

## Výroba kyseliny citronové

663.15 : 547.476.3

J. TOMÁŠEK

*Tímto článkem, v němž jsou soustředěny různé poznatky o výrobě kyseliny citronové, zahajujeme serií článků o výrobě kyseliny citronové u nás.*

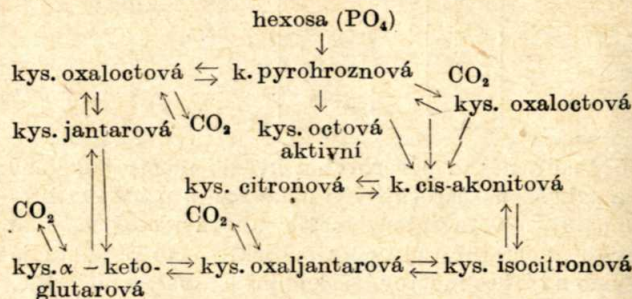
Od r. 1893, kdy C. Wehmer jako první upozornil na přítomnost kyseliny citronové v cukerných substrátech, a kdy oznámil dosažení 50 %ních výtěžků, počítáno na výchozí cukr, pomocí jím popsáných *Penicillii* jako *Citromyces pfefferianus* a *Citromyces glaber*, prodělalo toto kvašení do dnešní doby dlouhý vývoj.

Ve smyslu posledních prací, mechanismus citronového kvašení na počátku není nepodobný glykolytickému schematu kvašení lihového: šestiuhlíkový řetězec rozpadne se na dvě části, z nichž každá dá vzniknout jedné molekule kyseliny pyrohroznové, z nichž jedna poskytne oxydační dekarboxylací kyselinu octovou a  $\text{CO}_2$ . Tato kyselina octová, o níž je odůvodněno se domnívat, že nikdy neexistuje ve volném stavu, může se vázat na kyselinu oxaloctovou, pocházející ze synthesy: pyrohrozn +  $\text{CO}_2$ . Produktem synthesy: kyselina octová + kys. oxaloctová je v určitých případech přímo kys. citronová, avšak použije-li se určitých citronových plísni, považuje se za pravděpodobnější, že kys. citronová vzniká hydratací kyseliny cis-akonitové. Jiný způsob synthesy kys. oxaloctové jde přes kys. jantarovou, jež je produktem přímé kopulace dvou molekul kys. octové. I v tomto případě se zjišťuje, že kys. citronová vzniká při synthese: kyselina octová + oxaloctová.

Kyselina šfavelová vzniká při citronovém kvašení, buď oxidyativním štěpením molekuly citrátu, nebo oxidyativním štěpením oxalacetátu, nebo přímou oxidačí kys. octové.

Následující schema podává nejen schematický

obraz metabolismu kys. citronové u *Aspergilla niger*, nýbrž i vysvětluje, proč vývoj  $\text{CO}_2$  je tím menší, čím vyšší je výtěžek kyseliny citronové.



(U kmenů s nízkou produkcí kys. citronové vzniklá kys. se rozkládá hned jak vzniká přes kys. isocitronovou, oxaljantarovou,  $\alpha$ -ketoglutarovou, jantarovou: tímto způsobem dojde se naspět ke kyselině oxalocetové schopné vytvořit jednu molekulu citrátu a jednu molekulu acetaátu. Jedna molekula kyseliny octové při tom zaniká za vzniku  $H_2O$  a  $CO_2$ .)

### Kvašení povrchové

Obecným pracovním postupem je ten, že na povrchu substrátu t. zv. „růstového“ vypěstuje se za 5—10 dnů souvislý mycel, načež se „růstový“ substrát nahradí vlastním substrátem, v němž plíseň přemění 50—80 % cukru v kyselinu citronovou. Počáteční koncentrace cukru v substrátu jest 15—20 procent. Během kvašení se v mnohdy substrát částečně neutralisuje vápenným mlékem nebo práškoviitou křídou. Další zpracování se děje přes citrát vá-



penatý, z něhož se rozkladem kys. sírovou uvolňuje vzniklá kys. citronová.

Jako příklad složení substrátu lze uvést substrát Karowův (1942).

Složení	Koncentrace v substrátu	
	A-růstovém	B-vlastním
Sacharosa (g/l)	150,0	150,0
Močovina (g/l)	1,0	0,5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (g/l)	0,5	0,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/l)	0,08	0,05
KCl (g/l)	0,15	0,15
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O (mg/l)	0,02	0,02
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (mg/l)	0,01	0,01

Zdrojem uhlíku mohou být všechny cukry včetně pentos, avšak výtěžky jsou různé: glukosa, maltoza, škrob, poskytují nižší výtěžky než sacharosa, fruktosa a inulin. Také invert poskytuje nižší výtěžky nežli sacharosa. Čerstvé řepné melasy se jeví daleko výhodnější než staré a třtinové melasy.

Nejvhodnějším zdrojem dusíku se jeví podle některých autorů dusík dusičnanový (dusičnan amonný nebo dusičnan močoviny).

Vliv minerálních solí je sice značný, avšak kolísá podle použitého kmene. Velmi důležitou zdá se rovnováha mezi koncentrací těžkých kovů, zvláště mezi obsahem železa a zinku.

Udržování přiměřeného pH během kvašení je neméně důležité. Nízké pH je příznivé vyšším výtěžkům a zmenšuje nebezpečí infekce, mimo to vzniklá kys. citronová je čistší a zabraňuje se vzniku kys. glukonové a snižuje se obsah kys. štavelové. K okyselení je výhodnější HCl, při čemž Cl-ionty zvyšují výtěžek. Přesto však většina autorů doporučuje v poslední době prostředí neutrální, obzvláště pro kvašení submersní. U selektovaných kmenů četní autoři doporučují pH 5,5–6,0.

#### Výtěžky

Při laboratorních pokusech, při nichž se pracuje se sacharosou, dosahuje se výtěžku až 90,7 %. S melasovým substrátem dosaženy výtěžky 70–80 procent jak při povrchovém, tak i submersním kvašení. Clutterbuck získal poloprovozně 87 % a někteří sovětské autoři (Butkěvič a spol. 1935 a Žuravskij 1951) až 100 %.

V průmyslovém měřítku výtěžky 60–70 % jak u způsobu povrchového, tak i submersního považují se za uspokojivé.

#### Kvašení submersní

Neobyčejný rozmach produkce kvasné kyseliny citronové ve všech průmyslových státech světa předpokládal by při povrchovém kvašení ohromných ploch vyjádřených v desítkách hektarů kvasné plochy. Tato zvýšená produkce byla však podmíněna dosažením průmyslově přijatelných výsledků kvašení submersního počínaje r. 1938.

#### Kultury používaných mikroorganismů

Podobně jako u kvašení povrchového je to především *Aspergillus niger*, avšak i jemnější příbuzný *Aspergillus wentii* nalezl použití jmenovitě v SSSR (G. I. Žuravskij 1951). Metody přípravy spor pro inoculum a jejich konzervace v jejich vztahu k vý-

těžku byly však shledány pro submersní kvašení osobitými. Teplota pro uchovávání spor shledána optimální od 0–5 °C, obsah manganu v substrátu příznivý, obsah zinku kolísá podle použité kultury.

#### Substrát

Složení substrátu pro submersní kvašení podobá se složení substrátu pro kvašení povrchové.

#### Substrát podle Shu a Johnsona (1948)

	Prostředí A (pro inoculum)	Prostředí B (provozní)
Sacharosa	140,0	140(1)
Agar	20,0	— (1)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0	2,5 (1)
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,25	0,25(1)
NH <sub>4</sub> · NO <sub>3</sub>	2,50	2,50(1)
HCl		pH: 3,8
Cu <sup>++</sup>	0,48	0,06(2)
Zn <sup>++</sup>	3,80	0,25(2)
Fe <sup>++</sup>	2,20	1,30(2)
Mn <sup>++</sup>	0–1,0	0–1,0(2)

(1) g v litru.

(2) mg v litru.

#### Substrát podle G. I. Žuravského (g v litru)

Močovina	1,00
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,60
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,50
KCl	0,075
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,01
MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,02
Sacharosa	150,0
HCl	do pH: 4,5–5,0

Množství inokulovaných spor je důležitým faktorem. Je třeba zakvasit takovým množstvím spor a větrat takovým množstvím vzduchu, aby v substrátu vznikly malé a jemně vyzrnné kolonie plísně. Vytvořili-li se v substrátu propletené slizovité souvislé mycelium, je nutno očekávat snížení výtěžku. Při přípravě zápar s prospěchem použity iontoměniče nebo filtrace přes aktivní uhlí nebo dekontinace pomocí ferrokyanidu draselného (0,5–0,8 g K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> · 3H<sub>2</sub>O na 1 litr). Přídavek 1 až 3 % methanolu zvyšuje výtěžek na melase na 70 %.

#### Větrání kvasící tekutiny

Obecně platí — čím lepší větrání, tím vyšší výtěžek. Ještě vyšší výtěžky dosaženy při větrání kyslíkem nebo kyslíkem bohatým vzduchem. Platí to však jen pro provozní rozměr, kdežto větrání kyslíkem při růstu mycelia výtěžek snižuje. Také kvašení pod tlakem CO<sub>2</sub> do jisté míry inhibuje tvorbu kyseliny citronové nikoli však tvorbu mycelia. Množství vzduchu k větrání potřebné pohybuje se kolem 1 objemu za minutu pro 1 objem kapaliny. Nedostatečné větrání podporuje tvorbu alkoholu (Karow, Waksman 1947).

#### Kvašení

Submersní kvašení probíhá takto: připraví se koncentrovaný cukerní roztok, jež po filtraci se přečerpá do sterilizačního oddělení, kde po přidání roztoku solí ze zvláštní nádrže a zředění se ve ste-



řilačních nádobách vysteriluje a spustí se horký samospádem do kvasných bubnů, v nichž se znovu přivede do varu. Nato se substrát chladí a po okyselení HCl, podle některých autorů na pH 4—5, podle jiných na pH 6, a inokuluje se sporami z inokulátoru nebo vyrostlou kulturou z předkvasné nádoby a větrá se sterilním vzduchem. Kromě promíchávání vzduchem používá se též mechanického míchání míchadlem s určitým počtem obrátek. Teplota při kvašení je 30—33 °C (někde též jen 28 °C). Teplota uváděného vzduchu se též reguluje předeřhřátím. Po skončení procesu, když vzrůst titrační kyselosti zkvašené zápary se zpomaluje,

spustí se zápara spolu s myceliem do další nádoby, kde se mycelium povařením umrtví a oddělí na kalolisu a vylisovaný mycel se ještě promyje. Odfiltrovaná prokvašená zápara se pak dále zpracuje na kyselinu citronovou stejně jako při kvašení povrchovém. Doba kvašení je 60—68 hodin a při dobrém chodu kvasného procesu lze získat 60—80 kg kyseliny i více z 1 m<sup>3</sup> kvasného substrátu.

#### Literatura:

1. Žuravskij a j.: *Proizvodstvo piščevych kislot*. Moskva 1953.
2. Péaud—Lenoel: *Industries agricoles et alimentaires*, 71 (1954), č. 3, 209—221.