится в CaH_2Cit^+ (рН 1(3), CaHCit (рН 3,5±6,5) или CaCit^- (рН=7±10) формах [17]. Перевод соединения CaHCit в катионную форму можно осуществлять либо подкислением пермеата цитрата натрия лимонной кислотой до рН 2,5, либо на последнем этапе биосинтеза лимонной кислоты путем регулирования щелочной подтитровкой ферментационного раствора.

Обессоливание подтитрованной лимонной кислотой до рН=2,5 пермеата осуществляли фронтальным методом по схеме катионит-анионит-ионосорбент. Количество смолы, загружаемой в каждую колонку, определяли исходя из общего количества катионов, анионов и окрашенных компонентов в пермеате, а также обменной емкости выбранных ионообменных смол. Концентрация цитрат-иона и содержание СВ в выходящем из ионосорбентовой колонки растворе в зависимости от объема пропущенного через один объем смолы раствора на стадии обессоливания и обесцвечивания приведены на рис. 1.

Из обменной емкости катионита, минерализованности цитратного пермеата и из полученных данных следует, что на стадии обессоливания ~85% присутствующего в катионите иона натрия обменивается ионами примесей пермеата (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+). В обессоленном и обесцвеченном растворе цитрата натрия содержание вышеуказанных металлов следовое. Результаты анализа анионов (Cl^- , SO_4^{2-}) в нем показали, что на этой стадии удастся очистить пермеат от вышеуказанных ионов.

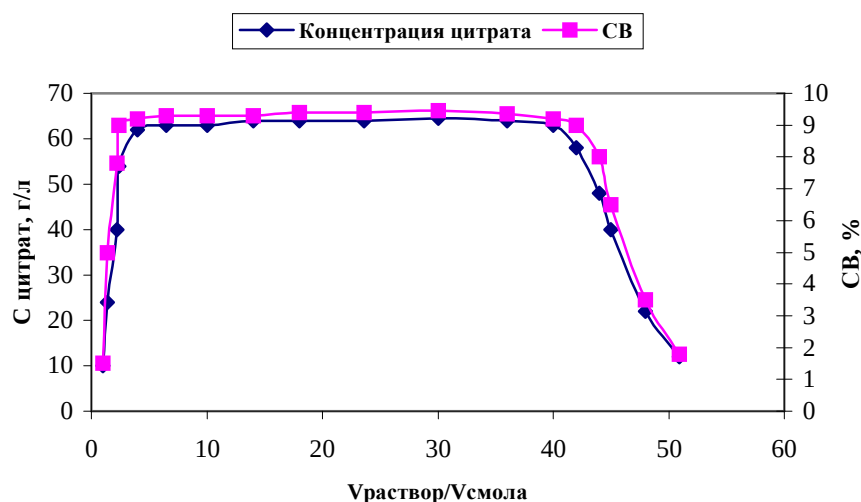


Рис. 1. Изменение СВ и концентрации цитрат-иона в растворе в процессе обесцвечивания и обессоливания пермеата.

Что касается работы третьей обесцвечивающей колонки, то на ионосорбенте ИА-1р происходит поглощение основного количества окрашенных компонентов пермеата. В обессоленном и обесцвеченном растворе цитрата натрия остается лишь опалесценция, имеющая молочный цвет, освободиться от которого можно как фильтрацией раствора через подушку из активного осветляющего угля марки “ОУ-В” толщиной 0,5 см, так и путем ультрафильтрации цитратного раствора через капроновую мембрану с размером пор 0,01 мкм.

Как видно из рис. 1, на стадии обессоливания и обесцвечивания устанавливается стационарный фронт обмена между примесями пермеата и противоионами смол, т. к. изменения величины СВ в процессе не происходит. Лишь в конце процесса во время водной промывки смол СВ раствора резко начинает снижаться. Из полученных данных следует, что при обессоливании и обесцвечивании пермеата через один объем каждой смолы можно пропускать до 42 объемов раствора. При этом объем смолы во всех колонках одинаковый.

После завершения пропускания цитратного раствора колонки с той же последовательностью промывали обессоленной водой до снижения концентрации цитрат иона в выходящей из третьей колонки жидкости до 1,5-2,0 г/л. Опыты показали, что если смолы в катионитовой и ионосорбентовой колонках после водной промывки можно подвергнуть регенерации (т. к. на них не происходит сорбция целевого компонента), регенерация анионита в такой форме может привести к большой потере цитрата. Поэтому обычно применяют доработку анионита путем подключения к другой колонке [17]. Процесс элюции цитрат-иона нами проведен следующим образом: через слой анионита с постоянной линейной скоростью (0,15 м/ч) пропускали 0,5 л

раствор гидроокиси натрия и в собранных фракциях определяли рН, СВ и концентрацию цитрат и неорганических (Cl^- , SO_4^{2-}) анионов (рис. 2).

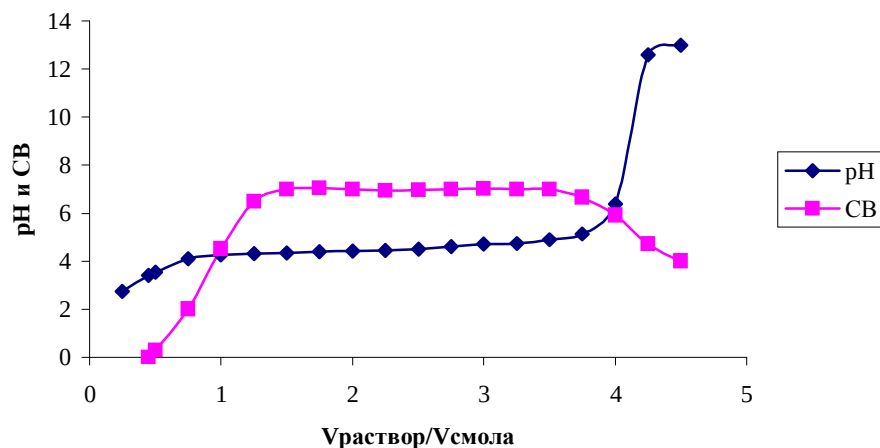


Рис. 2. Изменение значения рН и СВ в выходящем из смолы растворе в процессе элюирования цитрат-иона.

Как видно из полученных данных, если в диапазоне объема элюата 3,75-4,5 на один объем смолы наблюдается крутой подъем кривой рН, то в диапазоне 1÷3,75 на один объем смолы изменение величины рН элюата незначительно. Крутой подъем величины рН выходящего из смолы раствора свидетельствует о завершении процесса перехода смолы из солевой формы в гидроксильную. При элюции цитрата в диапазоне $1,35 \pm 3,75$ объема на один объем смолы раствора устанавливается стационарный фронт десорбции и среднее значение СВ элюата составляет 7%. Дальнейшее увеличение объема элюата приводит к резкому спаду значения СВ в элюате.

В собранном до 3,75 объема элюате Cl^- и SO_4^{2-} ионы отсутствуют и он присоединяется к основному раствору цитрата натрия. Сорбированные неорганические анионы и остаточный цитрат элюируется с анионита при величине рН выходящего из смолы раствора больше 6,5. Из цитратсодержащих солевых элюатов можно получить кристаллы цитрата натрия для технических нужд.

Таким образом, при щелочной обработке анионита, помимо регенерации смолы с переводом ее из солевой формы в гидроксильную, удастся получить основное количество $\sim(85\%)$ сорбированного на смоле цитрата в очищенном от неорганических анионов виде.

Собранные фракции обессоленного и обесцвеченного раствора цитрата натрия объединяли и рН раствора подтитровкой 40% раствором едкого натра доводили до 8,3. Далее подтитрованный раствор трехзамещенной натриевой соли лимонной кислоты подвергали вакуум-упариванию до появления первых

кристаллов в растворе (до концентрации цитрата натрия в растворе (530 г/л) и упаренный раствор переводили в кристаллизатор; перемешивая в течение 1 ч, охлаждали до 14-15°C и выдерживали при этой температуре в течение 4 ч. Выпавшие из раствора кристаллы отделяли фильтрацией. Кристаллы высушивали при 45-47°C до постоянного веса, а маточный раствор вновь упаривали до появления кристаллов. Аналогично первой ступени кристаллизации выделяли вторую порцию кристаллов цитрата натрия. После сушки кристаллы объединяли.

При биосинтезе лимонной кислоты с использованием вышеуказанного штамма-продуцента в ферментационном растворе накапливается также изолимонная кислота до ~10% от общего количества лимонной кислоты [10]. Так как изолимонная кислота и ее натриевая соль не кристаллизуются, они в основном накапливаются в цитратном маточнике. Опыты показали, что в результате захвата части маточника содержание натриевой соли изолимонной кислоты в выделенных кристаллах цитрата натрия доходит до 1,5%. Очистку кристаллов цитрата натрия от изоцитрата проводили перекристаллизацией из воды известным способом. После фильтрации отжатые кристаллы промывали охлажденным (8-10°C) 96% этанолом (0,5 объем на объем кристаллов) и высушивали. В результате получены двухводные кристаллы цитрата натрия с содержанием основного вещества не менее 99,7(0,3%.

После двухступенчатой кристаллизации соотношение цитрат-иона и изоцитрата в маточном растворе составляет примерно 1:1,5. Для получения монокалиевой соли изолимонной кислоты вначале полученный маточный раствор подвергали обессоливанию путем пропускания его через КУ-2х8 в Н⁺-форме, затем обессоленный раствор упаривали до концентрации изолимонной кислоты, равной ~400 г/л, после чего рН упаренного раствора с помощью 40% раствора едкого калия доводили до величины 3,5-3,7, не допуская повышения температуры выше 30°C. При перемешивании монокалиевую соль изолимонной кислоты кристаллизовали сначала при комнатной температуре в течение 5-6 ч, а затем при температуре 4-6°C в течение 20 ч. [18]. Выпавшие кристаллы отфильтровывали, отжимали и промывали равным объемом 50%-ого охлажденного этанола (2-4°C), а затем охлажденной водой (3-5°C) и снова 96% этанолом (5-7°C). Кристаллы сушили при комнатной температуре до постоянного веса. После одной перекристаллизации из воды получали чистые кристаллы монокалиевой соли изолимонной кислоты. Содержание основного вещества в кристаллах 99,4%. Удельное вращение полученной соли $[\alpha]_D^{25} = +20,1$ (0,1 м раствор в воде) соответствует литературным данным [18].

Полученный продукт – монокалиевая соль изолимонной кислоты является ценным препаратом, а за счет его выделения снижается себестоимость основного продукта. Выход натрия лимоннокислого трехзамещенного с двумя молекулами воды с учетом возврата маточного раствора в технологический цикл составляет 85,7 %, выход монокалиевой соли изолимонной кислоты из цитратного маточника 58%.

Разработанный метод позволяет в укороченном цикле, минуя стадии выделения лимонной кислоты из пермеата, с минимальным расходом щелочи и с большой удельной производительностью ионообменных смол получить высокоочищенные разноразмещенные соли лимонной кислоты.

ՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ ԼՈՒԾՈՒՅԹԻՑ ԿԻՏՐՈՆԱԹՎԻ ԵՎ ԻՋՈԿԻՏՐՈՆԱԹՎԻ ԱՂԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԵՎ ՄԱՔՐՈՒՄԸ

Ա. Ե. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է կիտրոնաթթվի աղերի լուծույթի աղազրկման պրոցեսը ֆերմենտացիոն լուծույթի Na^+ -ձևի սուլֆոկատիոնիտով, ցիտրատ-ձևի միջին հիմնային անիոնիտով և Cl^- -ձևի իոնոսորբենտով հաջորդական լիցքավորված երեք իոնափոխանակային աշտարակներով պերմեատի անցաթողումով: Որոշվել են իոնափոխանակման եղանակով ցիտրատային պերմեատի աղազրկման և գունազրկման պրոցեսի օպտիմալ ցուցանիշները: Մշակվել է անիոնիտի ռեգեներացիայի էֆեկտիվ եղանակ, որը հնարավորություն է տալիս խեղդի վրա կլանված ցիտրատի հիմնական մասը վերադարձնել տեխնոլոգիական ցիկլ: Որոշվել են աղազրկված և գունազրկված պերմեատից նատրիումի ցիտրատի անջատման և մաքրման տեխնոլոգիական ցուցանիշները: Մշակվել է ցիտրատային մայր լուծույթից իզոկիտրոնաթթվի մոնոկալիումական աղի անջատման և մաքրման եղանակ: Մշակված եղանակը հնարավորություն է տալիս հիմքի մինիմալ ծախսով և իոնափոխանակային խեղդերի բարձր տեսակարար արտադրողականությամբ ստանալ նատրիումի ցիտրատի և կալիումի իզոցիտրատի մաքուր բյուրեղներ:

ISOLATION OF SALTS OF CITRIC AND ISOCITRIC ACIDS FROM THE ENZYME SOLUTION

A. Ye. AGHAJANYAN

The process of desalting and discoloring of the solution of citric acid salts mixture through consistent gating of citrate enzyme solution permeate through three ion-exchange columns filled with sulfocationite in Na^+ form, average basic anionite in citric form and ion-sorbent in Cl^- form has been studied. Optimal parameters of ionite method of desalting and discoloring of citric permeate have been determined. An effective method of regeneration of anionite has been developed which provides the return of the basic amount of the citrate ion sorbed on it into the technological cycle. Technological parameters of isolation and purification of sodium citrate from desalted and discolored permeate have been determined. A method of isolation and purification of monopotassium salt of isocitric acid from citrate mother solution has been developed. The developed method allows to obtain highly purified salts of citric acid in a shortened cycle with minimal consumption of alkali and high specific productivity of ion-exchange resins.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Карклиньш Р.Я., Лиепиньш Г.К.* Микробный биосинтез лимонной кислоты. Рига, Зинатне, 1993, с. 580.
- [2] Пат. №5505979 (1997) США // РЖХ 1998, 18 Р 1196 П.
- [3] Пат №4895980 (1990) США // РЖХ 1991, 14 О 96П.
- [4] Заявка №4328577 (1996) ФРГ // РЖХ 1997, 14 О 250 П.
- [5] Пат №4965013 (1990) США // РЖХ 1991, 20Р 2038 П.
- [6] Пат №5643963 (1998) США // РЖХ 1999, 7Р 260 П.
- [7] Пат №96439 (1990) СРР // РЖХ 1990, 5Н39П.
- [8] ЕП №324210 А (1988) // РЖХ 1989, 15О 83П.
- [9] *Раминя Л.О., Озолинъ М. Я.* // В сб. "Биосинтез оксикислот и кетокислот микроорганизмами". Р., Зинатне, 1984, с. 35.
- [10] *Арзуманов Е.Н., Агаджанян А.Е.* Пат России N 2090611 (1996).
- [11] *Агаджанян А.Е.* Пат Республики Армения №571 А2 (1996) // РР Մրդյունաբերության նեփախանություն, 1999, №2, 50.
- [12] *Волжинский А.И., Константинов В.А.* Регенерация ионитов. Л., Химия, 1990, с. 238.
- [13] *Жаболевская Н.А., Агеев Л.М.* // Хлебопекарная и кондитерская промышленность, 1968, №5, с. 22.
- [14] *Ламба Я.К., Крамзака И.Р., Карклинь Р.Я., Раминя Л.О.* // Изв. АН Латвийской ССР, 1988, №2, с. 77.
- [15] *Methods of enzymatic food analysis*, Boehzinger Mannheim, 1984, p. 13.
- [16] Практикум по физико-химическим методам анализа // под ред. Петрухина О.М., М., Химия, 1987, с. 91.
- [17] Ионообменные методы очистки веществ // под ред. Чикина Г.А., Мягкого О.Н., Воронеж, ВГУ, 1984, с. 283.
- [18] *Ленских Г.В., Романова И.Б., Шишканова Н.В.* А. С. СССР №969036 А (1981), ДСП.