

# Za rozšírenie surovinovej základne priemyslu pomocou kvasnej výroby itakonovej kyseliny

JÁN ARPÁI

663.15:547.462.3

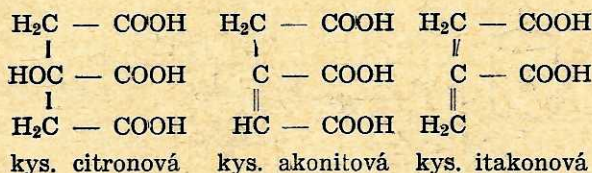
Methylén-jantarová kyselina je dvojsýtnou kyselinou s jednou dvojnou väzbou a označuje sa ako itakonová kyselina. Jej chemická štruktúra už nasvedčuje tomu, že podobne ako deriváty methakrylovej kyseliny, tak aj táto zlúčenina, poskytuje východiskový materiál pri syntéze polyésterov. A vskutku vyniknú estery kyseliny itakonovej svojou vý-

hodnou technológiou izomerizácie do aktívnych foriem t. j. do trans-formy. Na základe tejto jej vlastnosti treba kyselinu itakonovú zaradiť medzi dôležité suroviny priemyslu umelých hmôt a právom sa dá predpokladať, že výroba tejto suroviny by znamenala hospodársky cenný prínos a zvýšenie obrátenej schopnosti štátu.



Z tohto hľadiska je zostavený rozbor, v ktorom sú sledované jednotlivé fázy výroby a nutné predpoklady zavedenia výroby konfrontované s našimi realizačnými možnosťami v prítomnosti alebo v najbližšej budúcnosti.

Chemické štruktúrne vzorce itakonovej, akonitovej a citrónovej kyseliny napísané vedľa seba:



poukazujú na možnosti výroby cestou *chemickou*. Z kyseliny akonitovej, poľažne z akonitanu vápenatého, ktorý je obsažený v melase trstinového cukru, je možné vyrobiť itakonovú kyselinu, podobne i z kyseliny citrónovej sa dá pripraviť pyrolýzou kyselina itakonová. Uvedené spôsoby chemickej výroby sú však neúmerne nákladné a spojené s obtiažnou technológiou. Preto sa javí za dnešného stavu poznatkov o výrobe kyseliny itakonovej kvasná produkcia ako najvýhodnejšia, a to tak z hľadiska technologického ako i ekonomického.

*Kvasná výroba* je založená na schopnosti istých kmeňov plesní *Aspergillus terreus* a *itakonikus* vylučovať kyselinu itakonovú, ako produkt svojej výmeny látokvej. Uvedené plesne sú síce rozšírené v teplejších pôdach po celej zemeguli, avšak schopnosť jednotlivých izolátov produkovať žiadanú kyselinu je veľmi rozličná. A tak prvým a základným predpokladom kvasnej výroby je, aby mala k dispozícii dobrý produkčný kmeň.

*Produkčný kmeň* sa pokladá za vyhovujúci z hľadiska výroby, ak dáva okolo 60 % výnosov kyseliny, počítané na spotrebu cukru t. j. glukózy. Takéto vysokoprodukčné kmene by sa však v prírode len ťažko našli a preto sa získavajú artefciálne. Selektčné práce na získanie dobrého produkčného kmeňa spočívajú v prvom rade na metódach kultivačnej hybridizácie, pri ktorých behom procesu vývoja, prostredníctvom assimilácie a dissimilácie, vonkajšie vplyvy prenikajú do organizmu. Dobré služby pri získaní užitočných foriem plesní konajú v istých prípadoch i silne pôsobiace faktory, akými sú napr. rôzne druhy žiarenia; najmä aplikáciou ultrafialového svetla bolo možné dať vznik vysokoproduktívnym mutantom. Poukaz na tomto mieste nech slúži k tomu, aby si výskumníci uvedomovali, že pokroková biológia nezavrhuje praktické využitie silne pôsobiacich faktorov tam, kde je ešte nedostatok exaktnej metodiky, ale poukazuje na mýlnosť a reakčnosť morganistických výkladov teraz ešte jednoducho nevyjasneného mechanizmu účinnosti. Čo sa týče udržiavania novozískaných vlastností, ktoré podliehajú ľahko zvratu, tu je treba voliť vhodné kultivačné podmienky, aby sa zachovali nové vlastnosti len labilne zakotvené v organizme. V ústavných a priemyselných zbierkach sa nachádzajú u náš kmeň produkujúce kyselinu itakonovú a podarilo sa i niekoľkým našim mikrobiológom izolovať nových producentov. Kým novozískané kmene javili zväčša len veľmi nízku produkciu kyseliny a vyžadovali by si šľachtenie podľa už uvedených zásad, zatiaľ sa ukázalo, že máme k dispozícii registrované

kmene, ktoré dávajú za laboratórnych podmienok výťažky zodpovedajúce už minimálnym požiadavkám rentabilnej kvasnej výroby. Ak vychádzam zo správnych informácií, tak platí, že naše produkčné kmene ešte neboli podrobené intenzívnemu šľachteniu a preto môžem iba na základe svojich poznatkov, získaných pri selekčných prácach v rámci aspirantúry, prehlásiť, že naše zbierkové kmene reagujú na už uvedené zákroky kladne. Dá sa preto predpokladať, že kontinuálnou selekciou by bolo možné čo do produkčného kmeňa zaistiť postupný vzostup výroby, pri čom kmene, ktoré sú už v súčasnosti k dispozícii v niektorých laboratóriách, môžu slúžiť ako základné prevádzkové kmene pri spustení výroby. Tu však treba poznamenať, že k tomu, aby mykologický výskum mohol v krátkom čase dosiahnuť prenikavých výsledkov, bolo by treba úsilie jednotlivých, na seba nezávislých pracovníkov na tomto probléme zlúčiť, skoordinať a vybaviť materiálými ako aj organizačnými predpokladmi úspechu.

*Technologický výskum* lebo fermentačná technika naväzuje na výsledky mykologického výskumu. Naokoľko viem fermentácia kyseliny itakonovej v mólaboratórnom merítke ešte u nás nebola prevádzaná. Preto zavedenie výroby predpokladá u nás 72 hodinovej fermentácii. V submerzných podmienkach je však rast a priebeh metabolizmu odlišný kusy. Treba doporučiť hneď začať s hlbkovou fermentáciou, i keď na prechodné obdobie není možno z investičného hľadiska nepriznať výhody povrchovej metódy.

Úspech fermentácie závisí už na príprave *inokula*, na akosti a množstve spór, ktorými sa zaočkuje fermentačná pôda. Za tým účelom sa produkčný kmeň z konzervačnej pôdy, poprípade z lyofilizovanej konzervy, preočkuje na sporulačnú pôdu, ktorá na rozdiel od fermentačnej pôdy vyvoláva tvorbu síce slabšieho mycélia, ale za to s hojnou sporuláciou. Zloženie sporulačnej pôdy zodpovedá jej špeciálnemu účelu. Sporulácia, ako reakcia mikroorganizmu na nepriaznivé podmienky prostredia, je vyvolaná disproporciou zložiek živného substrátu, pri čom najmä vyvolaním vysokého osmotického tlaku sa zvýši intenzita sporulácie. Dobré sa osvedčila sporulačná pôda následovného zloženia: glukóza 22 g; viňan železnatý 0,005 g; síran horečnatý (+ 7 H<sub>2</sub>O) 0,1 g; prim. fosforečnan draselný 0,2 g; dusičnan sodný 1,2 g; chlorid sodný 35 g; voda do 1000 ml. Pri správnej pracovnej metodike donucuje uvedená pôda *Aspergillus terreus* k tvorbe bohato a rovnomerne sporulujúceho mycélia. Na 1 cm<sup>2</sup> takejto sporulačnej pôdy vyrastá to množstvo spórového materiálu, ktoré je potrebné na inokuláciu 1 litru fermentačnej pôdy.

*Fermentačná pôda* vo svojom klasickom zložení má za základ technickú glukózu. Kukuričný výluh, sírany horčíka a zinku, rozličné dusičnany a chloridy tvoria hlavné doplnkové zložky, ktoré sa pridávajú do fermentačnej pôdy v rôznej koncentrácii, zodpovedajú experimentálne zisteným optimálnym produkčným podmienkam príslušného kmeňa, za daných technologických podmienok fermentácie. Pomocou kyseliny dusičnej alebo sírovej sa upravuje pH fermentačnej pôdy na = 2.

*Spôsob fermentácie*, ako už bolo uvedené, môže prebiehať metódou submerznej alebo povrchovej kultivácie. *Povrchová kultivácia*, ktorá v zásade nevyhovuje požiadavkám modernej kvasnej technológie, býva však u niektorých aerobných fermentácií, akou



je tiež výroba kyseliny itakonovej, zdokonalená vetráním. Povrch kultúry je pri tom prefukovaný miernym prúdom vlažného, vlhkého vzduchu, pričom sa počíta približne spotreba 1 litru vzduchu za minútu na 1 m<sup>2</sup> povrchovej kultúry. V tejto úprave trvá fermentácia za povrchových podmienok 12 dní.

Modernou produkčnou metódou je *submerzná fermentácia*, ktorá dáva maximálne výťažky asi po 72hodinovej fermentácii. V submerzných podmienkach je však rast a priebeh metabolizmu odlišný oproti týmto životným funkciám v podmienkach povrchovej kultivácie. Táto okolnosť sa musí nutne odrážať v úprave postupu a v zložení fermentačnej pôdy. Už pri inokulácii sa javí iný postup. Propagácia pokračuje tu zo sporulačnej pôdy cez predčokovaciu a očkovaciu nádrž, ktorých obsah je upravený tak, že dovoľujú postupné zväčšenie kvasného objemu. Inokulácia sa najlepšie prevádza nakličnými spórmi a ďalšie pomnoženie sa deje už vegetatívnu formou v hlbkovej kultúre. Akosť a množstvo inokula, t. j. správna koncentrácia spór a optimálny stupeň nakličenia vo veľkej miere vplyva na produktivitu kvasného procesu. Nesprávne voleným inokulom, najmä predávkovaním, vývoláva sa silný rast mycélia, ale s relatívne nízkymi výnosmi itakonovej kyseliny, kým naopak nižšie dávky zákvasu dávajú pomerne vyššie výnosy kyseliny vo vzťahu ku množstvu mycélia.

*Optimálne zloženie fermentačnej pôdy*, ako už bolo spomenuté, je do veľkej miery podmienené vlastnosťami produkčného kmeňa, ako i technológiou fermentácie. Ukázalo sa, že sú rozdiely z tohto hľadiska nie iba medzi podmienkami povrchovej a hlbkovej kultivácie, ale i medzi rôznymi úpravami hlbkovej fermentácie. Tak napr. sa zistilo, že optimálne zloženie pôdy v podmienkach laboratórnej kultivácie nevyhovuje bez úpravy v poloprevádzkových tankoch a ďalej poznatky z poloprevádzky sa neuplatnili v celom rozsahu vo veľkých fermentoroch. Táto okolnosť sa vyzdvihuje preto, že častokrát sa mýlne pokladá úspešné ukončenie laboratórneho výskumu, ako je to napr. v danom prípade u kyseliny itakonovej, za dostatočnú záruku úspešného zavedenia do výroby, pričom sa nedoceňuje potreba dôkladných poloprevádzkových pokusov. Investície do poloprevádzky sa mnohonásobne vyplatia pri zavádzaní novej výroby a najmä takej, akou je hlbková fermentácia itakonovej kyseliny. Tu technické momenty, ako napr. intenzita a spôsob prevzdušňovania a miešania, menovite spôsob inštalácie a rozmery prevzdušňovadla, veľkosť minútového objemu vzduchu, počet obrátok a tvar miešadla a pod., uvedené v korelácii k rozmerom a k objemu tanku, sa uplatňujú ako faktory vplyvajúce na životné deje kvasného mikroorganizmu a tak treba s nimi počítať pri zostavení zloženia fermentačnej pôdy. A nie iba na tvar inštalácie, ale tiež na zloženie konštrukčného materiálu fermentačnej aparatury treba prihliadať pri zostavení optimálneho zloženia pôdy. Keď sa totiž z úsporných dôvodov miesto nerezú upotrebuje hliník ako konštrukčný materiál, tu treba za analytickej kontroly upraviť obsah zlúčenín alkalických zemín v médiu, a to odlišne od pôvodného predpisu, čím sa umožní dobré výnosy aj v hliníkových fermentoroch.

Okrem už uvedených vplyvov rozhoduje tiež teplota (v rozmedzí od 25 ° až 35 °C, pH (v rozmedzí od 5 až 1,8), Eh, spôsob odpeňovania, spôsob sterilizácie a udržiavanie sterility, tlakové pomery počas

fermentácie a iné, dnes ešte neznáme faktory, ktoré selektívnym výskumom bude možno postupne abstrahovať.

Problému *kontaminácie* sa treba venovať, lebo podmieňuje voľbu fermentačnej metódy, ako aj umiestnenia výroby. Produkcia kyseliny u niekto-

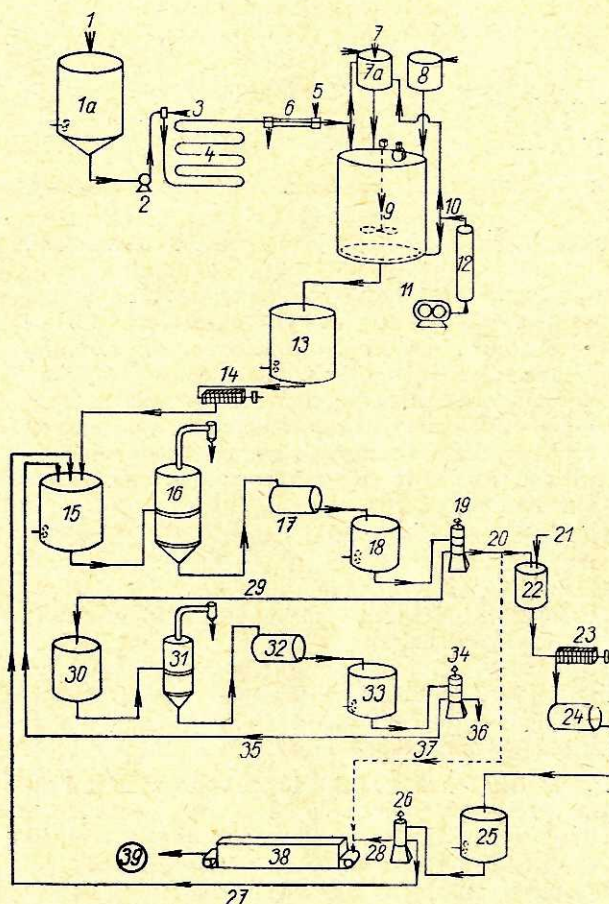


Schéma kvasnej výroby kyseliny itakonovej  
(podľa V. F. Pfeifera, Ch. Vojnovicha, E. N. Hegera)

1. cukor a živiny — 1a. miešačka — 2. čerpadlo — 3. vstup pary cez trysku — 4. útlumové potrubie — 5. prívod vody — 6. výmena tepla — 7. labor. kultúry produkčného kmeňa (*Aspergillus tereus*) — 7a. očkovací tank — 8. nádrž na protipenové prostriedky — 9. kvasný tank (fermentačný tank) — 10. prístup vzduchu — 11. kompresor — 12. vzdušný filter — 13. zberná nádrž na ferment. tekutinu (predloha) — 14. filter vákuový kalolis — 15. odparovací tank — 16. trojstupňový odparovač — 17. krystalizátor — 18. predloha (prísunová nádrž) k odstredivke — 19. odstredivka — 20. kryštalizovaný produkt — 21. prídavok vody — 22. nádrž na surový produkt (s adsorbčnou vložkou) — 23. víd 14 — 24. víd 17 — 25. víd 18 — 26. víd 19 — 27. čistý liquor — 28. krystalizovaný produkt — 29. I. liquor — 30. víd 15 — 31. jednostupňový odparovač — 32. víd 17 — 33. víd 18 — 34. víd 19 — 35. II. vykryštalizovaný materiál — 36. II. liquor do odpadu — 37. vykryštalizovaný materiál — 38. vysušenie — 39. finálny produkt.

rých kmeňov relatívne lepšie prebieha pri vyššom pH, znížené pH na 2,2 až 1,8 má však výhodu najmä z hľadiska zachovania sterility procesu. Pri tak nízkom pH už nehrozí bakteriálna kontaminácia, ale to ešte nevylučuje znečistenie produkčnej kultúry inými plesňami patriacimi najmä do rodu *Aspergillus*. Takáto plesňová kontaminácia je veľmi nebezpečná a pri vzdušnej infekcii plesňou *Aspergillus niger* je produkcia itakonovej kyseliny prerušená.

Správne vyhodnotenie otázky vplyvu sterility sa



odráža nie iba pri voľbe technologického postupu, ale aj pri projektovaní novej výroby, ktorá pre zvýšené nebezpečie plesňovej kontaminácie nemá byť v blízkosti, počažne pričlenená k inej podobnej mykologickej výrobe, i keby aspekty hospodárnosti k tomu viedli.

Pre naše pomery rozhoduje o zavádzaní kvasnej výroby itakonovej kyseliny ešte aj lacný zdroj *základnej suroviny* pre fermentačnú pôdu. Výskum sa tu zameriava na sledovanie všetkých cukernatých priemyselných odpadov (melasa, sulfitové výluhy atď.). Ako výhodné sa javia vedľajšie produkty kukuričnej škrobárne (surový kukuričný cukor, zadné škroby po úprave), ktoré s kukuričným výluhom (corn-steep liquor) by mohli zaistiť surovinovú základňu k výrobe kyseliny itakonovej. A na základe toho nanucuje sa myšlienka spojiť výrobu kyseliny itakonovej s kukuričnou škrobárňou, čím by sa umožnilo i priame zužitkovanie nezahustených výluhov pri zkvašovaní.

Zavedenie novej výroby si vyžaduje zaistenie po stránke laboratórnej i prevádzkovej *analytiky*. Špecifické analytické metódy na stanovenie kyseliny itakonovej sú dostatočne dobre rozpracované. Je to špeciálna metóda podľa Friedkina, spočívajúca na bromácii a ďalej sa dobre osvedčila papierová chromatografia. Pre bežnú prevádzkovú kontrolu fermentácie stačí stanovenie titračnej acidity.

Zbýva ešte popísať *získanie finálneho produktu*. Po oddelení mycélia od fermentovanej tekutiny, ktoré sa deje premývaním, vylisovaním a filtráciou, sa prevádza vlastná izolácia kyseliny. Deje sa to odparovaním, za ktorého itakonová kyselina vykryštalizuje v nečistej forme. Systémom preprávania, filtrácie, poprípade odstredenia a následovného sušenia

sa získava produkt asi 90 % čistoty. Čistenie môže pokračovať cez špeciálne metódy prekryštalizácie, za použitia vyšších alkoholov ako rozpúšťadiel, až na 98—99 % čistoty, pri čom sa získavajú biele kryštalky. Bežný priemyselný kvasný produkt býva znečistený kyselinou jantarovou, kyselinou itavinou, ako i zbytkami cukrov a neredukujúcimi neutrálnymi látkami, z ktorých si zasluhuje zvláštny zmienky erythrit. Erythrit (erythrol) je štyrmocný alkohol a už nachádza praktické upotrebenie.

Nakoniec je žiadúce, aspoň informatívne podať *ekonomické vyhodnotenie* kvasnej výroby. Predpoklad, že zvlášť nečistenú (cca 90 %) kyselinu itakonovú bude možno dodať za takú cenu, ako kyselinu citrónovú, je podložený pokusným a dokumentárnym materiálom.

Tento informatívny príspevok má slúžiť k tomu, aby vzbudil zvýšený záujem o nadhodenú problematiku, ktorej riešenie a realizácia by obohatila naše hospodárstvo o dôležitú výrobu.

#### Literatúra:

- [1] Friedkin M.: Determination of Itaconic Acid in Fermentations Liquors, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. (1945), 17, 637.
- [2] Lockwood L. B.: In „Industrial Fermentations“ Vol 2., Chemical Publ., New York, 1954.
- [3] Lockwood L. B., Ward G. E.: Fermentation Process for Itaconic Acid, Ind. Eng. Chem. 37 (1945), 2, 405.
- [4] Pfeifer V. F., Vojnovich C., Heger E. N.: Itaconic Acid by Fermentation wirt Aspergillus Terreus, Ind. Eng. Chem. 44 (1952), 12, 2975.

Poznámka redakce: Důsledkem intenzivního výzkumu byly již některé požadavky, hlavně pokud jde o koordinaci, realizovány.