

FERMENTAČNÁ PRODUKCIA KYSELINY MLIEČNEJ

IV. OPTIMALIZÁCIA PROCESU, JEHO SCALE-UP A IZOLÁCIA PRODUKTU

Ing.Vladimír HERIBAN, Ing.Vladimír SITKEY,CSc.*, Doc.Ing.Ernest ŠTURDÍK,CSc., Ing.Vladimír SLÁMA#, Dr.Vladimír TIBENSKÝ&, Katedra biochemickej technológie ChTF STU, 812 37 Bratislava, *LIKO VÚ, Miletičova 23, 820 06 Bratislava, #Techmix, 602 00 Brno, &VÚC Bratislava

Kľúčové slová: *kyselina mliečna, bakteriálna mliečna fermentácia, izolácia a purifikácia kyseliny mliečnej, Bacillus coagulans, bakteriálna nadprodukcia laktátu.*

579 663

Ú V O D

Prezentovaný článok nadväzuje na naše predošlé aktivity v oblasti mliečnej fermentácie publikované v minulých číslach nášho časopisu [16,17]. Odvtedy boli z tejto problematiky zverejnené viaceré práce, zamerané na hľadanie nových produkčných kmeňov [1-3], štúdium niektorých biochemických vplyvov na proces [4-8] a vývoj

progresívnych izolačných postupov (osobitne elektrodialýzy), ktoré umožňujú nielen kontinuálny proces za súčasného výrazného zlepšenia jeho ekonomických parametrov, ale súčasne aj izolovať vysoko čistý produkt [9-14]. Naše výskumné aktivity sa týkali jednak problematiky elektrodialýzy ako možnosti separácie a puri-

fikácie kyseliny mliečnej [15], zlepšovania parametrov vyvíjanej fermentácie, ako aj štúdia procesu vo väčších fermentačných objemoch.

Obsahom tejto práce sú výsledky optimalizácie procesných podmienok, zloženia pôdy a objemu inokula. Sú v nej i poznatky o možnostiach separácie kyseliny mliečnej.

2. MATERIÁL

2.1 Bakteriálny producent

Bol použitý izolát identifikovaný ako *Bacillus coagulans* [16]. Kmeň je uložený v Československej zbierke mikroorganizmov v Brne pod číslom CCM 4318 (dostupný len pre majiteľa). Udržiavaný bol na tekutej MRS pôde s prídavkom CaCO_3 pri 4 °C a preočkovávaný v dvojmesačných intervaloch.

2.2 Kultivačné médiá

MRS médium (g.l^{-1}): peptón 10, kvasničný extrakt 5, sacharóza 20, Tween 80 1 ml, K_2HPO_4 2, trihydrát octanu sodného 5, citran amónny 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,05. Po rozpustení všetkých zložiek bolo pH upravené na 5,4 a pôda bola sterilizovaná bežným spôsobom v autokláve (20 min pri 121 °C).

Produkčná pôda (g.l^{-1}): sacharóza 80, kvasničný autolyzát 15, KH_2PO_4 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01. Sterilizovaná bola rovnako ako MRS médium.

2.3 Chemikálie

Peptón pre bakteriológiu a kvasničný autolyzát boli od Imuny Šarišské Michaľany, kvasničný extrakt od holandskej firmy Gist-Brocades, Ostion KS-2 zo Spolku pre chemickú a hutnú výrobu v Ústí nad Labem, Lewatit od nemeckého koncernu Bayer. Leading a terminátor pre izotachoforetickú analýzu dodal Ústav rádioekológie a využitia jadrovej techniky v Košiciach. Granulované aktívne uhlie Dezorex HYS-N pochádzalo zo Slovenských lučobných závodov v Hnúšti. Ostatné chemikálie v čistote p.a. boli od firmy Lachema Brno.

2.4 Prístroje

Inokulum bolo pripravované v termostate BT 120 (Laboratorní přístroje Praha).

Laboratorné fermentačné experimenty boli realizované vo fermentore LF-2 (Vývojové dílny ČSAV Praha) s celkovým objemom 5 l a plnením 2 l, frekvencia otáčok 220 min^{-1} , v 20 l fermentore SLF-20 (JZD Slušovice, ČR) s jedným turbínovým miešadlom a spodným pohonom, otáčky 150 min^{-1} , plnenie 10 l.

Štvrťprevádzkové pokusy sme realizovali v 100 l fermentore BL-100 (Biolafitte, Francúzsko), ktorý bol vybavený tromi turbínovými miešadlami, otáčky 80 min^{-1} , plnenie 70 l a 1500 l fermentore (VÚChZ Brno) s vnútorným priemerom 800 mm, tromi turbínovými miešadlami, otáčky boli 102 min^{-1} , plnenie 900 l.

Analýzy fermentačných médií boli uskutočnené na izotachoforetickom analyzátore ZKI-02 (Ústav

rádioekológie a využitia jadrovej techniky, Spišská Nová Ves).

Mikrobiologické pozorovania boli realizované pomocou mikroskopu Laboval 4 (Zeiss Jena).

3. METÓDY

3.1. Fermentačné experimenty

Rast biomasy bol sledovaný denzitometricky pri 650 nm, inokulum pre laboratórny fermentor sme získali statickou kultiváciou v MRS pôde s 2 % hm. CaCO_3 pri 50 °C. Samotné laboratórne fermentačné experimenty boli vedené podľa [17].

3.2 Analytické metódy

Sacharóza bola stanovovaná upravenou metódou podľa Luffa-Schoorla [17].

Kyselina mliečna a ostatné produkty charakteru organických kyselín boli stanovované izotachoforeticky [20]. Ako vodiaci elektrolyt bola použitá komerčne dodávaná zmes HCl a ϵ -aminokaprónovej kyseliny s prídavkom 0,1 % metylhydroxycelulózy, pH = 4-5) zakončujúcim elektrolytom bola zmes kyseliny kaprónovej a histidínu (pH = 4 - 5).

3.3 Odfarbovanie média

Médium laboratórnej teploty pretekalo cez kolónu naplnenú nosičom Dezorex HYS-N rýchlosťou 1 objem média na 1 objem uhlia za hodinu. Po zahľtení sa nosič regeneroval 4%-ným roztokom NaOH pri 90 °C aktivácia 1% H_2SO_4 pri 50 °C.

3.4 Purifikácia ionexami

Bola robená v kolónovom usporiadaní procesu rýchlosťou 1 objem média na 1 objem ionexu za hodinu. Regenerácia sa robila 10% HCl v množstve 2 objemy kyseliny na 1 objem katexu (OSTION KS-2), resp. 10 objemov 4% NaOH na 1 objem anexu (Lewatit) pri 60 °C.

3.5 Mikrofiltrácia

Laboratórna mikrofiltrácia prebiehala na laboratórnych moduloch vyrobených vo VÚ LIKO s membránami PL-20 pri tlaku 0,3 MPa a teplote 22 °C. Väčšie fermentačné objemy boli spracované na zariadení LAB-UNIT dánskej firmy DDS s membránami PL-20. Ostatné procesné podmienky boli rovnaké ako u laboratórnych experimentov.

3.6 Elektrodialýza

Menšie objemy boli spracované na japonskom zariadení CS-O (Asahi Glass Co.) s membránami RALEX (MEGA, Stráž pod Ralskem) pre väčšie objemy bolo použité zariadenie EDVARD-0-5 (MEGA, Stráž pod Ralskem). Procesné podmienky boli menené v závislosti od požadovaného produktu (sol' alebo voľná kyselina), v prípade paralelnej konverzie soli na voľnú kyselinu bola ako protiión používaná H_3PO_4 [15].

4. VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Optimalizácia podmienok a zloženia pôdy

Fermentačné podmienky boli optimalizované u parametrov, ktoré sú z literatúry známe ako najviac ovplyvňujúce mliečnu fermentáciu, t.j. teplota (T), pH a koncentrácia asimilovateľného dusíka (N). Bola použitá metodika plánovaných experimentov s využitím grécko-latinského štvorca [22]. Teplota bola posudzovaná v rozsahu 48 až 55 °C, pH od 4,8 do 6,5 a koncentrácia kvasničného autolyzáta sa pohybovala od 10 do 20 g.l⁻¹. Vhodnosť testovaných súborov podmienok bola vyhodnocovaná podľa dosiahnutej priemernej rýchlosti produkcie kyseliny mliečnej (V), konverzie substrátu na produkt (K) a obsahu zvyškových cukrov (RS). Pre matematické vyhodnotenie bol použitý súčin priemernej rýchlosti produkcie a konverzie substrátu, t.j. dvoch hodnôt, ktorých veľkosť je priamo úmerná kvalite procesu. Schéma usporiadania grécko-latinského štvorca a dosiahnuté výsledky sú v tab. 1.

Tab. 1. Usporiadanie experimentov podľa grécko-latinského štvorca a dosiahnuté výsledky pri hľadaní optimálnych hodnôt fermentácie

T=48 pH=5,9 N=10 V.K=47,2	RS=12,0 K=73,8 V=0,64	T=48 pH=6,2 N=20 V.K=146,9	RS=1,0 K=93,0 V=1,58	T=48 pH=6,5 N=15 V.K=146,5	RS=0,9 K=88,8 V=1,65
T=52 pH=5,9 N=15 V.K=80,9	RS=9 K=82,5 V=0,98	T=52 pH=6,2 N=10 V.K=50,6	RS=13,0 K=76,6 V=0,66	T=52 pH=6,5 N=20 V.K=140,6	RS=0,6 K=93,8 V=1,50
T=55 pH=5,9 N=20 V.K=74,9	RS=19,4 K=78,8 V=0,95	T=55 pH=6,2 N=15 V.K=149,4	RS=0,6 K=87,5 V=1,71	T=55 pH=6,5 N=10 V.K=119,4	RS=13,0 K=83,5 V=1,43

T - teplota [°C]; N - kvasničný autolyzát [g.l⁻¹]; RS - redukujúce (zvyškové) sacharidy [g.l⁻¹]; K = konverzia substrátu na produkt [%]; V = priemerná rýchlosť produkcie [g.l⁻¹ . h⁻¹]

Z výsledkov je zrejme, že testované parametre majú v zvolenom rozsahu výrazný vplyv na fermentáciu. Zreteľná je najmä nepriaznivá hodnota pH 5,9, čo je vysvetliteľné tým, že pri takto nízkej hodnote je ešte relatívne veľká časť vyprodukovanej kyseliny mliečnej v médiu vo voľnej, a teda nedisociovanej forme, následkom čoho je schopná difundovať späť do bunky a ovplyvňovať tak ďalšiu tvorbu produktu. Z pohľadu testovaných koncentrácií dusíkového zdroja je zrejme, že 10 g.l⁻¹ je ešte nedostatočná koncentrácia a 20 g.l⁻¹ v prípade ostatných nepriaznivých hodnôt fermentáciu nezlepšuje. Z testovaných teplôt sa ako najmenej vhodná pre proces javí byť 52 °C. Objektívnejšie hodnotenie tohto súboru výsledkov bolo robené štatisticky, výpočtom príspevkov hladín jednotlivých testovaných parametrov [18]. Z tohto výpočtu vyplynulo, že najvýhodnejšie pH je v intervale 6,2 až 6,5, koncentrácia dusíkového zdroja medzi 15 až

20 g.l⁻¹ a teplota 48 alebo 55 °C. Vzhľadom na vypočítanú chybu +- 15% bolo potrebné brať do úvahy aj fakt, že na výsledky mali zrejme vplyv interakcie niektorých parametrov. Preto na tieto poznatky nadviazal faktorový pokus, ktorý umožnil zistiť vplyv interakcií na proces. Usporiadanie faktorového pokusu je zrejme z tabuľky 2.

Tab. 2. Faktorový pokus pre stanovenie interakcií parametrov mliečnej fermentácie s kmeňom *B.coagulans* CCM 4318

pH	6,2				6,5			
	48°C		55°C		48°C		55°C	
N	15	20	15	20	15	20	15	20
RS	25,3	1,10	0,57	0,50	0,94	1,00	0,53	0,85
V	1,23	1,58	1,71	1,94	1,65	1,90	1,77	1,71
K	67,9	33,0	87,5	101,9	98,8	97,5	97,5	87,5
V.K	83,8	146,9	149,4	197,7	146,5	185,5	172,8	146,6

N = konc. kvasničného autolyzáta [g.l⁻¹], RS = konc. zvyškových cukrov [g.l⁻¹], V = rýchlosť produkcie kyseliny mliečnej [g.l⁻¹ . h⁻¹], K = konverzia substrátu na produkt [%]

Štatistickým vyhodnotením tohto súboru výsledkov [18,22] bolo zistené, že medzi parametrami je aktuálna jediná štatisticky významná interakcia medzi hodnotami pH a teploty. Ich optimálne hodnoty majú teda pre priebeh fermentácie osobitný význam.

Uvedené závery boli konfrontované metódou lineárnej regresnej analýzy a empirickej rovnice tvaru:

$$Y = A.T + B.T^2 + C.pH + D.pH^2 + E.N + F.N^2 + G$$

Výsledkom bolo zistenie, že optimálna hodnota pH je 6,5, koncentrácia kvasničného autolyzáta 18,5 g.l⁻¹ a teplota 55 °C. Možno teda konštatovať, že obe metódy poskytli prakticky rovnaké výsledky. Preto sme v ďalšom pracovali v hore uvedených podmienkach, autolyzát bol z dôvodu malého štatistického rozdielu medzi pozitívnym vplyvom 15 a 18,6 g.l⁻¹ dávkaný v nižšej koncentrácii.

4.2 Minimalizácia zloženia produkčného média

Po stanovení základných optimálnych fermentačných podmienok sme sa pokúsili zjednodušiť produkčné médium tak, aby bolo čo najhľadobnejšie na minerálne soli a umožnilo tak jednoduchosťou svojho zloženia čo najefektívnejšiu izoláciu produktu elektrodialýzou [15]. Prístup, ktorý sme zvolili, vychádzal jednak z literárnych poznatkov o možnosti vynechania Fe²⁺ z fermentačného média, ako aj zo snahy nevnašať do pôdy žiadne nepotrebné ióny, akými sú v pôvodnom zložení pôdy najmä SO₄²⁻ z (NH₄)₂SO₄ alebo K⁺ z KH₂PO₄. Preto sme z pôdy FeSO₄ vynechali úplne, (NH₄)₂SO₄ a KH₂PO₄ nahradili s (NH₄)₂HPO₄ a ostatné zložky minimalizovali. Použili sme pri tom systém plánovaného experimentu podľa Rosenbrocka [18]. Trojkrokovou optimalizáciou, v ktorej každý krok pozostával zo štyroch experimentov bolo stanovené nové zloženie produkčnej pôdy (viď tab.3).

Tab. 3. Pôvodná produkčná pôda a jej zloženie (g/l) po optimalizácii metódou podľa Rosenbrocka

Zložka	Pôvodné zloženie	Nové zloženie
sacharóza	80	80
kvasničný autol.	15	15
KH ₂ PO ₄	1	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	-
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-	0,75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	0,05
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,05	0,04
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	-

Používanie pôdy takéhoto zloženia prinieslo mierne zvýšenie konverzie substrátu, avšak za cenu poklesu priemernej produkčnej rýchlosti. Hodnota rozdielov (viď tab.4) naznačuje, že ďalšou optimalizáciou [19] by bolo možné zloženie pôdy o procesné parametre vylepšiť. Rezervy možno v tomto smere vidieť najmä v detailnejšej analýze vplyvu hladiny anorganického fosfátu na rast biomasy a tým aj produktivitu procesu.

Tab. 4. Koncentrácia zvyškových cukrov [RS], konverzia substrátu na produkt [K] a priemerná rýchlosť produkcie kyseliny mliečnej [V] vo fermentácii pred optimalizáciou zloženia produkčnej pôdy a po nej

	RS [g.l ⁻¹]	K[%]	V [g.l ⁻¹ . h ⁻¹]
pôvodné zloženie	1,1	92,5	1,72
nové zloženie	0,6	93,4	1,35

4.3 Vplyv objemu inokula

Bakteriálna mliečna fermentácia je typická tým, že produkcia je čiastočne spojená s rastom biomasy, t.j. pre optimálnu produkciu je nutné udržať bunky aspoň pri minimálnom raste. Z tohto dôvodu sme pre ďalšiu optimalizáciu procesu považovali za užitočné zistiť vplyv objemu inokula na rýchlosť produkcie, výťažnosť procesu a stupeň konverzie substrátu na produkt.

Získané výsledky sú v tabuľke 5.

Tab. 5. Vplyv objemu inokula na priebeh mliečnej fermentácie

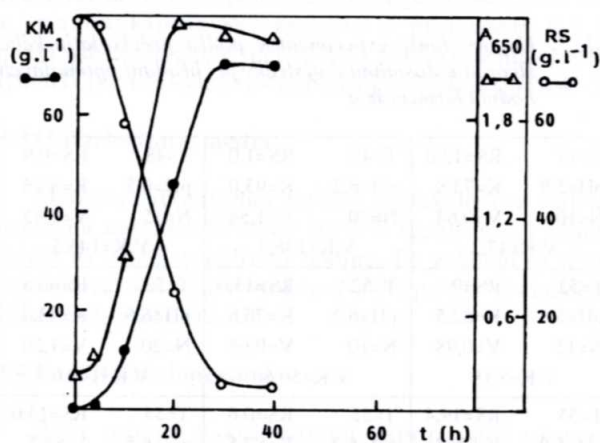
Objem inokula [%]	RS [g.l ⁻¹]	K[%]	V [g.l ⁻¹ . h ⁻¹]
5	1,1	93,5	1,78
10	1,4	87,5	1,31
15	2,6	75,1	1,18

Legenda - viď tabuľka 4.

Z výsledkov je zrejme, že so vzrastajúcim objemom inokula sa zhoršovali všetky sledované parametre. Potvrdilo sa teda, že produkcia je čiastočne spojená s rastom, pretože čím menšie inokulum bolo použité, tým lepšie rastové podmienky boli navodené a tým lepšie výsledky boli dosiahnuté. Naopak, čím bol objem inokula väčší, tým

kratšie trvali rastové podmienky a efektívnosť procesu bola nižšia. Niektoré ďalšie experimenty (výsledky neuvádzame) ukázali, že znížovanie objemu inokula pod 5% obj. už nemá praktický význam a efektívnosť procesu sa už nezlepšuje, naopak, dochádza k predlžovaniu lag fázy. Ako sa ukázalo pri testoch vo väčších fermentačných objemoch, dochádza tu vplyvom lepších hydrodynamických podmienok k urýchleniu rastu, preto je predpoklad, že i tu treba považovať objem inokula 5% za vhodný; menší by mohol podstatne predĺžiť lag fázu, väčší je nevhodný vzhľadom k už i tak rýchlemu rastu buniek. Z technických i ekonomických dôvodov však nebolo možné exaktne tento vplyv na úrovni štvrtiprevádzky otestovať. Preto sme vo všetkých ďalších experimentoch používali objem inokula do 5%.

Celkove možno konštatovať, že uvedenou optimalizáciou sa zlepšila využiteľnosť substrátu zo 75 až 80 % na 93 až 95 %, pri skrátení času fermentácie z cca 60 na 40 až 45 hodín. Priebeh fermentácie v laboratórnom fermentore po optimalizácii podmienok, objemu inokula a zloženia pôdy je na obrázku 1. Analýza fermentačných produktov dokázala, že proces bol homofermentatívny.

Obr.1. Spotreba sacharózy (RS), produkcia kyseliny mliečnej (KM) a rast biomasy (A₆₅₀) počas mliečnej fermentácie na sacharózovom minerálnom médiu s kmeňom *B.coagulans* CCM 4318 po optimalizácii základných procesných parametrov.

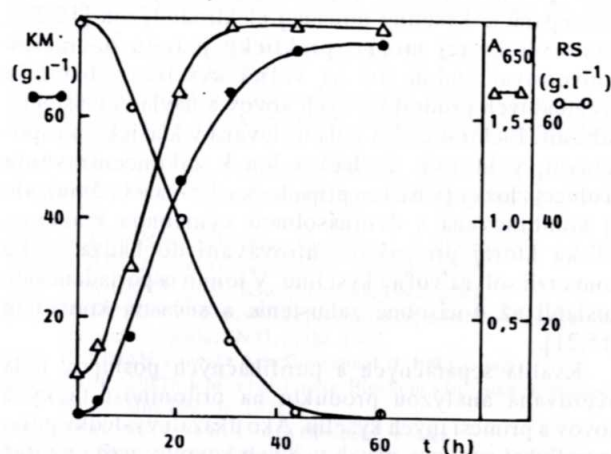
Proces prebiehal v laboratórnom fermentore objemu 5 l plnenom na 2 l, pri teplote 55 °C, pH bolo udržiavané NaOH na 6,5, koncentrácia kvasničného autolyzátu 15 g.l⁻¹, otáčky miešadla 220 min⁻¹.

4.4 Scale-up procesu

Po základnej optimalizácii procesu sme pristúpili k jeho testovaniu vo väčších fermentačných objemoch. Na laboratórny 2-litrový fermentor nadviazali experimenty v 20-litrovom, 100-litrovom a 1500-litrovom fermentore.

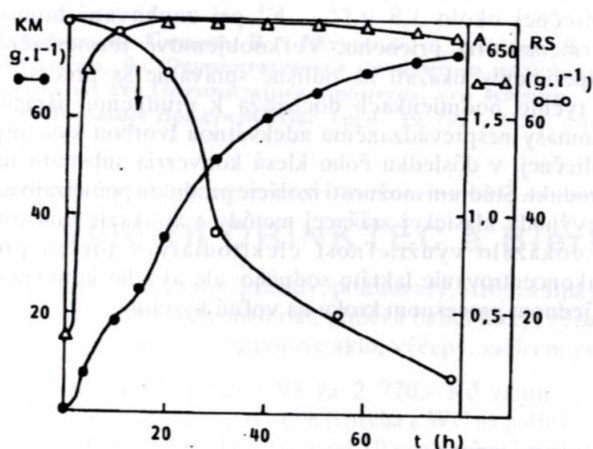
Priebeh fermentácie v 20-litrovom fermentore je na obrázku 2. V porovnaní s vedením predošlého procesu v rovnakých, v laboratóriu optimálnych podmienkach došlo k miernemu zhoršeniu rýchlosti produkcie (na 1,57 g.l⁻¹ . h⁻¹), ako aj konverzie sacharózy na kyselinu mliečnu (na 87,8%). Tieto výsledky mohli byť ovplyvnené najmä skutočnosťou, že vzhľadom na zmenené hydrodynamické pomery vo fermentore došlo k podstatne

rýchlejšímu nárastu biomasy, ktorý nebol sprevádzaný adekvátnou produkciou kyseliny mliečnej.



Obr.2. Priebeh mliečnej fermentácie s kmeňom *B.coagulans* CCM 4318 v 20-litrovom fermentore naplnenom na objem 10 l. Procesné podmienky sú uvedené v texte pri obr.1, otáčky miešadla boli 150 min^{-1} .

Väčšia pozornosť bola venovaná štúdiu procesu vo fermentore objemu 100 l. Prvý experiment bol urobený prostou analógiou laboratórnych podmienok. Ukázalo sa, že i v tomto prípade došlo k výrazne rýchlejšímu nárastu biomasy, počas ktorého nedošlo k adekvátne zrýchlenej produkcii. Dôvodom takéhoto nárastu sú aj tu pravdepodobne lepšie hydrodynamické podmienky väčšieho fermentora vhodnejšieho pre kultiváciu mliečnych baktérií. Rozložením dusíkového zdroja do dvoch dávok (prvá bola súčasťou pôdy pri inokulácii, druhá bola pridaná v stacionárnej fáze rastu buniek, v 19. hodine), sa dosiahla len o málo vyššia konverzia (76,4 oproti 72,1 %) za rovnaký čas, vďaka čomu mierne stúpla priemerná rýchlosť produkcie (z $0,93$ na $1,02 \text{ g.l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Prídavkom dusíkového zdroja na počiatku stacionárnej fázy (obr.3) sa dosiahol rovnomernejší priebeh rastovej i produkčnej krivky, avšak za cenu predĺženia doby fermentácie zo 60 na cca 70 hodín,

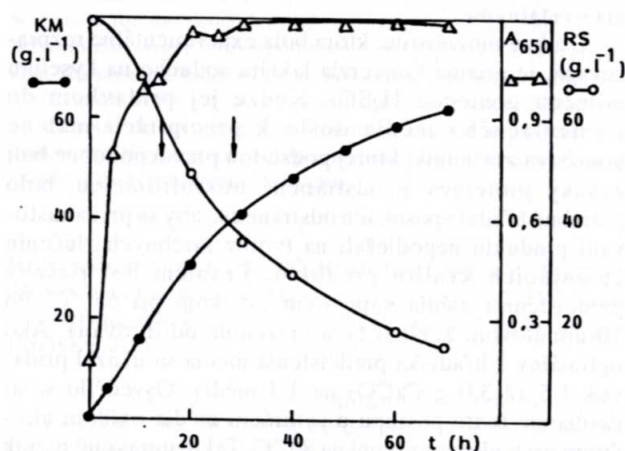


Obr.3. Priebeh mliečnej fermentácie v 100-litrovom fermentore plnenom na 70 l.

Procesné podmienky sú uvedené v texte pri obr.1, rozdiel bol len v otáčkach miešadla (80 min^{-1}) a rozdelení dávkovania kvasničného autolýzátu. Doba jeho prídavku počas procesu označuje šípka.

ale pri udržaní priemernej produkčnej rýchlosti ($0,94 \text{ g.l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Laboratórne hodnoty sa dosiahnuť nepodarilo.

Ani experiment v 1500-litrovom fermentore neprišiel zmenou. Napriek rozloženiu pridávania dusíkového zdroja do troch dávok (vid' obr.4) bola dosiahnutá len veľmi nízka konverzia (76,5 %) pri relatívne malej priemernej produkčnej rýchlosti ($0,88 \text{ g.l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Je teda zrejme, že zlepšenie hydrodynamických podmienok veľkoobjemových fermentorov v zmysle priaznivejších rastových podmienok pre mliečne baktérie prináša so sebou výrazné skrátenie exponenciálnej fázy rastu. Keďže produkcia kyseliny mliečnej je čiastočne spojená s rastom buniek, kratší čas rastu spôsobí aj skrátenie doby produkcie a tým aj zníženie výťažnosti. V tomto smere sa ukazuje ako nevyhnutné ďalej testovať veľkoobjemovú produkciu kyseliny mliečnej s cieľom zabrániť prudkému nárastu biomasy, ktorý nie je sprevádzaný adekvátnou tvorbou kyseliny mliečnej.



Obr.4. Priebeh mliečnej fermentácie v 1500-litrovom fermentore plnenom na 900 l.

Procesné podmienky sa od prípadu popísaného v texte k obr.1 líšili len otáčkami miešadla (102 min^{-1}) a rozdelením dávkovania kvasničného autolýzátu. Jeho prídavky označujú šípky.

4.5 Izolácia produktu

Mikrofiltrácia: Je prvým krokom pri izolácii produktu. Vzhľadom k tomu, že biomasa je tvorená baktériami, boli použité membrány, ktoré veľkosťou svojich pórov zodpovedajú rozmerom produkčných mikroorganizmov. Ukázalo sa, že na testovanom zariadení je možné pri tlaku do $0,3 \text{ MPa}$ dosiahnuť výkon $30 \text{ l.m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, straty sú do 5 %. Pri vyššom tlaku vznikali problémy so zanášaním membrán, znížením tlaku zase prudko klesal výkon.

Odfarbovanie: Izolácia kyseliny mliečnej patrí k najdrahším operáciám technológie a prakticky rozhoduje o celkovej efektívnosti procesu. Začína sa odfarbením média, ktoré sa robí na aktívnom uhlí. Porovnaním adsorpčnej mohutnosti práškovej a granulovanej formy sa ukázalo, že výkonnejšia je granulovaná, čo je výhodnejšie aj z hľadiska technologického využitia (praktická aplikácia, regenerácia). Testovaním odfarbovacej schopnosti aktívneho uhlia voči kyseline mliečnej a jej sodnej soli sa ukázalo, že výraznejšie odfarbenie sa dosahuje v prípade

soli, čo je z hľadiska eventuálneho návrhu technológie výhodnejšie, pretože purifikáciu na ionexoch je lepšie robiť už s odfarbeným roztokom. Výsledkom týchto prác bolo stanovenie odfarbovacej kapacity 1 l použitého aktívneho uhlia na 16,7 l média. Ako najvhodnejšia rýchlosť prechodu média cez kolónu bola stanovená hodnota 1 l média na 1 l aktívneho uhlia za hodinu. S každou ďalšou regeneráciou táto hodnota klesala priemerne o 15 %. Straty kyseliny mliečnej sa pohybovali v rozsahu 3 až 4 %.

Izolácia kyseliny mliečnej: Tradičným spôsobom je zrážanie pomocou vápenatej soli. Je zrejme, že aj dvojstupňové zrážanie nesie so sebou nielen problém odpaďovej sádky, ale aj vysoké straty. Tie sa pri prvom zrážaní pohybovali v rozmedzí 6 až 12 % pôvodného obsahu kyseliny mliečnej, v druhom tiež neklesli pod 8 až 12 % vstupného množstva, celkové straty boli okolo 15 až 20 %. Možno ich pripísať na vrub jednak nie kvantitatívnej konverzii sodnej soli na vápenatú, ako aj pravdepodobnému zadržaniu časti produktu v zrazenine. Do práce je tento postup zaradený prakticky len z dôvodov porovnania s ostatnými.

Druhou možnosťou, ktorá bola experimentálne rozpracovaná, je priama konverzia laktátu sodného na kyselinu mliečnu pomocou H_2SO_4 . Keďže jej prídavkom do fermentačného média došlo k precipitácii malého množstva zrazeniny, ktorej podstatou pravdepodobne boli zvyšky proteínov neodstránené mikrofiltráciou, bolo potrebné hľadať spôsob ich odstránenia, aby sa pri zahusťovaní produktu nepodieľali na tvorbe farebných zlučéní znižujúcich kvalitu produktu. Problém bol riešený predčistením média vápeným mliekom pri 65 °C. Po 10-minútovom zdržaní bola zrazenina odfiltrovaná. Ako optimálny z hľadiska predčistenia média sa ukázal prídavok 1,5 až 3,0 g $CaCO_3$ na 1 l média. Osvedčilo sa aj doplnenie tohto postupu o saturáciu média oxidom uhličitým pri teplote zvýšenej na 85 °C. Takto upravený roztok už neobsahoval ani stopy koloidných látok. Túto techniku je možné ešte rozšíriť o prídavok H_2O_2 , ktorý zlepší deproteínizačný efekt, vznikajú však uhličitano-vápenaté inkrustácie. V oboch prípadoch však dochádza aj k čiastočnému odfarbeniu média, takže jeho dočistenie na aktívnom uhlí by nemuselo byť už také intenzívne. Takto predupravené a následne s H_2SO_4 okyslené médium sa v ďalšom zahusťovalo, pričom v niekoľkých stupňoch bolo potrebné odstraňovať vypadávajúci síran sodný. Rekonverzia kyseliny mliečnej z týchto kryštálov je možná etanolovou extrakciou. Výťažnosť tohto postupu sa však pohybovala na hranici 85 až 90 %.

Testovaná bola aj možnosť extrakcie kyseliny mliečnej organickým rozpúšťadlom, v našom prípade konkrétne acetónom, ktorý pôsobil súčasne aj desolvatačne. Po oddestilovaní acetónu sme získali sirupovité, priehľadné, relatívne dobre odfarbené roztoky kyseliny mliečnej. I tu bol však problémom výťažok - dosiahli sme okolo 85 %.

Ďalšou technikou otestovanou pre konverziu sodnej soli na voľnú kyselinu bola aplikácia silne kyslého katexu v kolónovom usporiadaní. Výhodou tejto metodiky je, že súčasne umožňuje zbaviť produkt aj stôp ťažkých kovov. Pri rýchlosti konverzie 1 l média na 1 l katexu za hodinu je kapacita 1 l katexu 3,5 l média. Nevýhodou sa však ukázala byť relatívne vysoká potreba katexu, resp. činidiel na jeho regeneráciu, pretože sa vymieňa celé stechiometrické množstvo Na^+ kationov. Ďalšia purifikácia produktu na

anexe Lewatit je realizovateľná pri rovnakej prietokovej rýchlosti.

Najefektívnejšou a najvýkonnejšou sa napokon ukázala byť separácia kyseliny mliečnej elektrodialýzou [15,21], pomocou ktorej možno prakticky jednou operáciou konvertovať sodnú soľ na voľnú kyselinu, zbaviť ju eventuálnych prímies ťažkých kovov a navyiac i čiastočne zahustiť. Elektrodialýza bola testovaná v klasickom usporiadaní, v ktorom dochádza len k zakoncentrovaniu žiadúcej zložky (v našom prípade cca 2,5-násobnému), ale aj kombinovaná s dvojnásobnou výmennou reakciou, vďaka ktorej pri zakoncentrovávaní dochádza aj ku konverzii soli na voľnú kyselinu. V tomto usporiadaní sme dosiahli až 4-násobné zahustenie a súčasnú konverziu [15,21].

Kvalita separačných a purifikačných postupov bola overovaná analýzou produktu na prítomnosť ťažkých kovov a prímies iných kyselín. Ako ukázali výsledky polarografickej analýzy, obsah ťažkých kovov v našej vzorke neprekročil hodnotu deklarovanú renomovanými svetovými firmami ako hraničnú (tabuľka 6). Podobne ^{13}C NMR spektrum nášho produktu vykazovalo čistotu minimálne takého stupňa, akú má komerčný zahraničný produkt.

Tab. 6. Porovnanie obsahu ťažkých kovov v pripravenej kyseline mliečnej s údajmi renomovaného výrobcu (PURAC biochem)

Vzorka	Pb	Cd	Cu	Sn	Celkom
	[mg.kg ⁻¹]				
ChTF STU	0,279	0,037	1,08	3,063	4,459
PURAC (lit.)	&	&	&	&	10,000

& - osobitne se neuvádza

Z Á V E R

Na základe optimalizácie procesných podmienok a zloženia produkčnej pôdy bolo navrhnuté také vedenie procesu, ktoré zaisťuje dosiahnutie produktivity kyseliny mliečnej okolo 1,8 g.l⁻¹ . h⁻¹ pri zachovaní homofermentatívnosti priebehu. Veľkoobjemové fermentačné experimenty ukázali na odlišné správanie sa procesu - v týchto podmienkach dochádza k prudkému nárastu biomasy nesprievádzanému adekvátnou tvorbou kyseliny mliečnej, v dôsledku čoho klesá konverzia substrátu na produkt. Štúdium možností izolácie produktu poukázalo na nevýhody klasickej zrážacej metódy a aplikácie ionexov a dokázalo využiteľnosť elektrodialýzy nielen pre zakoncentrovanie laktátu sodného, ale aj jeho konverziu v jednom procesnom kroku na voľnú kyselinu.

LITERATÚRA:

- [1] TSENG, C.P., MONTVILLE, T.J.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 1992, s. 777.
- [2] JP Pat. 03 285 674, 1991
- [3] EP Pat. 486 024, 1992
- [4] BONESTROO, M.H. et al.: Int. J. Food Microbiol. 15, 1992, s. 365.

- [5] CHIARINI, L. et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol., **36**, 1992, s. 461.
- [6] BAIER, B. et al.: BioEngineering, **8**, 1992, s. 42.
- [7] BAIER, B. et al.: BioEngineering, **8**, 1992, s. 54.
- [8] OZEN, S., OZILGEN, M.: J. Chem. Technol. Biotechnol. **54**, 1992, s. 57.
- [9] NOMURA, Y.: Hakkō Kagaku Kaishu, **70**, 1992, s. 205.
- [10] US Pat. 5 068 418, 1991.
- [11] SRIVASTAVA, A. et al.: Biotechnol. Bioeng., **39**, 1992, s. 607.
- [12] DAVISON, B., THOMPSON, J. E.: Appl. Biochem. Biotechnol., **34-35**, 1992, s. 431.
- [13] BASSI, A. S. et al.: Chem. Eng. Commun., **103**, 1991, s. 119.
- [14] KRISCHKE, W. et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol., **34**, 1991, s. 573.
- [15] HERIBAN, V. et al.: Biotechnol. Techn., **7**, 1993, s. 63.
- [16] HERIBAN, V. et al.: Kvas. prům., **38**, 1992, s. 231.
- [17] HERIBAN, V. et al.: Kvas. prům., **38**, 1992, s. 293.
- [18] MEDONOS, V.: Statistické zpracování experimentálních výsledků analýzou rozptylu. SNTL Praha, 1961.
- [19] HERIBAN, V. et al.: Acta Biotechnol., **3**, 1993, v tlači.
- [20] EVERAERTS, F. M. et al.: Proc. Biochem.: In: Isotachopheresis, Amsterdam, Elsevier 1976.
- [21] HERIBAN, V. et al.: Proc. Biochem. v tisku.
- [22] PÁZMAN, A. et al.: Řešené situácie z navrhovania experimentov, Alfa Bratislava, 1986.

*Lektorovala Doc. Ing. Kateřina Demnerová, CSc.
Do redakce došlo 14.1.1993*

HERIBAN, V. - SITKEY, V. - ŠTURDÍK, E. - SLÁMA, V. - TIBENSKÝ, V.: Fermentačná produkcia kyseliny mliečnej. IV: Optimalizácia procesu, jeho scale-up a izolácia produktu. Kvas. prům., **39**, 1993, č. 7, s. 197 - 203

Práca nadvazuje na izoláciu termofilného producenta kyseliny mliečnej. Prezentuje poznatky z optimalizácie základných fermentačných podmienok a zloženia produkčnej pôdy metódou plánovaného experimentu ako aj objemu používaného inokula. Analyzuje správanie sa procesu vo väčších fermentačných objemoch až po 1500 l, pojednáva o možnostiach odfarbovania média, izolácie a purifikácie produktu a napokon porovnáva čistotu získanej kyseliny mliečnej s komerčne dostupným produktom. Navrhuje zloženie média a podmienky, za ktorých je priebeh procesu najlepším z hľadiska kinetiky, ako aj konverzie substrátu na produkt.

Герибан, В. - Ситкей, В. - Штурдик, Е. - Слама, В. - Тибенский, В.: Ферментативная продукция молочной кислоты. IV. Оптимизация процесса, его scale-up и изолирование продукта. Квас. прум., **39**, 1993, № 7, стр. 197 - 203

Работа продолжает тему изолирования продуцента молочной кислоты. Она представляет сведения по оптимизации основных условий ферментации и состава среды методом планированного эксперимента, также как и объема применяемого инокуля. Она проводит анализ поведения процесса в больших ферментационных объемах до 1500 л, обсуждает возможности обеспечения среды, изолирования и пурификации продукта и, наконец, сопоставляет чистоту полученной молочной кислоты с торгово доступным продуктом. Далее она предлагает состав среды и условия, при которых ход процесса наиболее благоприятен как с точки зрения кинетики, так и конверсии субстрата в продукт.

HERIBAN, V. - SITKEY, V. - ŠTURDÍK, E. - SLÁMA, V. - TIBENSKÝ, V.: Fermentation Production of Lactic Acid. IV. Process Optimization, its Scale-Up and Product Isolation. Kvas. prům., **39**, 1993, No. 7, pp 197 - 203.

After isolation of the thermophilic production strain the results of the optimization of principal fermentation conditions, that of the composition of a production medium and the quantity of inoculum are described. The method of the planned experiment was used for the procedure of optimization. Also the process behaviour in larger fermentation volumes (up to 1500 l) is analyzed. The possible medium decolourization, product isolation and purification and its comparison with the same commercially sold product are discussed. The optimum medium composition and culture conditions from standpoints both of kinetic as well as of substrate conversion are developed.

HERIBAN, V. - SITKEY, V. - ŠTURDÍK, E. - SLÁMA, V. - TIBENSKÝ, V.: Fermentative Milchsäureproduktion. IV. Optimierung des Prozesses, sein Scale-up und Isolation des Produkts. Kvas. prům., **39**, 1993, Nr. 7, S. 197 - 203

Die Arbeit knüpft an die Isolation des thermophilen Milchsäure-Produzenten an. Präsentiert werden die Erkenntnisse aus der Optimierung der Grundfermentations-Bedingungen und der Zusammensetzung des Produktionsbodens mittels der Methode des geplanten Experiments sowie auch des Volumens des angewandten Inoculums. Es wird das Verhalten des Prozesses in grösseren Fermentationsvolumina bis zu 1500 l analysiert; weiter behandeln die Autoren die Möglichkeiten der Medium-Entfärbung, der Isolation und Purifikation des Produkts. Die Reinheit der gewonnenen Milchsäure wird mit den kommerziell zugänglichen Erzeugnissen verglichen. Es wird die Zusammensetzung des Mediums vorgeschlagen sowie auch die Bedingungen, bei denen der Prozeß optimal verläuft, und zwar nicht nur vom Standpunkt der Kinetik, sondern auch der Konversion des Substrats auf das Produkt.